

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 949 049**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2009** **E 20173397 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2023** **EP 3750552**

54 Título: **Trampas de GDF**

30 Prioridad:

14.08.2008 US 189094 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
25.09.2023

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 949 049 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

Trampas de GDF

5 Antecedentes de la invención

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

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

La eritropoyetina (Epo) es ampliamente reconocida como el regulador positivo más significativo de la eritropoyesis en vertebrados posnatales. Epo regula la respuesta eritropoyética compensatoria a la tensión de oxígeno de los tejidos reducida (hipoxia) y los niveles bajos de glóbulos rojos o niveles bajos de hemoglobina. En seres humanos, los niveles elevados de Epo propician la formación de glóbulos rojos al estimular la generación de progenitores eritroides en la médula ósea y el bazo. En el ratón, la Epo potencia la eritropoyesis principalmente en el bazo.

Los médicos utilizan diversas formas de Epo recombinante para aumentar los niveles de glóbulos rojos en una diversidad de entornos clínicos, y particularmente para el tratamiento de la anemia. La anemia es una afección ampliamente definida caracterizada por niveles de hemoglobina o glóbulos rojos en la sangre más bajos de lo normal. En algunos casos, la anemia es provocada por un trastorno primario en la producción o supervivencia de los glóbulos rojos. Más comúnmente, la anemia es secundaria a enfermedades de otros sistemas (Weatherall y Provan (2000) *Lancet* 355, 1169-1175). La anemia puede ser el resultado de una tasa de producción reducida o una tasa de destrucción incrementada de los glóbulos rojos o por la pérdida de glóbulos rojos debido a sangrado. La anemia puede ser el resultado de una diversidad de trastornos que incluyen, por ejemplo, insuficiencia renal crónica, tratamiento de quimioterapia, síndrome mielodisplásico, artritis reumatoide y trasplante de médula ósea.

El tratamiento con Epo típicamente provoca una elevación de las hemoglobinas en aproximadamente 1-3 g/dl en seres humanos sanos durante un período de semanas. Cuando se administra a individuos anémicos, este régimen de tratamiento con frecuencia proporciona aumentos sustanciales en los niveles de hemoglobina y glóbulos rojos y conduce a mejoras en la calidad de vida y supervivencia prolongada. La Epo no es uniformemente eficaz, y muchas personas son resistentes incluso a dosis altas (Hori *et al.* (2000) *Nephrol Dial Transplant* 15, 43-50). Más del 50 % de los pacientes con cáncer tienen una respuesta inadecuada a la Epo, aproximadamente el 10 % con insuficiencia renal terminal son hiporreactivos (Glaspy *et al.* (1997) *J Clin Oncol* 15, 1218-1234; Demetri *et al.* (1998) *J Clin Oncol* 16, 3412-3425), y menos del 10 % con síndrome mielodisplásico responden favorablemente (Estey (2003) *Curr Opin Hematol* 10, 60-67). Varios factores, que incluyen inflamación, deficiencia de hierro y vitaminas, diálisis inadecuada, toxicidad por aluminio e hiperparatiroidismo pueden predecir una respuesta terapéutica deficiente, y los mecanismos moleculares de resistencia a Epo aún no están claros.

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

55 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un polipéptido para su uso en un método de tratamiento de la anemia en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido comprende un ácido glutámico o un ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido se une a GDF11 y/o a miostatina, en donde el polipéptido se administra por vía parenteral.

La invención se refiere además a un polipéptido para su uso como se describe anteriormente, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1.

La invención se refiere además a un polipéptido para su uso como se describe anteriormente, en donde el polipéptido es una proteína de fusión de trampa de GDF y comprende (i) la secuencia de aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 1, pero en donde el polipéptido comprende un ácido glutámico o un ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1; (ii) un conector; y (iii) un dominio Fc.

La invención se refiere además a un polipéptido para su uso como se describe en cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el polipéptido comprende uno o más residuos de aminoácidos modificados seleccionados de: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con una fracción lipídica y un aminoácido conjugado con un agente de derivatización orgánico.

La invención se refiere además a un polipéptido para su uso como se describe en cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el polipéptido inhibe

- i) la señalización por GDF11 y miostatina en un ensayo basado en células;
- ii) la señalización por GDF11 en un ensayo basado en células; o
- iii) la señalización por miostatina en un ensayo basado en células.

La invención se refiere además a un polipéptido para su uso como se describe en cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el polipéptido es una proteína de fusión de trampa de GDF y comprende además una región constante de una inmunoglobulina, en donde la región constante se obtiene de una cadena pesada de IgG, en donde la región constante de una inmunoglobulina es un dominio Fc y en donde el polipéptido forma un homodímero.

La invención se refiere además a un polipéptido para su uso como se describe en cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en:

- a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a SEQ ID NO: 28;
- b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95 % idéntica a SEQ ID NO: 28;
- c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 28; y
- d) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28, en donde el polipéptido comprende un ácido glutámico o un ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1.

La invención se refiere además a un polipéptido para su uso como se describe en cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1, pero en donde el polipéptido comprende un ácido glutámico o un ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1.

La invención se refiere además a un polipéptido para su uso como se describe en cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido comprende un ácido glutámico o un ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1.

La invención se refiere además a un polipéptido para su uso como se describe en cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido comprende un ácido glutámico o un ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1.

La invención se refiere además a un polipéptido para su uso como se describe en cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 1, pero en donde el polipéptido comprende un ácido glutámico o un ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1.

La invención se refiere además a un polipéptido para su uso como se describe en cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el sujeto está recibiendo una transfusión de sangre.

La invención se refiere además a un polipéptido para su uso como se describe en cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el sujeto tiene síndrome mielodisplásico.

La invención se refiere además a un polipéptido para su uso como se describe en cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el sujeto tiene talasemia.

En parte, la divulgación demuestra que las trampas de GDF pueden usarse para aumentar los niveles de

hemoglobina y glóbulos rojos. Los polipéptidos ActRIIB variantes que tienen una afinidad significativamente disminuida por la activina (por ejemplo, activina A y/o activina B) en relación con otros ligandos de ActRIIB, tal como GDF11 y/o miostatina, se denominan trampas de GDF. Las variantes de ActRIIB descritas en el presente documento son trampas de GDF a menos que se indique lo contrario. En particular, la divulgación demuestra que una trampa de GDF que es una forma soluble del polipéptido ActRIIB que tiene un residuo ácido que es un ácido glutámico o un ácido aspártico en la posición 79 de la SEQ ID NO: 1, cuando se administra *in vivo*, aumenta los niveles de glóbulos rojos en la sangre. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la divulgación proporciona trampas de GDF (como se describe anteriormente en el presente documento y en las reivindicaciones) para su uso en métodos para aumentar los niveles de hemoglobina y glóbulos rojos en pacientes y para tratar trastornos asociados con niveles bajos de hemoglobina o glóbulos rojos en pacientes que los necesiten. Como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 12/012.652, las trampas de GDF se pueden usar para aumentar la masa muscular y disminuir la masa grasa.

En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona trampas de GDF (como se define anteriormente en el presente documento y en las reivindicaciones) que son polipéptidos ActRIIB variantes, que incluyen polipéptidos ActRIIB que tienen truncamientos amino- y carboxiterminales y alteraciones de secuencia. Opcionalmente, las trampas de GDF de la invención pueden diseñarse para antagonizar preferentemente uno o más ligandos de receptores ActRIIB, tales como GDF8 (también llamado miostatina), GDF11, Nodal y BMP7 (también llamado OP-1). Los ejemplos de trampas de GDF incluyen un conjunto de variantes obtenidas de ActRIIB que han disminuido en gran medida la afinidad por la activina. Estas variantes presentan efectos convenientes sobre los glóbulos rojos mientras reducen los efectos sobre otros tejidos. La presente invención proporciona tales variantes que tienen un aminoácido ácido que es ácido aspártico (D) o un ácido glutámico (E) en la posición correspondiente a la posición 79 de SEQ ID NO 1. En ciertas realizaciones, el polipéptido de trampa de GDF es un polipéptido como se define en la reivindicación 1 que se caracteriza además porque comprende una secuencia de aminoácidos que comprende, consiste en o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, 26, 28, 29, 32, 37 o 38, y polipéptidos que son al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticos a cualquiera de los anteriores.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona preparaciones farmacéuticas que comprenden una trampa de GDF (como se describe anteriormente en el presente documento y en las reivindicaciones) que se une a un ligando de ActRIIB tal como GDF8, GDF11, activina (por ejemplo, activina B), BMP7 o nodal, y un transportador farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, la trampa de GDF se une a un ligando de ActRIIB con una Kd menor que 10 micromolar, menor que 1 micromolar, menor que 100 nanomolar, menor que 10 nanomolar o menor que 1 nanomolar. Opcionalmente, la trampa de GDF inhibe la señalización de ActRIIB, tal como los sucesos de transducción de señales intracelulares desencadenados por un ligando de ActRIIB. Una trampa de GDF para su uso en dicha preparación puede ser cualquiera de las divulgadas en el presente documento (que son polipéptidos como se definen en la reivindicación 1), incluidas, por ejemplo, las trampas de GDF que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 o 40, o trampas de GDF que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 o 40, o trampas de GDF que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 o 40, en donde en cada una de las anteriormente mencionadas trampas de GDF la posición correspondiente a L79 en la SEQ ID NO: 1 es un aminoácido ácido que es un ácido glutámico o un ácido aspártico. Una trampa de GDF preferida para su uso en dicha preparación consiste en, o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26. Una trampa de GDF puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido ActRIIB de origen natural, tal como uno que comprenda al menos 10, 20 o 30 aminoácidos de una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 o 40 o una secuencia de la SEQ ID NO: 2, que carece de 1, 2, 3, 4, 5 o 10 a 15 aminoácidos carboxiterminales y que carecen de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos en el extremo aminoterminal. Un polipéptido preferido comprenderá un truncamiento en relación con la SEQ ID NO: 2 o 40 de entre 2 y 5 aminoácidos en el extremo N y no más de 3 aminoácidos en el extremo C. Una trampa de GDF puede incluir una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActRIIB (por ejemplo, en el dominio de unión a ligando) en relación con un polipéptido ActRIIB de origen natural. La alteración en la secuencia de aminoácidos puede, por ejemplo, alterar la glucosilación del polipéptido cuando se produce en una célula de mamífero, de insecto u otra célula eucariota, o alterar la escisión proteolítica del polipéptido en relación con el polipéptido ActRIIB de origen natural.

Una trampa de GDF puede ser una proteína de fusión que tiene, como un dominio, un polipéptido ActRIIB (por ejemplo, un dominio de unión a ligando de un ActRIIB con una o más variaciones de secuencia) y uno o más dominios adicionales que proporcionan una propiedad conveniente, tales como una farmacocinética mejorada, una purificación más fácil, un direccionamiento a tejidos particulares, etc. Por ejemplo, un dominio de una proteína de fusión puede potenciar uno o más de la estabilidad *in vivo*, la semivida *in vivo*, la captación/administración, la localización o distribución en tejidos, la formación de complejos proteicos, la multimerización de la proteína de fusión y/o la purificación. Las proteínas de fusión de trampa de GDF pueden incluir un dominio Fc de inmunoglobulina (de tipo silvestre o mutante) o una seroalbúmina. En ciertas realizaciones, una fusión de trampa de GDF comprende un conector relativamente no estructurado colocado entre el dominio Fc y el dominio extracelular de ActRIIB. Este conector no estructurado puede corresponder a la región no estructurada de aproximadamente 15 aminoácidos en el

extremo carboxiterminal del dominio extracelular de ActRIIB (la "cola"), o puede ser una secuencia artificial de entre 3 y 5, 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos que están relativamente exentos de estructura secundaria. Un conector puede ser rico en residuos de glicina y prolina y puede, por ejemplo, contener secuencias repetidas de treonina/serina y glicinas (por ejemplo, singletes o repeticiones TG₄ (SEQ ID NO: 13) o SG₄ (SEQ ID NO: 14)) o una serie de tres glicinas. Una proteína de fusión puede incluir una subsecuencia de purificación, tal como una etiqueta de epítipo, una etiqueta de FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión de GST. En ciertas realizaciones, una fusión de trampa de GDF comprende una secuencia líder. La secuencia líder puede ser una secuencia líder nativa de ActRIIB o una secuencia líder heteróloga. En ciertas realizaciones, la secuencia líder es una secuencia líder del activador de plasminógeno tisular (TPA). En una realización, una proteína de fusión de trampa de GDF comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la fórmula A-B-C. La porción B es un polipéptido ActRIIB truncado de forma amino- o carboxiterminal que consiste en la secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 2 o 40. Las porciones A y C pueden ser independientemente cero, uno o más de un aminoácido, y ambas porciones A y C son heterólogas para B. Las porciones A y/o C pueden estar unidas a la porción B a través de una secuencia conectora.

Opcionalmente, una trampa de GDF incluye un polipéptido ActRIIB variante que tiene uno o más residuos de aminoácidos modificados seleccionados de: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con una fracción lipídica y un aminoácido conjugado con un agente de derivatización orgánico. Una preparación farmacéutica también puede incluir uno o más compuestos adicionales, tales como un compuesto que se usa para tratar un trastorno asociado a ActRIIB. Preferentemente, una preparación farmacéutica está sustancialmente exenta de pirógenos. En general, es preferible que una trampa de GDF se exprese en una línea celular de mamífero que medie la glucosilación natural adecuada de la trampa de GDF para disminuir la probabilidad de una respuesta inmunitaria desfavorable en un paciente. Las líneas celulares humanas y CHO se han usado con éxito, y se espera que sean útiles otros vectores de expresión de mamíferos comunes.

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

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona trampas de GDF que son polipéptidos ActRIIB solubles que comprenden un dominio de unión a ligando alterado (por ejemplo, unión a GDF8). Las trampas de GDF con dominios de unión a ligando alterados pueden comprender, por ejemplo, una o más mutaciones en residuos de aminoácidos tales como E37, E39, R40, K55, R56, Y60, A64, K74, W78, L79, D80, F82 y F101 de ActRIIB humano (la numeración es relativa a la SEQ ID NO: 1). Como se ha explicado anteriormente, las trampas de GDF de acuerdo con la invención comprenden un ácido glutámico (E) o un ácido aspártico (D) en la posición correspondiente al residuo L79 en la SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado puede tener una selectividad aumentada para un ligando tal como GDF8/GDF11 con respecto a un dominio de unión a ligando de tipo silvestre de un receptor ActRIIB. Como ilustración, en el presente documento se demuestra que estas mutaciones aumentan la selectividad del dominio de unión a ligando alterado para GDF11 (y, por lo tanto, presumiblemente, GDF8) sobre activina: K74Y, K74F, K74I, L79D, L79E y D80I. Las siguientes mutaciones tienen el efecto inverso, aumentando la proporción de unión a activina sobre GDF11: D54A, K55A, L79A y F82A. La actividad de unión global (GDF11 y activina) puede aumentarse mediante la inclusión de la región de "cola" o, presumiblemente, una región conectora no estructurada, y también mediante el uso de una mutación K74A. Otras mutaciones que provocaron una disminución global de la afinidad de unión al ligando incluyen: R40A, E37A, R56A, W78A, D80K, D80R, D80A, D80G, D80F, D80M y D80N. Las mutaciones se pueden combinar para lograr los efectos deseados. Por ejemplo, muchas de las mutaciones que afectan la proporción de unión GDF 11:activina tienen un efecto negativo global sobre la unión al ligando y, por lo tanto, pueden combinarse con mutaciones que generalmente aumentan la unión al ligando para producir una proteína de unión mejorada con selectividad de ligando. En conformidad con lo anterior, la presente invención proporciona una trampa de GDF que es un polipéptido ActRIIB que comprende una mutación L79D o L79E, opcionalmente en combinación con sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos adicionales.

Opcionalmente, una trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando alterado tiene una proporción de K_d para la unión de activina a K_d para la unión de GDF8 que es al menos de 2, 5, 10 o incluso 100 veces mayor en relación con la proporción para el dominio de unión al ligando de tipo silvestre. Opcionalmente, la trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando alterado tiene una relación de CI₅₀ para inhibir activina a CI₅₀ para inhibir GDF8/GDF11 que es al menos de 2, 5, 10 o incluso 100 veces mayor en relación con el dominio de unión al ligando de ActRIIB de tipo silvestre. Opcionalmente, la trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando alterado inhibe GDF8/GDF11 con una CI₅₀ al menos de 2, 5, 10 o incluso 100 veces menos que la CI₅₀ para inhibir la activina. Estas trampas de GDF pueden ser proteínas de fusión que incluyen un dominio Fc de inmunoglobulina (de tipo silvestre o mutante). En ciertos casos, las trampas de GDF solubles en cuestión son antagonistas (inhibidores) de GDF8 y/o GDF11.

Se contemplan otras trampas de GDF, tales como las siguientes. Una proteína de fusión de trampa de GDF que comprende una porción procedente de la secuencia de ActRIIB de la SEQ ID NO: 1 o 39 y una segunda porción de

polipéptido, en donde la porción procedente de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de la SEQ ID NO: 1 o 39 (opcionalmente comenzando en 22-25 de la SEQ ID NO: 1 o 39) y que termina en cualquiera de los aminoácidos 109-134 de la SEQ ID NO: 1 o 39, en donde la porción procedente de ActRIIB comprende un ácido glutámico o un ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1 o 39, y en donde la proteína de fusión de trampa de GDF inhibe la señalización por activina, miostatina y/o GDF11 en un ensayo basado en células. La proteína de fusión de trampa de GDF anterior, en donde la porción procedente de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de la SEQ ID NO: 1 o 39 (opcionalmente comenzando en 22-25 de la SEQ ID NO: 1 o 39) y que termina en cualquiera de los aminoácidos 109-133 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF anterior, en donde la porción procedente de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de la SEQ ID NO: 1 o 39 (opcionalmente, comenzando en 22-25 de la SEQ ID NO: 1 o 39) y que termina en cualquiera de los aminoácidos 109-133 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF anterior, en donde la porción deriva de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-24 de la SEQ ID NO: 1 o 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 109-134 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF anterior, en donde la porción procedente de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de la SEQ ID NO: 1 o 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 118-133 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF anterior, en donde la porción procedente de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-24 de la SEQ ID NO: 1 o 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 118-134 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF anterior, en donde la porción procedente de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de la SEQ ID NO: 1 o 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF anterior, en donde la porción procedente de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de la SEQ ID NO: 1 o 39 y que termina en cualquier de aminoácidos 128-133 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF anterior, en donde la porción procedente de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de la SEQ ID NO: 1 o 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 118-134 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF anterior, en donde la porción procedente de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de la SEQ ID NO: 1 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de la SEQ ID NO: 1 o 39. En todas las proteínas de fusión de trampa de GDF mencionadas anteriormente, la porción procedente de ActRIIB comprende un ácido glutámico o un ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1 o 39. Sorprendentemente, las construcciones comienzan en 22-25 de la SEQ ID NO: 1 o 39 tienen niveles de actividad mayores que las proteínas que tienen el dominio extracelular completo de ActRIIB humano. En una realización preferida, la proteína de fusión de trampa de GDF comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que comienza en la posición de aminoácido 25 de la SEQ ID NO: 1 o 39 y que termina en la posición de aminoácido 131 de la SEQ ID NO: 1 o 39, en donde dicha secuencia de aminoácidos comprende un ácido glutámico o un ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1 o 39. En otra realización preferida, el polipéptido de trampa de GDF consiste en, o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, 26, 28, 29, 32, 37 o 38. Cualquiera de las proteínas de fusión de trampa de GDF anteriores se puede producir como un homodímero. Cualquiera de las proteínas de fusión de trampa de GDF anteriores puede tener una porción heteróloga que comprenda una región constante de una cadena pesada de IgG, tal como un dominio Fc. Como se explica anteriormente, cada una de las proteínas de fusión de trampa de GDF anteriores comprende un aminoácido ácido que es un ácido glutámico o un ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1, opcionalmente en combinación con una o más sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos adicionales con respecto a la SEQ ID NO: 1.

Se contemplan otras proteínas de trampa de GDF, tales como las siguientes. Una proteína de trampa de GDF que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1 o 39, pero en donde la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1 o 39 es un ácido glutámico o un ácido aspártico, en donde la posición correspondiente a 64 de la SEQ ID NO: 1 es R o K, y en donde la proteína de trampa de GDF inhibe la señalización por activina, miostatina y/o GDF11 en un ensayo basado en células. La proteína de trampa de GDF anterior, en donde al menos una alteración con respecto a la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o 39 se posiciona fuera del bolsillo de unión al ligando. La proteína de trampa de GDF anterior, en donde al menos una alteración con respecto a la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o 39 es una alteración conservadora posicionada dentro del bolsillo de unión al ligando. La proteína de trampa de GDF anterior, en donde al menos una alteración con respecto a la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o 39 es una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en K74, R40, Q53, K55 y F82. La proteína de trampa de GDF anterior, en donde la proteína comprende al menos una secuencia N-X-S/T en una posición distinta de una secuencia endógena N-X-S/T de ActRIIB, y en una posición fuera del bolsillo de unión al ligando.

Se contemplan otras trampas de GDF, tales como las siguientes. Una proteína de trampa de GDF que comprende

una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1 o 39, pero en donde la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1 o 39 es un ácido glutámico o un ácido aspártico, y en donde la proteína comprende al menos una secuencia N-X-S/T en una posición diferente que una secuencia N-X-S/T de ActRIIB endógena, y en una posición fuera del bolsillo de unión al ligando. La trampa de GDF anterior, en donde la proteína de trampa de GDF comprende N en la posición correspondiente a la posición 24 de la SEQ ID NO: 1 o 39 y S o T en la posición correspondiente a la posición 26 de la SEQ ID NO: 1 o 39, y en donde la trampa de GDF inhibe la señalización por activina, miostatina y/o GDF 11 en un ensayo basado en células. La trampa de GDF anterior, en donde la proteína de trampa de GDF comprende R o K en la posición correspondiente a la posición 64 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La trampa de GDF anterior (en donde, como se explica anteriormente, la proteína ActRIIB comprende D o E en la posición correspondiente a posición 79 de la SEQ ID NO: 1 o 39), en donde la trampa de GDF inhibe la señalización por activina, miostatina y/o GDF 11 en un ensayo basado en células. La trampa de GDF anterior, en donde al menos una alteración con respecto a la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o 39 es una alteración conservadora posicionada dentro del bolsillo de unión al ligando. La trampa de GDF anterior, en donde al menos una alteración con respecto a la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o 39 es una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en K74, R40, Q53, K55 y F82. La trampa de GDF anterior, en donde la proteína es una proteína de fusión que comprende además una porción heteróloga. Cualquiera de las proteínas de fusión de trampa de GDF anteriores se puede producir como un homodímero. Cualquiera de las proteínas de fusión de trampa de GDF anteriores puede tener una porción heteróloga que comprende una región constante de una cadena pesada de IgG, tal como un dominio Fc.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de trampa de GDF. Un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia codificante para un polipéptido de trampa de GDF soluble, tal como se describió anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia que codifica una trampa de GDF que comprende un dominio extracelular (por ejemplo, dominio de unión a ligando) de un polipéptido ActRIIB que tiene una o más variaciones de secuencia y una secuencia que codificaría parte o la totalidad de dominio transmembrana y/o el dominio citoplásmico de un polipéptido ActRIIB, pero un codón de parada posicionado dentro del dominio transmembrana o el dominio citoplásmico, o posicionado entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana o dominio citoplásmico. Por ejemplo, un polinucleótido aislado que codifica una trampa de GDF puede comprender una secuencia de polinucleótido ActRIIB de longitud completa tal como la SEQ ID NO: 4 que tenga una o más variaciones, o una versión parcialmente truncada, comprendiendo además dicho polinucleótido aislado un codón de terminación de la transcripción al menos seiscientos nucleótidos antes del término 3' o, de otra manera, posicionados de tal manera que la traducción del polinucleótido dé lugar a un dominio extracelular opcionalmente fusionado a una porción truncada de un ActRIIB de longitud completa. Los ácidos nucleicos divulgados en el presente documento pueden estar operativamente unidos a un promotor para la expresión, y la divulgación proporciona células transformadas con tales polinucleótidos recombinantes. Preferentemente, la célula es una célula de mamífero tal como una célula CHO.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona métodos para fabricar un polipéptido de trampa de GDF. Tal método puede incluir la expresión de cualquiera de los ácidos nucleicos (por ejemplo, SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o 31) divulgados en el presente documento en una célula adecuada, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO). Tal método puede comprender: a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido de trampa de GDF, en donde dicha célula se transforma con una construcción de expresión de trampa de GDF; y b) recuperar el polipéptido de trampa de GDF así expresado. Los polipéptidos de trampa de GDF se pueden recuperar como fracciones en bruto, parcialmente purificadas o altamente purificadas usando cualquiera de las técnicas bien conocidas para obtener proteínas de cultivos celulares.

Como se explica anteriormente, la invención se refiere a un polipéptido para su uso en un método de tratamiento de la anemia en un sujeto que lo necesite, como se define adicionalmente más arriba en el presente documento y en las reivindicaciones. En particular, un polipéptido de trampa de GDF divulgado en el presente documento puede usarse en un método para favorecer la producción de glóbulos rojos o aumentar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto. Por consiguiente, la divulgación proporciona un polipéptido de trampa de GDF (como se define anteriormente en el presente documento y en las reivindicaciones) para su uso en el tratamiento de un trastorno asociado con recuentos bajos de glóbulos rojos o niveles bajos de hemoglobina, que es una anemia, en pacientes que lo necesiten. Esto puede comprender administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un polipéptido de trampa de GDF.

En parte, la divulgación demuestra que los polipéptidos de trampa de GDF pueden usarse para aumentar los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina. Los polipéptidos de trampa de GDF también se pueden usar para tratar o prevenir otros usos terapéuticos, tales como propiciar el crecimiento muscular (no reivindicado). En ciertos casos, cuando se administra un polipéptido de trampa de GDF para propiciar el crecimiento muscular, puede ser conveniente controlar los efectos sobre los glóbulos rojos durante la administración del polipéptido de trampa de GDF, o determinar o ajustar la dosificación del polipéptido de trampa de GDF, para reducir los efectos no deseados sobre los glóbulos rojos. Por ejemplo, los aumentos en los niveles de glóbulos rojos, los niveles de hemoglobina o los niveles de hematocrito pueden provocar aumentos en la presión arterial.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una alineación de los dominios extracelulares de ActRIIA humano (SEQ ID NO: 15) y ActRIIB humano (SEQ ID NO: 2) con los residuos que se deducen en el presente documento, basándose en el análisis compuesto de múltiples estructuras cristalinas de ActRIIB y ActRIIA que contactan directamente con el ligando (el bolsillo de unión al ligando) indicado con recuadros.

La Figura 2 muestra una alineación de secuencia múltiple de diversas proteínas ActRIIB de vertebrados y ActRIIA humana (las SEQ ID NO: 16-23).

La Figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos completa para la trampa de GDF ActRIIB (L79D 20-134)-hFc (SEQ ID NO: 11), incluida la secuencia líder de TPA (doble subrayado), el dominio extracelular de ActRIIB (residuos 20-134 en la SEQ ID NO: 1; subrayado) y el dominio hFc. El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia nativa está doblemente subrayado y resaltado, al igual que la glicina revelada por secuenciación como el residuo aminoterminal en la proteína de fusión madura.

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

La Figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos completa para la trampa de GDF ActRIIB(L79D 25-131) truncado -hFc (SEQ ID NO: 26), que incluye la líder de TPA (doble subrayado), dominio extracelular de ActRIIB truncado (residuos 25-131 en la SEQ ID NO: 1; subrayado) y el dominio hFc. El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia nativa está doblemente subrayado y resaltado, al igual que el glutamato revelado por secuenciación como el residuo aminoterminal en la proteína de fusión madura.

La Figura 6 muestra una secuencia de nucleótidos que codifica ActRIIB(L79D 25-131)-hFc. La SEQ ID NO: 27 corresponde a la cadena de sentido y la SEQ ID NO: 34 corresponde a la cadena de antisentido. El líder de TPA (nucleótidos 1-66) está doblemente subrayado y el dominio extracelular de ActRIIB truncado (nucleótidos 76-396) está subrayado. También se muestra la secuencia de aminoácidos para el dominio extracelular de ActRIIB (residuos 25-131 en la SEQ ID NO: 1).

La Figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos para la trampa de GDF ActRIIB(L79D 25-131)-hFc truncado sin un líder (SEQ ID NO: 28). El dominio extracelular de ActRIIB truncado (residuos 25-131 en la SEQ ID NO: 1) está subrayado. El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia nativa está doblemente subrayado y resaltado, al igual que el glutamato revelado por secuenciación como el residuo aminoterminal en la proteína de fusión madura.

La Figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos para la trampa de GDF ActRIIB truncado (L79D 25-131) sin la líder, el dominio hFc y el conector (SEQ ID NO: 29). El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia nativa está subrayado y resaltado, al igual que el glutamato revelado por secuenciación como el residuo aminoterminal en la proteína de fusión madura.

La Figura 9 muestra una secuencia de nucleótidos alternativa que codifica ActRIIB(L79D 25-131)-hFc. La SEQ ID NO: 30 corresponde a la cadena de sentido y la SEQ ID NO: 35 corresponde a la cadena de antisentido. El líder de TPA (nucleótidos 1-66) está doblemente subrayado, el dominio extracelular de ActRIIB truncado (nucleótidos 76-396) está subrayado y las sustituciones en la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre del dominio extracelular están doblemente subrayadas y resaltadas (compárese con la SEQ ID NO: 27, Figura 6). También se muestra la secuencia de aminoácidos para el dominio extracelular de ActRIIB (residuos 25-131 en la SEQ ID NO: 1).

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

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

La Figura 12 muestra el efecto de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc en los niveles de glóbulos rojos (GR) en un modelo de ratón con nefrectomía unilateral (NEPHX, del inglés *unilaterally nephrectomized*) de enfermedad renal crónica. Los datos son medias \pm ETM. ***, P <0,001 frente a valor inicial. Esta trampa de GDF revirtió la anemia inducida por nefrectomía observada en ratones control.

La Figura 13 muestra el efecto de ActRIIB(L79D 25-131)-hFc sobre los niveles de glóbulos rojos (GR), hemoglobina (HGB) y hematocrito (HCT) en un modelo de ratón de nefrectomía unilateral (NEPHX) de enfermedad renal crónica. Los datos son cambios medios desde el valor inicial durante 4 semanas (\pm ETM). *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ frente a controles NEPHX. Esta trampa de GDF evitó el descenso asociado a la nefrectomía en estos parámetros eritrocíticos, aumentando cada uno en una magnitud similar a la de los ratones con riñón intacto (simulado).

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

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

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

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

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

Descripción detallada de la invención

1. Información general

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) contiene una diversidad de factores de crecimiento que comparten elementos de secuencia y motivos estructurales comunes. Se sabe que estas proteínas ejercen efectos biológicos en una gran diversidad de tipos celulares tanto en vertebrados como en invertebrados. Los miembros de la superfamilia realizan funciones importantes durante el desarrollo embrionario en la formación de patrones y la especificación de tejidos y pueden influir en una diversidad de procesos de diferenciación, que incluyen adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, cardiogénesis, hematopoyesis, neurogénesis y diferenciación de células epiteliales. La familia se divide en dos ramas generales: las ramas BMP/GDF y TGF-beta/Activin/BMP10, cuyos miembros tienen efectos diversos, con frecuencia complementarios. Al manipular la actividad de un miembro de la familia TGF-beta, con frecuencia es posible provocar cambios fisiológicos significativos en un organismo. Por ejemplo, las razas de ganado piomontés y azul belga portan una mutación de pérdida de función en el gen de GDF8 (también llamada miostatina) que provoca un marcado aumento en la masa muscular. Grobet *et al.*, Nat Genet. 1997, 17(1): 71-4. Además, en seres humanos, los alelos inactivos de GDF8 están asociados con un aumento de la masa muscular y, según se informa, una fuerza excepcional. Schuelke *et al.*, N Engl J Med 2004, 350: 2682-8.

Las señales de TGF- β están mediadas por complejos heteroméricos de receptores de serina/treonina cinasa tipo I y tipo II, que fosforilan y activan las proteínas Smad aguas abajo a la estimulación del ligando (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1: 169-178). Estos receptores tipo I y tipo II son proteínas transmembrana, compuestas por un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico con especificidad de serina/treonina predicha. Los receptores tipo I son esenciales para la señalización. Se requieren receptores tipo II para unir ligandos y para la expresión de receptores tipo I. Los receptores de activina tipo I y II forman un complejo estable después de la unión del ligando, lo que resulta en la fosforilación de los receptores tipo I por los receptores tipo II.

Se han identificado dos receptores Tipo II relacionados (ActRII), ActRIIA y ActRIIB, como los receptores 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- β , incluidas 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 primario de tipo I para las activinas, particularmente para la activina A, y ALK-7 también puede servir como un receptor para las activinas, particularmente para la activina B. En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a antagonizar un ligando de receptores ActRIIB (también denominado un ligando ActRIIB) con un polipéptido de trampa de GDF en cuestión. Los ligandos de ejemplo de los receptores ActRIIB incluyen algunos

miembros de la familia TGF- β , tal como activina, Nodal, GDF8, GDF11 y BMP7.

Las activinas son factores de crecimiento de polipéptidos diméricos que pertenecen a la superfamilia TGF-beta. Hay tres formas principales de activina (A, B y AB) que son homo/heterodímeros de dos subunidades β estrechamente relacionadas ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$ y $\beta_A\beta_B$, respectivamente). El genoma humano también codifica una activina C y una activina E, que se expresan principalmente en el hígado, y también se conocen formas heterodiméricas que contienen β_C o β_E . En la superfamilia TGF-beta, las activinas son factores exclusivos y multifuncionales que pueden estimular la producción de hormonas en las células ováricas y placentarias, apoyar la supervivencia de las células neuronales, influir en el progreso del ciclo celular de manera positiva o negativa dependiendo del tipo de célula e inducir la diferenciación mesodérmica al menos en embriones de anfibios. (DePaolo *et al.*, 1991, Proc Soc Ep Biol Med. 198: 500-512; Dyson *et al.*, 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963). Además, se encontró que el factor de diferenciación eritroide (FED) aislado de las células leucémicas monocíticas humanas estimuladas era idéntico a la activina A (Murata *et al.*, 1988, PNAS, 85:2434). Se ha sugerido que la activina A propicia la eritropoyesis en la médula ósea. En varios tejidos, la señalización de activina es antagonizada por su heterodímero relacionado, la inhibina. Por ejemplo, durante la liberación de la hormona foliculoestimulante (FSH) de la hipófisis, la activina propicia la secreción y síntesis de FSH, mientras que la inhibina previene la secreción y síntesis de FSH. Otras proteínas que pueden regular la bioactividad de la activina y/o unirse a la activina incluyen la follistatina (FS), la proteína relacionada con la follistatina (FSRP) y la macroglobulina α_2 .

Las proteínas Nodal tienen funciones en la inducción y formación de mesodermo y endodermo, así como la posterior organización de estructuras axiales tales como corazón y estómago en la embriogénesis temprana. Se ha demostrado que el tejido dorsal en un embrión de vertebrado en desarrollo contribuye predominantemente a las estructuras axiales de la placa notocordial y precordial mientras recluta las células circundantes para formar estructuras embrionarias no axiales. Nodal parece señalar a través de receptores tipo I y tipo II y efectores intracelulares conocidos como proteínas Smad. Estudios recientes apoyan la idea de que ActRIIA y ActRIIB sirven como receptores de tipo II para Nodal (Sakuma *et al.*, Genes Cells. 2002, 7: 401-12). Se sugiere que los ligandos Nodal interactúan con sus cofactores (por ejemplo, cripto) para activar los receptores de activina tipo I y tipo II, que fosforilan Smad2. Las proteínas Nodal están implicadas en muchos eventos críticos para el embrión temprano de vertebrados, incluida la formación de mesodermo, el patrón anterior y la especificación del eje izquierdo-derecho. La evidencia experimental ha demostrado que la señalización de Nodal activa pAR3-Lux, un indicador de luciferasa que previamente se demostró que responde específicamente a activina y TGF-beta. Sin embargo, Nodal no puede inducir pTlx2-Lux, un indicador con capacidad de respuesta específicamente a las proteínas morfogenéticas óseas. Los resultados recientes proporcionan evidencia bioquímica directa de que la señalización de Nodal está mediada por la vía de Smads, Smad2 y Smad3 de activina-TGF-beta. La evidencia adicional ha demostrado que la proteína cripto extracelular es necesaria para la señalización de Nodal, lo que la diferencia de la señalización de activina o TGF-beta.

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

El factor de crecimiento y diferenciación-11 (GDF11), también conocido como BMP11, es una proteína secretada (McPherron *et al.*, 1999, Nat. Genet. 22: 260-264). GDF11 se expresa en la yema de la cola, la yema de la extremidad, los arcos maxilar y mandibular y los ganglios de la raíz dorsal durante el desarrollo del ratón (Nakashima *et al.*, 1999, Mech. Dev. 80: 185-189). GDF11 desempeña un papel único en el diseño de tejidos tanto mesodérmicos como neuronales (Gamer *et al.*, 1999, Dev Biol., 208:222-32). Se demostró que GDF11 es un regulador negativo de la condrogénesis y la miogénesis en el desarrollo de extremidades del pollo (Gamer *et al.*, 2001, Dev Biol. 229:407-20). La expresión de GDF 11 en el músculo también sugiere su papel en la regulación del crecimiento muscular de manera similar a GDF8. Además, la expresión de GDF11 en el cerebro sugiere que GDF11 también puede poseer actividades relacionadas con la función del sistema nervioso. Curiosamente, se descubrió que GDF11 inhibe la neurogénesis en el epitelio olfativo (Wu *et al.*, 2003, Neuron. 37:197-207). Por lo tanto, GDF11 puede tener aplicaciones *in vitro* e *in vivo* en el tratamiento de enfermedades tales como enfermedades musculares y enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica).

La proteína morfogenética ósea 7 (BMP7), también llamada proteína osteogénica-1 (OP-1), es bien conocida por inducir la formación de cartílago y hueso. Además, BMP7 regula una amplia gama de procesos fisiológicos. Por ejemplo, BMP7 puede ser el factor osteoinductivo responsable del fenómeno de la osteogénesis epitelial. También se descubrió que BMP7 desempeña un papel en la regulación del calcio y la homeostasis ósea. Al igual que la activina, BMP7 se une a los receptores Tipo II, ActRIIA y ActRIIB. Sin embargo, BMP7 y activina reclutan distintos receptores Tipo I en complejos de receptores heteroméricos. El principal receptor BMP7 Tipo I observado fue ALK2, mientras que la activina se unió exclusivamente a ALK4 (ActRIIB). BMP7 y activina suscitaron distintas respuestas biológicas y activaron diferentes vías de Smad (Macias-Silva *et al.*, 1998, J Biol Chem. 273:25628-36).

Como se demuestra en el presente documento, un polipéptido de trampa de GDF, que es un polipéptido ActRIIB variante (ActRIIB), es más eficaz para aumentar los niveles de glóbulos rojos *in vivo* en comparación con un polipéptido ActRIIB soluble de tipo silvestre y tiene efectos beneficiosos en una diversidad de modelos para anemias. Cabe señalar que la hematopoyesis es un proceso complejo, regulado por una diversidad de factores, que incluyen la eritropoyetina, el G-CSF y la homeostasis del hierro. Las expresiones "aumentar los niveles de glóbulos rojos" y "propiciar la formación de glóbulos rojos" se refieren a parámetros clínicamente observables, tales como hematocrito, recuentos de glóbulos rojos y mediciones de hemoglobina, y están destinadas a ser neutrales en cuanto al mecanismo por el cual se producen dichos cambios.

Además de estimular los niveles de glóbulos rojos, los polipéptidos de trampa de GDF son útiles para una diversidad de aplicaciones terapéuticas, que incluyen, por ejemplo, propiciar el crecimiento muscular (véanse las publicaciones PCT N.º WO 2006/012627 y WO 2008/097541). En ciertos casos, cuando se administra un polipéptido de trampa de GDF con el fin de aumentar el músculo, puede ser conveniente reducir o minimizar los efectos sobre los glóbulos rojos. Al controlar diversos parámetros hematológicos en pacientes tratados o que son candidatos para el tratamiento con un polipéptido de trampa de GDF, se puede determinar la dosificación adecuada (incluidas las cantidades y la frecuencia de administración) en función de las necesidades de un paciente individual, los parámetros hematológicos iniciales y el propósito del tratamiento. Además, el progreso terapéutico y los efectos sobre uno o más parámetros hematológicos a lo largo del tiempo pueden ser útiles para controlar a los pacientes que reciben una dosis de un polipéptido de trampa de GDF, facilitando la atención al paciente, determinando la dosificación de mantenimiento adecuada (cantidades y frecuencia), etc.

Los términos usados en la presente memoria descriptiva generalmente tienen sus significados habituales en la técnica, dentro del contexto de la presente invención y en el contexto específico donde se usa cada término. Ciertos términos se discuten a continuación o en otra parte de la memoria descriptiva, para proporcionar una guía adicional al profesional en la descripción de las composiciones/polipéptidos para su uso de la invención y cómo fabricarlos y usarlos. El alcance o significado de cualquier uso de un término será evidente a partir del contexto específico en donde se usa el término.

"Alrededor de" y "aproximadamente" generalmente significarán un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las mediciones. Típicamente, los grados de error de ejemplo están dentro del 20 por ciento (%), preferentemente dentro del 10 % y más preferentemente dentro del 5 % de un valor o intervalo de valores dado.

Como alternativa, y particularmente en sistemas biológicos, las expresiones "alrededor de" y "aproximadamente" pueden significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferentemente dentro de 5 veces y más preferentemente dentro de 2 veces de un valor dado. Las cantidades numéricas dadas en el presente documento son aproximadas, a menos que se indique lo contrario, lo que significa que la expresión "alrededor de" o el término "aproximadamente" puede inferirse cuando no se indica expresamente.

Los métodos de la invención pueden incluir etapas de comparación de secuencias entre sí, incluida la secuencia de tipo silvestre con una o más mutantes (variantes de secuencia). Dichas comparaciones comprenden típicamente alineaciones de secuencias de polímeros, por ejemplo, usando programas de alineación de secuencias y/o algoritmos que son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, BLAST, FASTA y MEGALIGN, por nombrar algunos). El experto en la materia puede apreciar fácilmente que, en tales alineamientos, cuando una mutación contiene una inserción o eliminación de residuos, la alineación de secuencia introducirá un "espacio" (típicamente representado por un guion o "A") en la secuencia de polímero que no contiene el residuo insertado o eliminado.

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

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

Sin embargo, en el uso común y en la presente memoria descriptiva, el término "homólogo", cuando se modifica con un adverbio tal como "altamente", puede referirse a la similitud de secuencia y puede o no estar relacionado con un origen evolutivo común.

2. Polipéptidos de trampa de GDF

En ciertos aspectos, la invención se refiere a polipéptidos de trampa de GDF, por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB variantes solubles, que incluyen, por ejemplo, fragmentos, variantes funcionales y formas modificadas de polipéptidos de ActRIIB, como se define adicionalmente más arriba en el presente documento y en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, los polipéptidos de trampa de GDF tienen al menos una actividad biológica similar o igual que un polipéptido ActRIIB de tipo silvestre correspondiente. Por ejemplo, un polipéptido de trampa de GDF de la invención puede unirse e inhibir la función de un ligando de ActRIIB (por ejemplo, activina A, activina AB, activina B, Nodal, GDF8, GDF11 o BMP7). Opcionalmente, un polipéptido de trampa de GDF aumenta los niveles de glóbulos rojos. Los ejemplos de polipéptidos de trampa de GDF incluyen polipéptidos precursores de ActRIIB humanos (SEQ ID NO: 1 o 39) que tienen una o más variaciones de secuencia, y polipéptidos solubles de ActRIIB humanos (por ejemplo, las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 y 41) que tienen una o más variaciones de secuencia, en donde dichos polipéptidos precursores de ActRIIB y dichos polipéptidos ActRIIB comprenden un ácido glutámico o un ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1. Una trampa de GDF se refiere a un polipéptido ActRIIB que tiene una afinidad disminuida por la activina en relación con otros ligandos de ActRIIB, que incluyen, por ejemplo, GDF11 y/o miostatina.

Como se usa en el presente documento, el término "ActRIIB" se refiere a una familia de proteínas del receptor de activina tipo IIb (ActRIIB) de cualquier especie y variantes obtenidas de dichas proteínas ActRIIB por mutagénesis u otra modificación. La referencia a ActRIIB en el presente documento se entiende como una referencia a una cualquiera de las formas identificadas actualmente. Los miembros de la familia ActRIIB son generalmente proteínas transmembrana, compuestas de un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico con actividad de serina/treonina cinasa predicha. Las secuencias de aminoácidos del dominio extracelular soluble en ActRIIA humano (proporcionado para comparación) y el dominio extracelular soluble en ActRIIB se ilustran en la Figura 1.

La expresión "polipéptido ActRIIB" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de origen natural de un miembro de la familia ActRIIB, así como cualquier variante del mismo (incluidos mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que retienen una actividad útil. Véase, por ejemplo, el documento WO 2006/012627. Por ejemplo, los polipéptidos ActRIIB incluyen polipéptidos procedentes de la secuencia de cualquier ActRIIB conocido que tenga una secuencia al menos aproximadamente el 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido ActRIIB, y opcionalmente al menos el 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o mayor identidad. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB puede unirse a e inhibir la función de una proteína ActRIIB y/o activina. Un polipéptido ActRIIB que es una trampa de GDF puede seleccionarse por la actividad para propiciar la formación de glóbulos rojos *in vivo*. Los ejemplos de polipéptidos ActRIIB incluyen un polipéptido precursor ActRIIB humano (SEQ ID NO: 1 y 39) y polipéptidos ActRIIB humanos solubles (por ejemplo, SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 y 41). La numeración de los aminoácidos para todos los polipéptidos relacionados con ActRIIB descritos en el presente documento se basa en la numeración de la SEQ ID NO: 1, a menos que se indique específicamente lo contrario.

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

MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAE TRECIYYNANWELERTNQSGLERC
EGEQDKRLHCYASWRN⁷⁹SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ
VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEV TYEPPPTAPTLLTVLAYSLLPIG
GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPPSPLVGLKPLQLLEIK
ARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLL
QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGKNIITWNELCHVAETM
SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLA
VRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQORDAFLRIDMYAMGLV
LWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVHHKMRPTIK
DHWLKHPLGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS
DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEQ ID NO: 1)

El péptido señal está subrayado individualmente; el dominio extracelular está en negrita y los sitios potenciales de glucosilación unidos a N están en recuadros.

- 5 Una forma con una alanina en la posición 64 también se informa en la bibliografía, como sigue:

MTAPWVALALLWGSLWPGS**GRGEAETRECIYYNANWELERTN**QSGLERC
EGEQDKRLHCYASWAN**SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ**
VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLP**IG**
GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPPSPLVGLKPLQLLEIK
ARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLL
QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGNIITWNELCHVAETM
SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLA
VRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLV
LWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIK
DHWLKHPLGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS
DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEQ ID NO: 39)

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

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLH**CYASWRN**SSG
TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
EAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 2)

La forma alternativa con un A64 es la siguiente:

- 15 **GRGEAETRECIYYNANWELERTN**QSGLERCEGEQDKRLH**CYASWAN**SSG
TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
EAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 40)

- 20 En algunas condiciones, la proteína puede producirse con una secuencia "SGR ..." en el extremo aminoterminal. La "cola" carboxiterminal del dominio extracelular está subrayada. La secuencia con la "cola" eliminada (una secuencia Δ15) es la siguiente:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLH**CYASWRN**SSG
TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
EA (SEQ ID NO: 3)

- 25 La forma alternativa con un A64 es la siguiente:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG
 TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
 EA (SEQ ID NO: 41)

- 5 En algunas condiciones, la proteína puede producirse con una secuencia "SGR ..." en el extremo aminoterminal. La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína precursora de ActRIIB humana es la siguiente: (nucleótidos 5-1543 de la entrada de Genbank NM_001106) (la secuencia que se muestra proporciona una alanina en la posición 64, y puede modificarse para proporcionar en su lugar una arginina)

ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGGC
 CCGGCTCTGGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAA
 CGCCAACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGC
 GAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACA
 GCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTT
 CAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAG
 GTGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTC
 ATTTGCCAGAGGCTGGGGGCCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGAC
 AGCCCCCACCCTGCTCACGGTGCTGGCCTACTCACTGCTGCCCATCGGG
 GGCTTTCCCTCATCGTCCTGCTGGCCTTTTGGATGTACCGGCATCGCA
 AGCCCCCCTACGGTCATGTGGACATCCATGAGGACCCTGGGCCTCCACC
 ACCATCCCCTCTGGTGGGCCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAAG
 GCTCGGGGGCGCTTTGGCTGTGTCTGGAAGGCCAGCTCATGAATGACT
 TTGTAGCTGTCAAGATCTTCCCACTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAG
 TGAACGGGAGATCTTCAGCACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCTGCTA
 CAGTTCATTGCTGCCGAGAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAGCTGT
 GGCTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCCTCACGGATTACCTCAA
 GGGGAACATCATCACATGGAACGAACTGTGTCATGTAGCAGAGACGATG
 TCACGAGGCCTCTCATACCTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGCCGTGGCG
 AGGGCCACAAGCCGTCTATTGCCCCACAGGGACTTTAAAAGTAAGAATGT
 ATTGCTGAAGAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCTGACTTTGGCTTGGCT
 GTTCGATTTGAGCCAGGGAAACCTCCAGGGGACACCCACGGACAGGTAG
 GCACGAGACGGTACATGGCTCCTGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTT
 CCAGAGAGATGCCCTTCTGCGCATTGACATGTATGCCATGGGGTTGGTG
 CTGTGGGAGCTTGTGTCTCGCTGCAAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATG
 AGTACATGCTGCCCTTTGAGGAAGAGATTGGCCAGCACCCCTTCGTTGGA
 GGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTGCACAAGAAGATGAGGCCCACCATTA
 GATCACTGGTTGAAACACCCGGGCCTGGCCCAGCTTGTGTGACCATCG
 AGGAGTGCTGGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTGTCCGCGGGCTGTGT

GGAGGAGCGGGTGTCCCTGATTCGGAGGTGGTCAACGGCACTACCTCG
 GACTGTCTCGTTTCCCTGGTGACCTCTGTACCAATGTGGACCTGCCCC
 CTAAAGAGTCAAGCATCTAA (SEQ ID NO: 4)

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

GGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCAACT
 GGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGGCGA
 GCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACAGCTCTGGC
 ACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACTGCT
 ACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTACTT
 CTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTGCCA
 GAGGCTGGGGGCCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCGACAGCCCCCA
 CC (SEQ ID NO: 5)

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

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

Attisano *et al.* (Cell. 10 de enero de 1992; 68(1):97-108) demostró que una eliminación del nudo de prolina en el extremo C del dominio extracelular de ActRIIB redujo la afinidad del receptor por la activina. Una proteína de fusión ActRIIB-Fc que contiene los aminoácidos 20-119 de la SEQ ID NO: 1, "ActRIIB(20-119)-Fc", ha reducido la unión a GDF-11 y activina en relación con una ActRIIB(20-134)-Fc, que incluye la región del nudo prolina y el dominio yuxtamembrana completo. Sin embargo, una proteína ActRIIB(20-129)-Fc retiene una actividad similar pero algo reducida en relación con el tipo silvestre, a pesar de que la región del nudo prolina está alterada. Por lo tanto, se espera que los dominios extracelulares de ActRIIB que se detienen en el aminoácido 134, 133, 132, 131, 130 y 129 estén activos, pero las construcciones que se detienen en 134 o 133 pueden ser más activas. De manera similar, no se espera que las mutaciones en ninguno de los residuos 129-134 alteren la afinidad de unión al ligando por márgenes grandes. En apoyo de esto, las mutaciones de P129 y P130 no disminuyen sustancialmente la unión al ligando. Por lo tanto, un polipéptido de trampa de GDF que es una proteína de fusión ActRIIB-Fc puede terminar tan pronto como el aminoácido 109 (la cisteína final), sin embargo, se espera que las formas que terminan en o entre 109 y 119 tengan una unión al ligando reducida. El aminoácido 119 está poco conservado y, por tanto, se altera o trunca fácilmente. Las formas que terminan en 128 o posterior retienen la actividad de unión al ligando. Las formas que terminan en o entre 119 y 127 tendrán una capacidad de unión intermedia. Cualquiera de estas formas puede ser conveniente de usar, dependiendo del entorno clínico o experimental.

En el extremo aminoterminal de ActRIIB, se espera que una proteína que comienza en el aminoácido 29 o antes retenga la actividad de unión al ligando. El aminoácido 29 representa la cisteína inicial. Una mutación de alanina a asparagina en la posición 24 introduce una secuencia de glucosilación ligada a N sin afectar sustancialmente la unión al ligando. Esto confirma que las mutaciones en la región entre el péptido de escisión de señal y la región

reticulada de cisteína, correspondiente a los aminoácidos 20-29, se toleran bien. En particular, las construcciones que comienzan en las posiciones 20, 21, 22, 23 y 24 retendrán actividad, y también se espera que las construcciones que comiencen en las posiciones 25, 26, 27, 28 y 29 retengan actividad. Los datos mostrados en los Ejemplos demuestran que, sorprendentemente, una construcción que comienza en 22, 23, 24 o 25 tendrá la mayor actividad.

En conjunto, una porción activa de ActRIIB comprende los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1, y las construcciones de trampa de GDF pueden, por ejemplo, comprender una porción de ActRIIB que comienza en un residuo correspondiente a los aminoácidos 20-29 de la SEQ ID NO: 1 o 39 y termina en una posición correspondiente a los aminoácidos 109-134 de la SEQ ID NO: 1 o 39. Otros ejemplos incluyen construcciones que comienzan en una posición de 20-29 o 21-29 y terminan en una posición de 119-134, 119-133, 129-134 o 129-133 de la SEQ ID NO: 1 o 39. Otros ejemplos incluyen construcciones que comienzan en una posición de 20-24 (o 21-24, o 22-25) y termina en una posición de 109-134 (o 109-133), 119-134 (o 119-133) o 129-134 (o 129-133) de la SEQ ID NO: 1 o 39. También se contemplan variantes dentro de estos intervalos también, particularmente aquellos que tienen al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad con la porción correspondiente de la SEQ ID NO: 1 o 39; como se explica anteriormente, los polipéptidos de acuerdo con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1, y comprenden un ácido glutámico o un ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, el polipéptido de trampa de GDF comprende, consiste esencialmente en o consiste en, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticos a los residuos de aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 1 o 39. En ciertas realizaciones, la trampa de GDF el polipéptido comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que sea al menos el 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico a las SEQ ID NO: 7, 26, 28, 29, 32, 37 o 38. En realizaciones preferidas, el polipéptido de trampa de GDF consiste en o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, 26, 28, 29, 32, 37 o 38. Como se explica anteriormente, los polipéptidos de acuerdo con la invención comprenden un ácido glutámico o un ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1.

La divulgación incluye los resultados de un análisis de estructuras de ActRIIB compuestas, mostrados en la Figura 1, que demuestran que el bolsillo de unión al ligando está definido por los residuos Y31, N33, N35, L38 a T41, E47, E50, Q53 a K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 a N83, Y85, R87, A92 y E94 a F101. En estas posiciones, se espera que se toleren mutaciones conservadoras, aunque una mutación K74A se tolera bien, al igual que R40A, K55A, F82A y mutaciones en la posición L79. R40 es una K en *Xenopus*, lo que indica que 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 una proteína de trampa de GDF es una que comprende los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1 o 39, pero opcionalmente comienza en una posición que varía de 20-24 o 22-25 y termina en una posición que varía de 129-134, y que comprende no más de 1, 2, 5, 10 o 15 cambios conservadores de aminoácidos en el bolsillo de unión al ligando, y cero, una o más alteraciones no conservadoras en las posiciones 40, 53, 55, 74, 79 y/u 82 en el bolsillo de unión al ligando (como se explica anteriormente, los polipéptidos de acuerdo con la invención comprenden un ácido glutámico o un ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1). Dicha proteína puede retener más del 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1 o 39. Los sitios fuera del bolsillo de unión, en los que la variabilidad puede ser particularmente bien tolerada, incluyen los extremos amino y carboxi del dominio extracelular (como se indicó anteriormente), y las posiciones 42-46 y 65-73. Una alteración de asparagina a alanina en la posición 65 (N65A) en realidad mejora la unión al ligando en el fondo A64, y por tanto se espera que no tenga un efecto perjudicial sobre la unión al ligando en el fondo R64. Este cambio probablemente elimina la glucosilación en N65 en el fondo A64, lo que demuestra que es probable que se tolere un cambio significativo en esta región. Mientras que un cambio de R64A se tolera mal, R64K se tolera bien y, por tanto, se puede tolerar otro residuo básico, tal como H, en la posición 64.

ActRIIB está bien conservado en casi todos los vertebrados, con grandes extensiones del dominio extracelular conservadas por completo. Muchos de los ligandos que se unen a ActRIIB también están altamente conservados. En consecuencia, las comparaciones de secuencias de ActRIIB de diversos organismos vertebrados proporcionan información sobre los residuos que pueden alterarse. Por lo tanto, un polipéptido ActRIIB variante humano activo útil como una trampa de GDF puede incluir uno o más aminoácidos en las posiciones correspondientes de la secuencia de ActRIIB de otro vertebrado, o puede incluir un residuo que es similar al de la secuencia humana o de otro vertebrado. Los siguientes ejemplos ilustran este enfoque para definir una variante activa de ActRIIB. L46 es una valina en ActRIIB de *Xenopus*, por lo que esta posición puede alterarse y, opcionalmente, puede alterarse a otro residuo hidrófobo, tal como V, I o F, o un residuo no polar tal como A. E52 es una K en *Xenopus*, lo que indica que este sitio puede tolerar una amplia diversidad de cambios, incluidos los residuos polares, tales como E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y y probablemente A. T93 es una K en *Xenopus*, lo que indica que se tolera una amplia variación estructural en esta posición, favoreciendo los residuos polares, tales como S, K, R, E, D, H, G, P, G e Y. F108 es

una Y en *Xenopus*, y por lo tanto Y u otro grupo hidrófobo, tal como I, V o L deben ser tolerados. E111 es K en *Xenopus*, lo que indica que los residuos cargados serán tolerados en esta posición, incluidos D, R, K y H, así como Q y N. R112 es K en *Xenopus*, lo que indica que los residuos básicos se toleran en esta posición, incluyendo R y H. A en la posición 119 está relativamente poco conservada, y aparece como P en roedores y V en *Xenopus*, por lo que esencialmente cualquier aminoácido debe ser tolerado en esta posición.

La divulgación demuestra que la adición de otro sitio de glucosilación unido a N (N-X-S/T) aumenta la semivida en suero de una proteína de fusión ActRIIB-Fc, en relación con la forma ActRIIB (R64)-Fc. Al introducir una asparagina en la posición 24 (construcción A24N), se crea una secuencia NXT que confiere una semivida más larga. Otras secuencias NX(T/S) se encuentran en 42-44 (NQS) y 65-67 (NSS), aunque esta última puede no estar glucosilada de manera eficaz con el R en la posición 64. Las secuencias N-X-S/T generalmente se pueden introducir en las posiciones fuera del bolsillo de unión al ligando definido en la Figura 1. 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. Las secuencias N-X-S/T también se pueden introducir en el conector entre la secuencia de ActRIIB y el Fc u otro componente de la fusión. Tal sitio puede introducirse con un esfuerzo mínimo introduciendo un N en la posición correcta con respecto a un S o T preexistente, o introduciendo un S o T en una posición correspondiente a un N preexistente. Por lo tanto, alteraciones convenientes que crearían un sitio de glucosilación unido a N son: A24N, R64N, S67N (posiblemente combinado con una alteración de N65A), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S y R112T. Cualquier S que se predice que está glucosilado puede alterarse a T sin crear un sitio inmunogénico, debido a la protección que proporciona la glucosilación. Del mismo modo, cualquier T que se predice que esté glucosilado puede alterarse a un S. Por lo tanto, se contemplan las alteraciones S67T y S44T. Asimismo, en una variante A24N, se puede usar una alteración S26T. Por consiguiente, una trampa de GDF puede ser una variante de ActRIIB que tiene una o más secuencias consenso de glucosilación unida a N no endógenas adicionales.

La posición L79 de ActRIIB puede alterarse para conferir propiedades de unión activina-miostatina (GDF-11) alteradas. L79A o L79P reduce la unión a GDF-11 en mayor medida que la unión a activina. L79E o L79D retiene la unión a GDF-11. Sorprendentemente, las variantes L79E y L79D han reducido en gran medida la unión a activina. Los experimentos *in vivo* indican que estos receptores que no son de activina retienen una capacidad significativa para aumentar los glóbulos rojos, pero muestran una disminución de los efectos en otros tejidos. Estos datos demuestran la conveniencia y viabilidad para obtener polipéptidos con efectos reducidos sobre la activina. Los polipéptidos de acuerdo con la invención comprenden un ácido glutámico o un ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1. Por tanto, en realizaciones ilustrativas, los usos descritos en el presente documento utilizan un polipéptido de trampa de GDF (en conformidad con las reivindicaciones) que es un polipéptido ActRIIB variante que comprende un aminoácido ácido que es D o E en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1 o 39, opcionalmente en combinación con una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos adicionales.

Las variaciones descritas se pueden combinar de diversas maneras. Adicionalmente, los resultados del programa de mutagénesis descrito en el presente documento indican que hay posiciones de aminoácidos en ActRIIB que con frecuencia es beneficioso conservar. Estos incluyen la posición 64 (aminoácido básico), la posición 80 (aminoácido ácido o hidrófobo), la posición 78 (hidrófobo y particularmente triptófano), la posición 37 (ácido y particularmente ácido aspártico o glutámico), la posición 56 (aminoácido básico), la posición 60 (aminoácido hidrófobo, particularmente fenilalanina o tirosina). Por lo tanto, en cada una de las variantes divulgadas en el presente documento, la divulgación proporciona un armazón de aminoácidos que pueden conservarse. Otras posiciones que puede ser conveniente conservar son las siguientes: posición 52 (aminoácido ácido), posición 55 (aminoácido básico), posición 81 (ácido), 98 (polar o cargado, particularmente E, D, R o K).

En ciertas realizaciones, los fragmentos aislados de polipéptidos ActRIIB se pueden obtener mediante la exploración de polipéptidos producidos de forma recombinante a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIB (por ejemplo, las SEQ ID NO: 4 y 5). Además, los fragmentos pueden sintetizarse químicamente usando técnicas conocidas en la técnica, tales como la química convencional en fase sólida de f-Moc o t-Boc de Merrifield. Los fragmentos pueden producirse (de forma recombinante o por síntesis química) y probarse para identificar aquellos fragmentos de peptidilo que pueden actuar, por ejemplo, como antagonistas (inhibidores) o agonistas (activadores) de una proteína ActRIIB o un ligando de ActRIIB.

En ciertas realizaciones, un polipéptido de trampa de GDF es un polipéptido ActRIIB variante que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 o 41. En ciertas realizaciones, la trampa de GDF comprende, consiste esencialmente en o consiste en, una secuencia de aminoácidos al menos el 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 o 41. En los polipéptidos de acuerdo con la invención la posición correspondiente a L79 de la SEQ ID NO: 1 es un aminoácido ácido que es un residuo de aminoácido D o E.

En ciertas realizaciones, la presente invención contempla fabricar variantes funcionales modificando la estructura de un polipéptido de trampa de GDF para propósitos tales como potenciar la eficacia terapéutica o la estabilidad (por ejemplo, vida útil *ex vivo* y la resistencia a la degradación proteolítica *in vivo*). Los polipéptidos de trampa de GDF

también se pueden producir mediante sustitución, eliminación o adición de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado (por ejemplo, mutaciones conservadoras) no tendrán un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Los reemplazos conservadores son aquellos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Se puede determinar fácilmente si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de trampa de GDF da como resultado una variante funcional evaluando la capacidad del polipéptido de trampa de GDF para producir una respuesta en las células en relación con el polipéptido de trampa de GDF no modificado o un polipéptido ActRIIB de tipo silvestre, o de unirse a uno o más ligandos, tales como activina, GDF-11 o miostatina en comparación con el polipéptido de trampa de GDF no modificado o un polipéptido ActRIIB de tipo silvestre.

En ciertas realizaciones específicas, la presente invención contempla realizar mutaciones en el dominio extracelular (también denominado dominio de unión a ligando) de un polipéptido ActRIIB de modo que el polipéptido ActRIIB tenga actividades de unión a ligando alteradas (por ejemplo, afinidad de unión o especificidad de unión). En ciertos casos, dichos polipéptidos de trampa de GDF tienen una afinidad de unión alterada (elevada o reducida) por un ligando específico. En otros casos, los polipéptidos de trampa de GDF tienen una especificidad de unión para los ligandos de ActRIIB alterada.

Por ejemplo, la divulgación proporciona polipéptidos de trampa de GDF que se unen preferentemente a GDF8/GDF11 en relación con las activinas. La divulgación establece además la conveniencia de tales polipéptidos para reducir los efectos inespecíficos, aunque tales variantes selectivas pueden ser menos convenientes para el tratamiento de enfermedades graves en las que se pueden necesitar ganancias muy grandes en los niveles de glóbulos rojos para un efecto terapéutico y donde algún nivel de efecto inespecífico es aceptable. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos de la proteína ActRIIB, tales como E39, K55, Y60, K74, W78, D80 y F101, están en el bolsillo de unión al ligando y participan en la unión a sus ligandos, tales como activina y GDF8. Por lo tanto, la presente invención proporciona una trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando alterado (por ejemplo, dominio de unión a GDF8) de un receptor ActRIIB, que comprende una o más mutaciones en esos residuos de aminoácidos. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado puede tener una selectividad aumentada para un ligando tal como GDF8 con respecto a un dominio de unión a ligando de tipo silvestre de un receptor ActRIIB. A modo de ilustración, estas mutaciones aumentan la selectividad del dominio de unión al ligando alterado para GDF8 sobre activina. Opcionalmente, el dominio de unión al ligando alterado tiene una proporción de K_d para la unión de activina a K_d para la unión a GDF8 que es al menos de 2, 5, 10 o incluso 100 veces mayor en relación con la relación para el dominio de unión al ligando de tipo silvestre. Opcionalmente, el dominio de unión al ligando alterado tiene una proporción de CI_{50} para inhibir la activina a CI_{50} para inhibir GDF8 que es al menos de 2, 5, 10 o incluso 100 veces mayor en relación con el dominio de unión a ligando de tipo silvestre. Opcionalmente, el dominio de unión al ligando alterado inhibe GDF8 con una CI_{50} al menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces menor que la CI_{50} para inhibir la activina.

Como un ejemplo específico, el residuo de aminoácido cargado positivamente Asp (D80) del dominio de unión a ligando de ActRIIB se puede mutar a un residuo de aminoácido diferente para producir un polipéptido de trampa de GDF que se une preferentemente a GDF8, pero no a activina. Preferentemente, el residuo D80 se cambia a un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: un residuo de aminoácido no cargado, un residuo de aminoácido negativo y un residuo de aminoácido hidrófobo. Como otro ejemplo específico, en los polipéptidos de acuerdo con la invención, el residuo hidrófobo L79 se altera a los aminoácidos ácidos ácido aspártico o ácido glutámico para reducir en gran medida la unión a activina al tiempo que se retiene la unión a GDF 11. Como reconocerá un experto en la materia, la mayoría de las mutaciones, variantes o modificaciones descritas pueden realizarse a nivel de ácido nucleico o, en algunos casos, mediante modificación postraducciona l o síntesis química. Dichas técnicas son bien conocidas en la técnica.

En ciertas realizaciones, la presente invención contempla polipéptidos de trampa de GDF que tienen mutaciones específicas en ActRIIB para alterar la glucosilación del polipéptido ActRIIB. Ejemplos de sitios de glucosilación en polipéptidos de trampa de GDF se ilustran en la Figura 1 (por ejemplo, los sitios subrayados NX(S/T)). Dichas mutaciones se pueden seleccionar para introducir o eliminar uno o más sitios de glucosilación, tales como sitios de glucosilación unidos a O u N. Los sitios de reconocimiento de glucosilación unida a asparagina generalmente comprenden una secuencia tripeptídica, asparagina-X-treonina (donde "X" es cualquier aminoácido) que reconocen específicamente las enzimas de glucosilación celulares apropiadas. La alteración también puede realizarse mediante la adición o sustitución por uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del polipéptido ActRIIB de tipo silvestre (para sitios de glucosilación unidos a O). Una diversidad de sustituciones o eliminaciones de aminoácidos en una o ambas de la primera o tercera posiciones de aminoácidos de un sitio de reconocimiento de glicosilación (y/o eliminación de aminoácidos en la segunda posición) da como resultado la no glucosilación en la secuencia tripeptídica modificada. Otro medio de aumentar el número de fracciones de carbohidratos en un polipéptido de trampa de GDF es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido de trampa de GDF. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el azúcar (o azúcares) pueden unirse a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína; (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina; (e) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o

(f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO 87/05330 y en Aplin y Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pág. 259-306. La eliminación de una o más fracciones de carbohidratos presentes en un polipéptido de trampa de GDF puede realizarse química y/o enzimáticamente. La desglucosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido de trampa de GDF al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o de todos los azúcares, excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras deja intacta la secuencia de aminoácidos. La desglucosilación química se describe adicionalmente por Hakimuddin *et al.* (1987) Arch. Biochem. Biophys 259:52 y por Edge *et al.* (1981) Anal. Biochem. 118:131. La escisión enzimática de fracciones de carbohidratos en los polipéptidos de trampa de GDF se puede lograr mediante el uso de una diversidad de endo- y exoglucosidasas como lo describen Thotakura *et al.* (1987) Meth. Enzymol 138:350. La secuencia de un polipéptido de trampa de GDF puede ajustarse, según corresponda, dependiendo del tipo de sistema de expresión utilizado, ya que las células de mamíferos, levaduras, insectos y vegetales pueden introducir diferentes patrones de glucosilación que pueden verse afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, los polipéptidos de trampa de GDF para su uso en seres humanos se expresarán en una línea celular de mamífero que proporciona una glucosilación adecuada, tal como las líneas celulares HEK293 o CHO, aunque también se espera que otras líneas celulares de expresión en mamíferos sean útiles.

La presente divulgación contempla además un método para generar variantes, particularmente conjuntos de variantes combinatorias de un polipéptido de trampa de GDF, que incluye, opcionalmente, variantes de truncamiento; los grupos de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificar secuencias de trampa de GDF. El propósito de explorar tales bibliotecas combinatorias puede ser generar, por ejemplo, variantes de polipéptidos de trampa de GDF que tengan propiedades alteradas, tales como farmacocinética alterada o unión al ligando alterada. A continuación, se proporciona una diversidad de ensayos de exploración, y dichos ensayos pueden usarse para evaluar variantes. Por ejemplo, una variante de polipéptido de trampa de GDF puede explorarse para determinar la capacidad de unirse a un polipéptido ActRIIB, de impedir la unión de un ligando de ActRIIB a un polipéptido ActRIIB o de interferir con la señalización provocada por un ligando de ActRIIB.

La actividad de un polipéptido de trampa de GDF o sus variantes también se puede probar en un ensayo basado en células o *in vivo*. Por ejemplo, se puede evaluar el efecto de una variante de polipéptido de trampa de GDF en la expresión de genes implicados en la hematopoyesis. Esto puede, según sea necesario, realizarse en presencia de una o más proteínas ligando de ActRIIB recombinantes (por ejemplo, activina), y las células pueden transfectarse para producir un polipéptido de trampa de GDF y/o variantes del mismo, y opcionalmente, un ligando de ActRIIB. Asimismo, un polipéptido de trampa de GDF puede administrarse a un ratón u otro animal, y pueden evaluarse utilizando métodos reconocidos en la técnica una o más mediciones de sangre, tales como un recuento de GR, niveles de hemoglobina, niveles de hematocrito, reservas de hierro o recuento de reticulocitos.

Se pueden generar variantes obtenidos combinatoriamente que tienen una potencia selectiva con respecto a un polipéptido de trampa de GDF de referencia. Dichas proteínas variantes, cuando se expresan a partir de construcciones de ADN recombinante, pueden usarse en protocolos de terapia génica. Asimismo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tienen semividas intracelulares dramáticamente diferentes que el polipéptido de trampa de GDF no modificado correspondiente. Por ejemplo, la proteína alterada puede volverse más estable o menos estable a la degradación proteolítica u otros procesos que dan como resultado la destrucción o la inactivación de un polipéptido de trampa de GDF no modificado. Dichas variantes, y los genes que las codifican, se pueden utilizar para alterar los niveles de polipéptido de trampa de GDF mediante la modulación de la semivida de los polipéptidos de trampa de GDF. Por ejemplo, una semivida corta puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y, cuando forma parte de un sistema de expresión inducible, puede permitir un control más estricto de los niveles del polipéptido de trampa de GDF recombinante dentro de la célula. En una proteína de fusión de Fc, se pueden hacer mutaciones en el conector (si lo hay) y/o la porción Fc para alterar la semivida de la proteína.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de trampa de GDF de la invención 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 de trampa de GDF pueden contener elementos que no son aminoácidos, tales como polietilenglicoles, lípidos, poli- o monosacáridos y fosfatos. Los efectos de dichos elementos que no son aminoácidos sobre la funcionalidad de un polipéptido de trampa de GDF pueden probarse como se describe en el presente documento para otras variantes de polipéptido de trampa de GDF. Cuando se produce un polipéptido de trampa de GDF en células al escindir una forma naciente del polipéptido de trampa de GDF, el procesamiento postraduccional también puede ser importante para el correcto plegamiento y/o función de la proteína. Las diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades postraduccionales y pueden elegirse para garantizar la correcta modificación y procesamiento de los polipéptidos de trampa de GDF.

En ciertos aspectos, los polipéptidos de trampa de GDF incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una porción de un polipéptido ActRIIB y uno o más dominios de fusión. Ejemplos bien conocidos de tales dominios de fusión incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tiorredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, un Fc), proteína de unión a

maltosa (MBP) o seroalbúmina humana. Se puede seleccionar un dominio de fusión para conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión por cromatografía de afinidad. Para fines de purificación por afinidad, se utilizan las matrices pertinentes para cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas con glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Muchas de esas matrices están disponibles en forma de "kit", tal como el sistema de purificación Pharmacia GST y el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útiles con compañeros de fusión (HIS₆). Como otro ejemplo, se puede seleccionar un dominio de fusión para facilitar la detección de los polipéptidos de trampa de GDF. Ejemplos de tales dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP) así como las "etiquetas de epítipo", que generalmente son secuencias peptídicas cortas para las que está disponible un anticuerpo específico. Etiquetas de epítipos bien conocidas para las cuales están fácilmente disponibles anticuerpos monoclonales específicos incluyen FLAG, hemaglutinina (HA) del virus de la gripe y etiquetas c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de proteasas, tal como el Factor Xa o Trombina, que permite que la proteasa pertinente digiera parcialmente las proteínas de fusión y de este modo liberen las proteínas recombinantes de las mismas. Las proteínas liberadas pueden aislarse luego del dominio de fusión mediante separación cromatográfica posterior. En ciertas realizaciones preferidas, un polipéptido de trampa de GDF se fusiona con un dominio que estabiliza el polipéptido de trampa de GDF *in vivo* (un dominio "estabilizador"). Por "estabilizar" se entiende cualquier cosa que aumente la semivida en suero, independientemente de si esto se debe a una disminución de la destrucción, disminución de la eliminación renal u otro efecto farmacocinético. Se sabe que las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina confieren propiedades farmacocinéticas convenientes a una amplia gama de proteínas. Asimismo, las fusiones con seroalbúmina humana pueden conferir propiedades convenientes. Otros tipos de dominios de fusión que pueden seleccionarse incluyen dominios multimerizantes (por ejemplo, dimerizantes, tetramerizantes) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, tal como aumentar aún más los niveles de glóbulos rojos).

Como un ejemplo específico, la presente invención proporciona una trampa de GDF que es una proteína de fusión ActRIIB-Fc que comprende un dominio extracelular (por ejemplo, unión a ligando) del polipéptido ActRIIB fusionado a un dominio Fc. A continuación, se muestra la secuencia de un dominio Fc de ejemplo (SEQ ID NO: 6).

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD (A) VSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVP IEKTI SKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
PFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK*

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

Se entiende que diferentes elementos de las proteínas de fusión se pueden disponer de cualquier manera que sea compatible con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido de trampa de GDF puede colocarse carboxiterminal a un dominio heterólogo, o, alternativamente, un dominio heterólogo puede colocarse carboxiterminal a un polipéptido de trampa de GDF. El dominio del polipéptido de trampa de GDF y el dominio heterólogo no necesitan estar adyacentes en una proteína de fusión, y se pueden incluir dominios o secuencias de aminoácidos adicionales carboxi- o aminoterminal en cualquiera de los dominios o entre los dominios.

En ciertas realizaciones, una proteína de fusión de trampa de GDF comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la fórmula A-B-C. La porción B es un polipéptido ActRIIB truncado de forma amino- y carboxiterminal que consiste en la secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 26-132 de la SEQ ID NO: 26. Las porciones A y C pueden ser independientemente cero, uno o más de un aminoácido, y las porciones A y C cuando están presentes son heterólogas para B. Las porciones A y/o C pueden unirse a la porción B a través de una secuencia conectora. Los conectores de ejemplo incluyen conectores polipeptídicos cortos tales como 2-10, 2-5, 2-4, 2-3 residuos de glicina, tales como, por ejemplo, un conector de Gly-Gly-Gly. Otros conectores adecuados se describen en el presente documento anteriormente. En ciertas realizaciones, una proteína de fusión de trampa de GDF comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la fórmula A-B-C, en donde A es una secuencia líder, B consiste en los aminoácidos 26-132 de la SEQ ID NO: 26, y C es una porción de polipéptido que potencia uno o más de la estabilidad *in vivo*, la semivida *in vivo*, la captación/administración, la localización o distribución tisular, la formación de complejos de proteínas y/o la purificación. En ciertas realizaciones, una proteína de fusión de trampa de GDF comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la fórmula A-B-C, en donde A es una secuencia líder de TPA, B consiste en los aminoácidos 26-132 de la SEQ ID NO: 26 y C es un dominio Fc de inmunoglobulina. Una proteína de fusión de trampa de GDF preferida comprende la secuencia de

aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO: 26.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de trampa de GDF de la presente invención contienen una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos de trampa de GDF. Por ejemplo, tales modificaciones potencian la semivida *in vitro* de los polipéptidos de trampa de GDF, potencian la semivida circulatoria de los polipéptidos de trampa de GDF o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos de trampa de GDF. Dichas modificaciones estabilizadoras incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión (que incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de trampa de GDF y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glucosilación (que incluye, por ejemplo, la adición de un sitio de glucosilación a un polipéptido de trampa de GDF) y modificaciones del fracción de carbohidrato (incluyendo, por ejemplo, la eliminación de fracciones de carbohidrato de un polipéptido de trampa de GDF). En el caso de las proteínas de fusión, un polipéptido de trampa de GDF se fusiona a un dominio estabilizador tal como una molécula de IgG (por ejemplo, un dominio Fc). Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio estabilizador" no solo se refiere a un dominio de fusión (por ejemplo, Fc) como en el caso de las proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteicas tales como una fracción de carbohidrato o un polímero no proteico, tal como el polietilenglicol.

En ciertas realizaciones, la presente invención pone a disposición formas aisladas y/o purificadas de los polipéptidos de trampa de GDF, que están aisladas de otras proteínas o, de otro modo, sustancialmente libres de ellas.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de trampa de GDF (no modificados o modificados) de la invención pueden producirse mediante una diversidad de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, dichos polipéptidos de trampa de GDF se pueden sintetizar utilizando técnicas de química de proteínas convencional como las descritas en Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlín (1993) y Grant G.A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W.H. Freeman and Company, Nueva York (1992). Además, los sintetizadores automatizados de péptidos están disponibles comercialmente (por ejemplo, Advanced ChemTech Modelo 396; Milligen/Biosearch 9600). Alternativamente, los polipéptidos, fragmentos o variantes de trampa de GDF pueden producirse de manera recombinante usando diversos sistemas de expresión (por ejemplo, *E. coli*, células de ovario de hámster chino (CHO), células COS, baculovirus) como es bien conocido en la técnica. En una realización adicional, los polipéptidos de trampa de GDF modificados o no modificados se pueden producir por digestión de polipéptidos de trampa de GDF de longitud completa producidos de manera recombinante utilizando, por ejemplo, una proteasa, por ejemplo, tripsina, termolisina, quimotripsina, pepsina o enzima convertidora de aminoácidos básicos apareados (PACE). El análisis por ordenador (usando un programa informático comercialmente disponible, por ejemplo, MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) puede usarse para identificar sitios de escisión proteolítica. Alternativamente, dichos polipéptidos de trampa de GDF pueden producirse a partir de polipéptidos de trampa de GDF de longitud completa producidos de manera recombinante tales como técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como por escisión química (por ejemplo, bromuro de cianógeno, hidroxilamina).

3. Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de trampa de GDF

En ciertos aspectos, la invención proporciona ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes (no reivindicado por separado) que codifican cualquiera de los polipéptidos de trampa de GDF divulgados en el presente documento. La SEQ ID NO: 4 codifica un polipéptido precursor ActRIIB de origen natural, mientras que la SEQ ID NO: 5 codifica un polipéptido ActRIIB soluble, y las SEQ ID NO: 25, 27, 30 y 31 codifican trampas de GDF solubles. Los ácidos nucleicos en cuestión 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 fabricar polipéptidos de trampa de GDF o como agentes terapéuticos directos (por ejemplo, en un enfoque de terapia génica).

En ciertos aspectos, se entiende que los ácidos nucleicos en cuestión que codifican los polipéptidos de trampa de GDF incluyen además ácidos nucleicos que son variantes de las SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 y 31. Las secuencias de nucleótidos variantes incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos, tales como variantes alélicas; y, por lo tanto, incluirán secuencias codificantes que difieren de la secuencia de nucleótidos de la secuencia codificante designada en las SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 y 31.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona secuencias de ácido nucleico aisladas o recombinantes que son al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a la SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o 31. Un experto en la materia apreciará que las secuencias de ácido nucleico complementarias a la SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o 31, y las variantes de la SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o 31, también están dentro del alcance de la presente invención. En realizaciones adicionales, las secuencias de ácido nucleico de la invención pueden aislarse, recombinarse y/o fusionarse con una secuencia de nucleótidos heteróloga, o en una biblioteca de ADN.

En otras realizaciones, los ácidos nucleicos de la invención también incluyen secuencias de nucleótidos que hibridan en condiciones altamente rigurosas con la secuencia de nucleótidos designada en las SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o 31, la secuencia complementaria de la SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o 31, o fragmentos de las mismas. Como se analizó anteriormente, un experto en la materia entenderá fácilmente que las condiciones de rigurosidad apropiadas que propician la hibridación de ADN pueden variar. Por ejemplo, se podría realizar la hibridación con cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 6,0 x a aproximadamente 45 °C, seguido de un lavado de SSC 2,0 x a 50 °C. Por

ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado puede seleccionarse desde una baja rigurosidad de aproximadamente SSC 2,0 x a 50 °C hasta una alta rigurosidad de aproximadamente SSC 0,2 x a 50 °C. Además, la temperatura en la etapa de lavado se puede aumentar de condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, aproximadamente 22 °C, a condiciones de alta rigurosidad a aproximadamente 65 °C. Tanto la temperatura como la sal pueden variar, o la temperatura o la concentración de sal pueden mantenerse constantes mientras se cambia la otra variable. En una realización, la invención proporciona ácidos nucleicos que hibridan en condiciones de baja rigurosidad de SSC 6 x a temperatura ambiente seguido de un lavado de SSC 2 x a temperatura ambiente.

Los ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos como se establece en la SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o 31 debido a la degeneración en el código genético también están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, varios aminoácidos están designados 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. En ciertas realizaciones, el polipéptido de trampa de GDF estará codificado por una secuencia de nucleótidos alternativa. Las secuencias de nucleótidos alternativas están degeneradas con respecto a la secuencia de ácido nucleico de la trampa de GDF nativa pero todavía codifican para la misma proteína de fusión. En ciertas realizaciones, la trampa de GDF que tiene la SEQ ID NO: 26 estará codificada por una secuencia alternativa de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 30. Sin embargo, se espera que entre las células de mamíferos existan polimorfismos de la secuencia de ADN que conduzcan a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas en cuestión. Un experto en la materia apreciará que estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente el 3-5 % de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína particular pueden existir entre individuos de una especie dada debido a la variación alélica natural. Cualquiera y todas estas variaciones de nucleótidos y polimorfismos de aminoácidos resultantes están dentro del alcance de la presente invención.

En ciertas realizaciones los ácidos nucleicos recombinantes de la invención pueden unirse operativamente a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras en una construcción de expresión. Las secuencias de nucleótidos reguladoras generalmente serán apropiadas para la célula hospedadora utilizada para la expresión. Se conocen numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y de secuencias reguladoras adecuadas en la técnica para una diversidad de células hospedadoras. Típicamente, dichas una o más secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias promotoras, secuencias líder o señal, sitios de unión al ribosoma, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias de inicio y terminación de la traducción, y secuencias potenciadoras o activadoras. La invención contempla promotores constitutivos o inducibles como se conocen en la técnica. Los promotores pueden ser promotores de origen natural o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Una construcción de expresión puede estar presente en una célula en un episoma, tal como un plásmido, o la construcción de expresión puede insertarse 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 marcadores de selección son bien conocidos en la técnica y variarán con la célula hospedadora utilizada.

En ciertos aspectos de la invención, el ácido nucleico en cuestión se proporciona en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de trampa de GDF y está unido operativamente a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras son reconocidas en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido de trampa de GDF. Por consiguiente, la expresión secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Ejemplos de secuencias reguladoras se describen en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, cualquiera de una amplia diversidad de secuencias de control de la expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando está unida operativamente a ella puede usarse en estos vectores para expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido de trampa de GDF. Dichas secuencias útiles de control de la expresión incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío de SV40, el promotor tet, el promotor temprano inmediato de adenovirus o citomegalovirus, los promotores de RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión está dirigida por la ARN polimerasa T7, el operador principal y las regiones promotoras del fago lambda, las regiones de control para la proteína de cubierta de fd, el promotor de la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de apareamiento α de levadura, el promotor de poliedro 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. Debe entenderse 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 debe tener en cuenta el número de copias del vector, la capacidad de controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tales como los marcadores de antibióticos.

Se puede producir un ácido nucleico recombinante de la invención ligando el gen clonado, o una porción del mismo, en un vector adecuado para la expresión en células procariotas, células eucariotas (levadura, ave, insecto o mamífero), o en ambas. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido de trampa de GDF recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos obtenidos de pBR322, plásmidos obtenidos de pEMBL, plásmidos obtenidos de pEX, plásmidos

obtenidos de pBTac y plásmidos obtenidos de pUC para la expresión en células procariotas, tales como *E. coli*.

Algunos vectores de expresión en mamíferos contienen tanto secuencias procariotas para facilitar la propagación del vector en bacterias, como una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan en células eucariotas. Los vectores obtenidos de pcDNAI/amp, pcDNAI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión en mamífero adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y la selección de resistencia a fármacos tanto en células procariotas como eucariotas. Alternativamente, los procedentes de virus tales como el virus del papiloma bovino (BPV-1) o el virus de Epstein-Barr (pHEBo, obtenido de pREP y p205) pueden usarse para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Ejemplos de otros sistemas de expresión víricos (incluidos los retrovíricos) se pueden encontrar más adelante en la descripción de los sistemas de suministro de terapia génica. Los diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos hospedadores son bien conocidos en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como eucariotas, así como para procedimientos recombinantes generales, véase Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª Ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) capítulos 16 y 17. En algunos casos, puede ser conveniente expresar los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Ejemplos de dichos sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores obtenidos de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores obtenidos de pAcUW (tales como pAcUW1) y vectores obtenidos de pBlueBac (tales como el β -gal que contiene pBlueBac III).

En una realización preferida, se diseñará un vector para la producción de los polipéptidos de trampa de GDF en cuestión en células CHO, tales como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, California), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, California) y vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wisc.). Como será evidente, las construcciones de genes en cuestión pueden usarse para provocar la expresión de los polipéptidos de trampa de GDF en cuestión en células propagadas en cultivo, por ejemplo, para producir proteínas, incluidas proteínas de fusión o proteínas variantes, para purificación.

La presente invención también se refiere a una célula hospedadora (no reivindicado por separado) transfectada con un gen recombinante que incluye una secuencia codificante (por ejemplo, la SEQ ID NO: 4, 5, 25, 27, 30 o 31) para uno o más de los polipéptidos de trampa de GDF en cuestión. La célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido de trampa de GDF de la invención puede expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (por ejemplo, usando un sistema de expresión de baculovirus), levadura o células de mamífero. Los expertos en la materia conocen otras células hospedadoras adecuadas.

Por consiguiente, la presente invención se refiere además a métodos para producir los polipéptidos de trampa de GDF en cuestión. Por ejemplo, una célula hospedadora transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido de trampa de GDF puede cultivarse en condiciones apropiadas para permitir que se produzca la expresión del polipéptido de trampa de GDF. El polipéptido de trampa de GDF puede secretarse y aislarse de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido de trampa de GDF. Alternativamente, el polipéptido de trampa de GDF puede retenerse citoplasmáticamente o en una fracción de membrana y las células se pueden recolectar, someter a lisis y aislar la proteína. Un cultivo celular incluye células hospedadoras, medios y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular son bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos de trampa de GDF en cuestión pueden aislarse del medio de cultivo celular, células hospedadoras, o ambos, usando técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis y purificación de inmunoafinidad con anticuerpos específicos para epítopos particulares de los polipéptidos de trampa de GDF. En una realización preferida, el polipéptido de trampa de GDF es una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación.

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

Las técnicas para fabricar genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, la unión de diversos fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias de polipéptidos se realiza de acuerdo con técnicas convencionales, empleando extremos romos o escalonados para el ligamiento, digestión con enzimas de restricción para proporcionar los extremos apropiados, relleno de extremos cohesivos según corresponda, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones no deseadas y ligamiento enzimático. En otra realización, el gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, se puede llevar a cabo amplificación por PCR de fragmentos de genes utilizando cebadores de anclaje que dan lugar a protuberancias complementarias entre dos fragmentos de genes consecutivos que posteriormente pueden aparearse para generar una secuencia de genes quiméricos (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons: 1992).

4. Ensayos de exploración (no reivindicado)

En ciertos aspectos, en el presente documento se divulga el uso de los polipéptidos de trampa de GDF en cuestión (por ejemplo, polipéptidos ActRIIB variantes solubles) para identificar compuestos (agentes) que son agonistas o antagonistas de los polipéptidos ActRIIB. Los compuestos identificados a través de esta exploración pueden probarse para evaluar su capacidad para modular los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina y/o reticulocitos *in vivo* o *in vitro*. Estos compuestos se pueden probar, por ejemplo, en modelos animales.

Existen numerosos enfoques para la exploración de agentes terapéuticos para aumentar los niveles de glóbulos rojos o hemoglobina por direccionamiento de la señalización de ActRIIB. En ciertas realizaciones, se puede realizar una exploración de alto rendimiento de compuestos para identificar agentes que perturban los efectos mediados por ActRIIB en una línea celular seleccionada. En ciertas realizaciones, el ensayo se lleva a cabo para explorar e identificar compuestos que inhiben o reducen específicamente la unión de un polipéptido ActRIIB a su compañero de unión, tal como un ligando de ActRIIB (por ejemplo, activina, Nodal, GDF8, GDF11 o BMP7). Alternativamente, el ensayo puede usarse para identificar compuestos que potencian la unión de un polipéptido ActRIIB a su compañero de unión tal como un ligando de ActRIIB. En una realización adicional, los compuestos pueden identificarse por su capacidad de interactuar con un polipéptido ActRIIB.

Una diversidad de formatos de ensayo será suficiente y, a la luz de la presente divulgación, aquellos no descritos expresamente en el presente documento serán comprendidos por un experto en la materia. Como se describe en el presente documento, los compuestos (agentes) de prueba pueden crearse mediante cualquier método químico combinatorio. Alternativamente, los compuestos en cuestión pueden ser biomoléculas de origen natural sintetizadas *in vivo* o *in vitro*. Los compuestos (agentes) que se analizarán para determinar su capacidad de actuar como moduladores del crecimiento de los tejidos pueden producirse, por ejemplo, mediante bacterias, levaduras, plantas u otros organismos (por ejemplo, productos naturales), producirse químicamente (por ejemplo, moléculas pequeñas, incluidos peptidomiméticos) o producirse de forma recombinante. Los compuestos de prueba contemplados en el presente documento incluyen moléculas orgánicas no peptídicas, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas y moléculas de ácido nucleico. En una realización específica, el agente de prueba es una molécula orgánica pequeña que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 2000 Daltons.

Los compuestos de prueba pueden proporcionarse como entidades individuales, discretas, o proporcionarse en bibliotecas de mayor complejidad, tales como las 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 los compuestos de prueba al sistema de prueba puede ser en forma aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en las etapas iniciales de la exploración. Opcionalmente, los compuestos pueden derivatizarse opcionalmente con otros compuestos y tener grupos derivatizantes que faciliten el aislamiento de los compuestos. Los ejemplos no limitantes de grupos derivatizantes incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína verde fluorescente, isótopos, polihistidina, perlas magnéticas, glutatión S transferasa (GST), reticuladores fotoactivables o cualquier combinación de los mismos.

En muchos programas de exploración de fármacos que prueban bibliotecas de compuestos y extractos naturales, son convenientes ensayos de alto rendimiento para maximizar el número de compuestos estudiados en un período de tiempo dado. Los ensayos que se realizan en sistemas sin células, tales como los que pueden derivarse con proteínas purificadas o semipurificadas, con frecuencia se prefieren como exploraciones "primarias", ya que pueden generarse para permitir un desarrollo rápido y una 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 la biodisponibilidad del compuesto de prueba generalmente se pueden ignorar en el sistema *in vitro*, y en cambio el ensayo se centra principalmente en el efecto del fármaco sobre la diana molecular como puede manifestarse en una alteración de la afinidad de unión entre un polipéptido ActRIIB y su compañero de unión (por ejemplo, un ligando de ActRIIB).

Simplemente como ilustración, en un ensayo de exploración de ejemplo divulgado en el presente documento, el compuesto de interés se pone en contacto con un polipéptido ActRIIB aislado y purificado que normalmente es capaz de unirse a un ligando de ActRIIB, según sea apropiado para la intención del ensayo. Luego, a la mezcla del compuesto y el polipéptido ActRIIB se agregan a una composición que contiene un ligando de ActRIIB. La detección y cuantificación de los complejos de ligando de ActRIIB/ActRIIB proporciona un medio para determinar la eficacia del compuesto para inhibir (o potenciar) la formación de complejos entre el polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. La eficacia del compuesto puede evaluarse generando curvas de respuesta a la dosis a partir de los datos obtenidos utilizando diversas concentraciones del compuesto de prueba. Además, también se puede realizar un ensayo de control para proporcionar un valor inicial para la comparación. Por ejemplo, en un ensayo de control, se agrega ligando de ActRIIB aislado y purificado a una composición que contiene el polipéptido ActRIIB, y la formación del complejo de ligando de ActRIIB/ActRIIB se cuantifica en ausencia del compuesto de prueba. Se entenderá que, en general, el orden en que pueden mezclarse los reactantes puede variarse, y pueden mezclarse simultáneamente. Además, en lugar de proteínas purificadas, se pueden usar extractos y lisados celulares para proporcionar un sistema de ensayo sin células adecuado.

La formación de complejos entre el polipéptido ActRIIB y su proteína de unión puede detectarse mediante una diversidad de técnicas. Por ejemplo, la modulación de la formación de complejos se puede cuantificar usando, por ejemplo, proteínas marcadas de forma detectable, tal como el polipéptido ActRIIB o sus proteínas de unión radiomarcadas (por ejemplo, ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C o ^3H), marcados con fluorescencia (por ejemplo, FITC) o marcados enzimáticamente, por inmunoensayo o por detección cromatográfica.

En ciertas realizaciones, en el presente documento se contempla el uso de ensayos de polarización de fluorescencia y ensayos de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) para medir, directa o indirectamente, el grado de interacción entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. Además, son compatibles con muchas realizaciones divulgadas en el presente documento otros modos de detección, tales como los basados en guías de ondas ópticas (Publicación PCT WO 96/26432 y Patente de los Estados Unidos N.º 5.677.196), resonancia de plasmón superficial (SPR), sensores de carga superficial y sensores de fuerza superficial.

Además, se contempla en el presente documento el uso de un ensayo de trampa de interacción, también conocido como el "ensayo de dos híbridos", para identificar agentes que interrumpan o potencien la interacción entre un polipéptido ActRIIB y su compañero de unión. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 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, en el presente documento se contempla el uso de sistemas de dos híbridos inversos para identificar compuestos (por ejemplo, moléculas pequeñas o péptidos) que desasocian las interacciones entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. Véanse, por ejemplo, Vidal y Legrain, (1999) *Nucleic Acids Res* 27:919-29; Vidal y Legrain, (1999) *Trends Biotechnol* 17: 374-81 y las Patentes de los Estados Unidos N.º 5.525.490; 5.955.280 y 5.965.368.

En ciertas realizaciones, los compuestos en cuestión se identifican por su capacidad de interactuar con un polipéptido ActRIIB. La interacción entre el compuesto y el polipéptido ActRIIB puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, dicha interacción se puede identificar a nivel de proteína utilizando métodos bioquímicos *in vitro*, que incluyen fotorreticulación, unión de ligando radiomarcado y cromatografía de afinidad (Jakoby WB *et al.*, 1974, *Methods in Enzymology* 46: 1). En ciertos casos, los compuestos pueden explorarse en un ensayo basado en un mecanismo, tal como un ensayo para detectar compuestos que se unen a un polipéptido ActRIIB. Esto puede incluir un acontecimiento de unión en fase sólida o en fase fluida. Alternativamente, el gen que codifica un polipéptido ActRIIB puede transfectarse con un sistema indicador (por ejemplo, β -galactosidasa, luciferasa o proteína verde fluorescente) en una célula y explorarse contra la biblioteca preferentemente mediante una exploración de alto rendimiento o con miembros individuales de la biblioteca. Se pueden usar otros ensayos de unión basados en mecanismos, por ejemplo, ensayos de unión que detectan cambios en la energía libre. Los ensayos de unión pueden realizarse con la diana fijada a un pocillo, perla o chip, o capturada por un anticuerpo inmovilizado o resuelta por electroforesis capilar. Los compuestos unidos pueden detectarse usualmente utilizando colorimetría o fluorescencia, o resonancia de plasmón superficial.

5. Usos terapéuticos

La presente invención se refiere a un polipéptido para su uso en un método de tratamiento de la anemia en un sujeto que lo necesite, como se define adicionalmente en el presente documento y en las reivindicaciones.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de trampa de GDF de la presente invención pueden usarse para aumentar los niveles de glóbulos rojos en mamíferos tales como roedores y primates, y particularmente pacientes humanos. En particular, la presente invención proporciona péptidos para su uso en métodos para tratar o prevenir la anemia en un individuo que lo necesite mediante la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de trampa de GDF (como se define adicionalmente en el presente documento y en las reivindicaciones). Estos métodos pueden usarse para tratamientos terapéuticos y profilácticos de mamíferos, y particularmente de seres humanos.

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

Como se muestra en el presente documento, los polipéptidos de trampa de GDF pueden usarse para aumentar los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina o reticulocitos en individuos sanos, y dichos polipéptidos de trampa de GDF pueden usarse en poblaciones de pacientes seleccionadas. Los ejemplos de poblaciones de pacientes apropiadas incluyen aquellos con niveles de hemoglobina o glóbulos rojos inconvenientemente bajos, tal como pacientes con anemia, y aquellos que están en riesgo de desarrollar niveles de hemoglobina o glóbulos rojos inconvenientemente bajos, tal como aquellos pacientes que están a punto de someterse a una cirugía mayor u otros procedimientos que

pueden dar como resultado una pérdida de sangre considerable. En una realización, un paciente con niveles adecuados de glóbulos rojos se trata con un polipéptido de trampa de GDF para aumentar los niveles de glóbulos rojos, y luego se extrae sangre y se almacena para su uso posterior en transfusiones.

Los polipéptidos de trampa de GDF divulgados en el presente documento pueden usarse para aumentar los niveles de glóbulos rojos en pacientes que tienen anemia. Al observar los niveles de hemoglobina en seres humanos, un nivel inferior al normal para la edad y el sexo apropiados puede ser indicativo de anemia, aunque se tienen en cuenta las variaciones individuales. Por ejemplo, un nivel de hemoglobina de 12 g/dl generalmente se considera el límite inferior normal en la población adulta general. Las posibles causas incluyen pérdida de sangre, déficit nutricional, reacción a la medicación, diversos problemas con la médula ósea y muchas enfermedades. Más particularmente, la anemia se ha asociado con una diversidad de trastornos que incluyen, por ejemplo, insuficiencia renal crónica, síndrome mielodisplásico, artritis reumatoide, trasplante de médula ósea. La anemia también puede estar asociada con las siguientes afecciones: tumores sólidos (por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon); tumores del sistema linfático (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica, linfomas no Hodgkin y de Hodgkin); tumores del sistema hematopoyético (por ejemplo, leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple); radioterapia; quimioterapia (por ejemplo, regímenes que contienen platino); enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, que incluyen, pero no se limita a, artritis reumatoide, otras artritis inflamatorias, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedades cutáneas agudas o crónicas (por ejemplo, psoriasis), enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); enfermedad o insuficiencia renal aguda o crónica, incluidas afecciones idiopáticas o congénitas; enfermedad hepática aguda o crónica; sangrado agudo o crónico; situaciones donde la transfusión de glóbulos rojos no es posible debido a alo- o autoanticuerpos del paciente y/o por razones religiosas (por ejemplo, algunos Testigos de Jehová); infecciones (por ejemplo, malaria, osteomielitis); hemoglobinopatías, que incluyen, por ejemplo, enfermedad de células falciformes, talasemias; uso o toxicomanía, por ejemplo, abuso de alcohol; pacientes pediátricos con anemia por cualquier causa para evitar transfusiones y pacientes de edad avanzada o pacientes con enfermedad cardiopulmonar subyacente con anemia que no pueden recibir transfusiones debido a preocupaciones sobre la sobrecarga circulatoria.

Los polipéptidos de trampa de GDF serían apropiados para tratar las anemias de la médula ósea hipoproliferativa, que típicamente se asocian con un pequeño cambio en la morfología de los glóbulos rojos (GR). Las anemias hipoproliferativas incluyen: 1) anemia de enfermedad crónica, 2) anemia de enfermedad renal y 3) anemia asociada con estados hipometabólicos. En cada uno de estos tipos, los niveles de eritropoyetina endógena son *inapropiadamente bajos* para el grado de anemia observado. Otras anemias hipoproliferativas incluyen: 4) anemia por deficiencia de hierro en etapa temprana y 5) anemia provocada por daño a la médula ósea. En estos tipos, los niveles de eritropoyetina endógena están *adecuadamente elevados* para el grado de anemia observado.

El tipo más común es la anemia de enfermedad crónica, que abarca inflamación, infección, lesión tisular y afecciones tales como el cáncer, y se distingue tanto por los bajos niveles de eritropoyetina como por una *respuesta inadecuada* a la eritropoyetina en la médula ósea (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17^a ed.; McGraw Hill, Nueva York, pág. 628-634). Muchos factores pueden contribuir a la anemia relacionada con el cáncer. Algunos están asociados con el proceso de la enfermedad en sí y con la generación de citocinas inflamatorias tales como la interleucina 1, el interferón gamma y el factor de necrosis tumoral (Bron *et al.*, 2001, Semin Oncol 28 (Supl. 8): 1-6). Entre sus efectos, la inflamación induce el péptido clave regulador de hierro hepcidina, inhibiendo así la exportación de hierro desde los macrófagos y en general limitando la disponibilidad de hierro para la eritropoyesis (Ganz, 2007, J Am Soc Nephrol 18:394-400). La pérdida de sangre a través de diversas vías también puede contribuir a la anemia relacionada con el cáncer. La prevalencia de anemia debido a la progresión del cáncer varía según el tipo de cáncer, que varía del 5 % en el cáncer de próstata hasta el 90 % en el mieloma múltiple. La anemia relacionada con el cáncer tiene profundas consecuencias para los pacientes, incluida la fatiga y la reducción de la calidad de vida, la reducción de la eficacia del tratamiento y el aumento de la mortalidad.

La enfermedad renal crónica se asocia con anemia hipoproliferativa que varía en gravedad con el grado de insuficiencia renal. Dicha anemia se debe principalmente a la *producción* inadecuada de eritropoyetina y a la reducción de la supervivencia de los glóbulos rojos. La enfermedad renal crónica generalmente avanza gradualmente durante un período de años o décadas hasta la enfermedad en etapa terminal (Etapa 5), momento en el cual se requiere diálisis o trasplante de riñón para la supervivencia del paciente. La anemia con frecuencia se desarrolla temprano en este proceso y empeora a medida que la enfermedad progresa. Las consecuencias clínicas de la anemia por enfermedad renal están bien documentadas e incluyen el desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda, función cognitiva deteriorada, calidad de vida reducida y función inmunitaria alterada (Levin *et al.*, 1999, Am J Kidney Dis 27:347-354; Nissenson, 1992, Am J Kidney Dis 20(Supl. 1):21-24; Revicki *et al.*, 1995, Am J Kidney Dis 25:548-554; Gafter *et al.*, 1994, Kidney Int 45:224-231) Como lo demostraron los solicitantes en un modelo de ratón con enfermedad renal crónica (véase el Ejemplo más adelante), se puede usar un polipéptido de trampa de GDF para tratar la anemia de la enfermedad renal.

Muchas afecciones que dan como resultado una tasa hipometabólica pueden producir una anemia hipoproliferativa leve a moderada. Entre tales afecciones se encuentran los estados de deficiencia endocrina. Por ejemplo, la anemia puede producirse en la enfermedad de Addison, el hipotiroidismo, el hiperparatiroidismo o los hombres castrados o tratados con estrógenos. La anemia leve a moderada también puede producirse con una ingesta reducida de

proteínas en la alimentación, una afección particularmente prevalente en los ancianos. Finalmente, puede desarrollarse anemia en pacientes con enfermedad hepática crónica que surge por casi cualquier causa (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17ª ed.; McGraw Hill, Nueva York, pág. 628-634).

La anemia que es el resultado de la pérdida aguda de sangre de un volumen suficiente, tal como por traumatismo o hemorragia posparto, se conoce como anemia poshemorrágica aguda. La pérdida aguda de sangre inicialmente provoca hipovolemia sin anemia, ya que hay un agotamiento proporcional de los GR junto con otros componentes sanguíneos. Sin embargo, la hipovolemia desencadenará rápidamente mecanismos fisiológicos que desplazan el líquido del compartimiento extravascular al vascular, lo que da como resultado hemodilución y anemia. Si es crónica, la pérdida de sangre empobrece gradualmente las reservas corporales de hierro y a la larga conduce a una deficiencia de hierro. Como lo demostraron los solicitantes en un modelo de ratón (véase el Ejemplo a continuación), se puede usar un polipéptido de trampa de GDF para acelerar la recuperación de la anemia por pérdida aguda de sangre.

La anemia por deficiencia de hierro es la etapa final en una progresión gradual de aumento de la deficiencia de hierro que incluye un equilibrio negativo de hierro y una eritropoyesis deficiente en hierro como etapas intermedias. La deficiencia de hierro puede ser el resultado de una demanda aumentada de hierro, una ingesta disminuida de hierro o una pérdida aumentada de hierro, como se ejemplifica en estados tales como el embarazo, una alimentación inadecuada, mala absorción intestinal, inflamación aguda o crónica y pérdida aguda o crónica de sangre. Con anemia de leve a moderada de este tipo, la médula ósea permanece hipoproliferativa y la morfología de los GR es en gran parte normal; sin embargo, incluso la anemia leve puede dar lugar a algunos GR hipocrómicos microcíticos, y la transición a la anemia grave por deficiencia de hierro se acompaña de hiperproliferación de la médula ósea y GR microcíticos e hipocrómicos cada vez más prevalentes (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17ª ed.; McGraw Hill, Nueva York, pág. 628-634). La terapia adecuada para la anemia por deficiencia de hierro depende de su causa y gravedad, siendo las preparaciones orales de hierro, las formulaciones parenterales de hierro y la transfusión de GR las principales opciones convencionales. Un polipéptido de trampa de GDF podría usarse para tratar anemias por deficiencia de hierro crónica solo o en combinación con enfoques terapéuticos convencionales, particularmente para tratar anemias de origen multifactorial.

Las anemias hipoproliferativas pueden ser el resultado de una disfunción primaria o falla de la médula ósea, en lugar de una disfunción secundaria a inflamación, infección o progresión del cáncer. Los ejemplos prominentes serían mielosupresión provocada por fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer o radioterapia contra el cáncer. Una amplia revisión de ensayos clínicos encontró que puede producirse anemia leve en el 100 % de los pacientes después de la quimioterapia, mientras que puede producirse anemia más grave en hasta el 80 % de dichos pacientes (Groopman *et al.*, 1999, J Natl Cancer Inst 91:1616-1634). Los fármacos mielosupresores incluyen: 1) agentes alquilantes tales como mostazas nitrogenadas (por ejemplo, melfalán) y nitrosoureas (por ejemplo, estreptozocina); 2) antimetabolitos tales como antagonistas del ácido fólico (por ejemplo, metotrexato), análogos de purina (por ejemplo, tioguanina) y análogos de pirimidina (por ejemplo, gemcitabina); 3) antibióticos citotóxicos tales como antraciclinas (por ejemplo, doxorubicina); 4) inhibidores de la cinasa (por ejemplo, gefitinib); 5) inhibidores mitóticos tales como taxanos (por ejemplo, paclitaxel) y alcaloides de la vinca (por ejemplo, vinorelbina); 6) anticuerpos monoclonales (por ejemplo, rituximab) y 7) inhibidores de la topoisomerasa (por ejemplo, topotecán y etopósido). Como se demostró en un modelo de ratón de anemia inducida por quimioterapia (véase el Ejemplo a continuación), un polipéptido de trampa de GDF puede usarse para tratar la anemia provocada por agentes quimioterapéuticos y/o radioterapia.

Los polipéptidos de trampa de GDF también serían apropiados para tratar anemias de maduración de GR desordenada, que se caracterizan en parte por GR de tamaño insuficiente (microcíticos), de gran tamaño (macrocíticos), deformados o anormalmente coloreados (hipocrómicos).

Los pacientes pueden tratarse con una pauta posológica destinada a restablecer al paciente a un nivel diana de hemoglobina, generalmente entre aproximadamente 10 g/dl y aproximadamente 12,5 g/dl, y típicamente aproximadamente 11,0 g/dl (véase también Jacobs *et al.* (2000) Nephrol Dial Transplant 15, 15-19), aunque los niveles diana más bajos pueden provocar menos efectos secundarios cardiovasculares. Alternativamente, los niveles de hematocrito (porcentaje del volumen de una muestra de sangre ocupado por las células) se pueden usar como una medida para el estado de los glóbulos rojos. Los niveles de hematocrito para individuos sanos varían del 41 al 51 % para hombres adultos y del 35 al 45 % para mujeres adultas. Los niveles diana de hematocrito generalmente son de alrededor del 30-33 %. Además, los niveles de hemoglobina/hematocrito varían de persona a persona. Por lo tanto, de manera óptima, el nivel de hemoglobina/hematocrito diana puede individualizarse para cada paciente.

El efecto rápido sobre los niveles de glóbulos rojos de los polipéptidos de trampa de GDF divulgados en el presente documento indica que estos agentes actúan por un mecanismo diferente al de la Epo. Por consiguiente, estos antagonistas pueden ser útiles para aumentar los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina en pacientes que no responden bien a la Epo. Por ejemplo, un polipéptido de trampa de GDF puede ser beneficioso para un paciente en donde la administración de una dosis normal a aumentada (>300 UI/kg/semana) de Epo no da como resultado un aumento del nivel de hemoglobina hasta el nivel diana. Los pacientes con una respuesta a la Epo inadecuada se

encuentran para todos los tipos de anemia, pero se ha observado un mayor número de personas que no responden, particularmente con frecuencia en pacientes con cánceres y pacientes con insuficiencia renal terminal. Una respuesta a la Epo inadecuada puede ser constitutiva (es decir, observada en el primer tratamiento con Epo) o adquirida (por ejemplo, observada en un tratamiento repetido con Epo).

Los polipéptidos de trampa de GDF también se pueden usar para tratar pacientes que son susceptibles a los efectos adversos de la Epo. Los principales efectos adversos de la Epo son un aumento excesivo de los niveles de hematocrito o hemoglobina y policitemia. Los niveles elevados de hematocrito pueden conducir a hipertensión (más particularmente, agravamiento de la hipertensión) y trombosis vascular. Otros efectos adversos de la Epo que se han informado, algunos de los cuales están relacionados con la hipertensión, son cefaleas, síndrome similar a la gripe, obstrucción de derivaciones, infartos de miocardio y convulsiones cerebrales debido a trombosis, encefalopatía hipertensiva y aplasia de glóbulos rojos (Singibarti, (1994) J. Clin Investig 72 (supl. 6), S36-S43; Horl *et al.* (2000) Nephrol Dial Transplant 15 (supl. 4), 51-56; Delanty *et al.* (1997) Neurology 49, 686-689 ; Bunn (2002) N Engl J Med 346(7), 522-523).

Las trampas de GDF también se pueden usar en combinación con la Epo y otros agentes que activan la ruta de la eritropoyetina. En algunos casos, esto puede permitir una menor dosificación de cada fármaco en la combinación.

En ciertas realizaciones, un paciente que se ha tratado con, o es un candidato a tratarse con, un polipéptido de trampa de GDF se puede atender midiendo uno o más parámetros hematológicos en el paciente. Los parámetros hematológicos se pueden usar para evaluar la dosificación adecuada para un paciente que es candidato a tratarse con un polipéptido de trampa de GDF, para controlar los parámetros hematológicos durante el tratamiento con un polipéptido de trampa de GDF, para evaluar si se debe ajustar la dosificación durante el tratamiento con un polipéptido de trampa de GDF y/o para evaluar una dosis de mantenimiento apropiada de un polipéptido de trampa de GDF. Si uno o más de los parámetros hematológicos están fuera del nivel normal, la dosificación con un polipéptido de trampa de GDF puede reducirse, retrasarse o interrumpirse.

Los parámetros hematológicos que pueden medirse en conformidad con los métodos proporcionados en el presente documento (es decir, los polipéptidos para su uso en los métodos de acuerdo con la invención) incluyen, por ejemplo, niveles de glóbulos rojos, presión arterial, reservas de hierro y otros agentes encontrados en fluidos corporales que se correlacionan con niveles aumentados de glóbulos rojos, usando métodos reconocidos en la técnica. Tales parámetros pueden determinarse usando una muestra de sangre de un paciente. Los aumentos en los niveles de glóbulos rojos, los niveles de hemoglobina y/o los niveles de hematocrito pueden provocar aumentos en la presión arterial.

En una realización, si uno o más parámetros hematológicos están fuera del intervalo normal, o en el lado alto de lo normal, en un paciente que es candidato a tratarse con un polipéptido de trampa de GDF, entonces puede retrasarse el inicio de la administración del polipéptido de trampa de GDF hasta que los parámetros hematológicos hayan vuelto a un nivel normal o aceptable, ya sea de forma natural o mediante intervención terapéutica. Por ejemplo, si un paciente candidato es hipertenso o prehipertenso, entonces puede tratarse al paciente con un agente reductor de la presión arterial para reducir la presión arterial del paciente. Se puede usar cualquier agente reductor de la presión arterial apropiado para la afección del paciente individual, incluidos, por ejemplo, diuréticos, inhibidores adrenérgicos (incluidos los bloqueantes alfa y bloqueantes beta), vasodilatadores, bloqueantes de los canales de calcio, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) o bloqueantes de los receptores de angiotensina II. La presión arterial puede tratarse alternativamente con una dieta y un régimen de ejercicio. De manera similar, si un paciente candidato tiene reservas de hierro que son más bajas de lo normal, o en el lado más bajo de lo normal, entonces el paciente puede tratarse con un régimen apropiado de dieta y/o suplementos de hierro hasta que las reservas de hierro del paciente hayan vuelto a un nivel normal o nivel. Para los pacientes que tienen niveles de glóbulos rojos y/o hemoglobina más altos de lo normal, la administración del polipéptido de trampa de GDF puede retrasarse hasta que los niveles hayan regresado a un nivel normal o aceptable.

En ciertas realizaciones, si uno o más parámetros hematológicos están fuera del intervalo normal, o en el lado alto de lo normal, en un paciente que es candidato para a tratarse con un polipéptido de trampa de GDF, entonces el inicio de la administración puede no retrasarse. Sin embargo, la cantidad de dosificación o frecuencia de dosificación del polipéptido de trampa de GDF puede establecerse en una cantidad que reduciría el riesgo de un aumento inaceptable en los parámetros hematológicos que surgen tras la administración del polipéptido de trampa de GDF. Alternativamente, se puede desarrollar un régimen terapéutico para el paciente que combine un polipéptido de trampa de GDF con un agente terapéutico que aborde el nivel inconveniente del parámetro hematológico. Por ejemplo, si el paciente tiene presión arterial elevada, entonces se puede diseñar un régimen terapéutico que implique la administración de un polipéptido de trampa de GDF y un agente reductor de la presión arterial. Para un paciente que tiene reservas de hierro inferiores a las deseadas, se puede desarrollar un régimen terapéutico de un polipéptido de trampa de GDF y suplementos de hierro.

En una realización, el parámetro (o parámetros) iniciales para uno o más parámetros hematológicos puede establecerse para un paciente que es candidato a tratarse con un polipéptido de trampa de GDF y se establece una pauta posológica apropiada para el paciente basándose en el valor (o valores) inicial. Alternativamente, los

parámetros iniciales establecidos basados en los antecedentes médicos de un paciente podrían usarse para informar una pauta posológica de polipéptido de trampa de GDF apropiada para un paciente. Por ejemplo, si un paciente sano tiene una lectura de la presión arterial inicial establecida que está por encima del intervalo normal definido, puede no ser necesario llevar la presión arterial del paciente al intervalo que se considera normal para la población general antes del tratamiento con la trampa de polipéptido de GDF. Unos valores iniciales de un paciente para uno o más parámetros hematológicos antes del tratamiento con un polipéptido de trampa de GDF también se pueden usar como los valores comparativos pertinentes para controlar cualquier cambio en los parámetros hematológicos durante el tratamiento con el polipéptido de trampa de GDF.

En ciertas realizaciones, uno o más parámetros hematológicos se miden en pacientes que tratados con un polipéptido de trampa de GDF. Los parámetros hematológicos pueden usarse para controlar al paciente durante el tratamiento y permitir el ajuste o la finalización de la dosificación con el polipéptido de trampa de GDF o la dosificación adicional con otro agente terapéutico. Por ejemplo, si la administración de un polipéptido de trampa de GDF da como resultado un aumento de la presión arterial, el nivel de glóbulos rojos o el nivel de hemoglobina, o una reducción en las reservas de hierro, entonces la dosis del polipéptido de trampa de GDF puede reducirse en cantidad o frecuencia para disminuir los efectos del polipéptido de trampa de GDF en uno o más parámetros hematológicos. Si la administración de un polipéptido de trampa de GDF da como resultado un cambio en uno o más parámetros hematológicos que es adverso para el paciente, entonces la dosificación del polipéptido de trampa de GDF puede finalizar temporalmente, hasta que el parámetro (o parámetros) hematológico vuelva a un nivel aceptable o permanentemente. Del mismo modo, si uno o más parámetros hematológicos no se sitúan dentro de un intervalo aceptable tras reducir la dosis o la frecuencia de administración del polipéptido de trampa de GDF, entonces la dosificación puede finalizar. Como alternativa a, o además de, reducir o finalizar la dosificación con el polipéptido de trampa de GDF, se puede dosificar al paciente con un agente terapéutico adicional que aborde el nivel inconveniente en el parámetro (o parámetros) hematológico, tal como, por ejemplo, un agente reductor de la presión arterial o un suplemento de hierro. Por ejemplo, si un paciente tratado con un polipéptido de trampa de GDF tiene presión arterial elevada, entonces la dosificación con el polipéptido de trampa de GDF puede continuar al mismo nivel y se agrega un agente reductor de la presión arterial al régimen de tratamiento, la dosificación con el polipéptido de trampa de GDF puede reducirse (por ejemplo, en cantidad y/o frecuencia) y se agrega un agente reductor de la presión arterial al régimen de tratamiento, o la dosificación con el polipéptido de trampa de GDF puede finalizar y puede tratarse al paciente con un agente reductor de la presión arterial.

En ciertas realizaciones, los pacientes tratados con un polipéptido de trampa de GDF, o pacientes candidatos a tratarse con un polipéptido de trampa de GDF, son pacientes que necesitan crecimiento muscular, tales como pacientes que padecen o están en riesgo de desarrollar un trastorno neuromuscular o trastorno musculogenerativo. Por ejemplo, los pacientes o pacientes candidatos pueden estar padeciendo, o estar en riesgo de desarrollar, la enfermedad de Lou Gehrig (ELA), el síndrome de anorexia-caquexia por cáncer, distrofia muscular, atrofia muscular, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva (y atrofia muscular asociada con EPOC), síndrome de atrofia muscular, sarcopenia o caquexia. Distrofia muscular se refiere a un grupo de enfermedades musculares degenerativas caracterizadas por el debilitamiento gradual y el deterioro de los músculos esqueléticos y, a veces, los músculos cardíacos y respiratorios. Las distrofias musculares de ejemplo que pueden tratarse con un régimen que incluye los polipéptidos de trampa de GDF en cuestión incluyen: distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker (DMB), distrofia muscular de Emery-Dreifuss (DMED), distrofia muscular de cinturas (DMC), distrofia muscular facioescapulohumeral (FEH o DMFEH) (también conocida como Landouzy-Dejerine), distrofia miotónica (DM) (también conocida como enfermedad de Steinert), distrofia muscular oculofaríngea (DMOF), distrofia muscular distal (DD), distrofia muscular congénita (DMC). Como se explica anteriormente, la presente invención se refiere a un polipéptido para su uso en un método de tratamiento de la anemia en un sujeto que lo necesite, como se define en las reivindicaciones.

6. Composiciones farmacéuticas

En ciertas realizaciones, los compuestos (por ejemplo, polipéptidos de trampa de GDF) de la presente invención se formulan con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, un polipéptido de trampa de GDF puede administrarse solo o como un componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Si bien los compuestos en cuestión pueden formularse para administración de cualquier manera conveniente para su uso en medicina humana o veterinaria, la presente invención se refiere a polipéptidos para su uso en un método de tratamiento de la anemia en un sujeto que lo necesite (como se define en el presente documento y en las reivindicaciones), en donde el polipéptido se administra por vía parenteral.

En ciertas realizaciones, el uso terapéutico de la invención incluye administrar la composición sistémicamente o localmente como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para su uso en la presente invención está, por supuesto, en una forma fisiológicamente aceptable, sin pirógenos. Los agentes terapéuticamente útiles distintos de los polipéptidos de trampa de GDF que también pueden incluirse opcionalmente en la composición como se describe anteriormente, pueden administrarse simultánea o secuencialmente con los compuestos en cuestión (por ejemplo, polipéptidos de trampa de GDF) en conformidad con la invención.

En conformidad con la presente invención, los compuestos se administrarán por vía parenteral. Las composiciones

farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden comprender uno o más polipéptidos de trampa de GDF en combinación con una o más soluciones isotónicas acuosas o no acuosas estériles, dispersiones, suspensiones o emulsiones farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes del uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes. Los ejemplos de transportadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención 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 el oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Además, la composición puede encapsularse o inyectarse en una forma para el suministro a un sitio de tejido diana (por ejemplo, médula ósea). En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden incluir una matriz capaz de suministrar uno o más compuestos terapéuticos (por ejemplo, polipéptidos de trampa de GDF) a un sitio de tejido diana (por ejemplo, médula ósea), proporcionando una estructura para el tejido en desarrollo y óptimamente capaz de ser reabsorbida en el cuerpo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar una liberación lenta de los polipéptidos de trampa de GDF. Dichas matrices pueden estar formadas por materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.

La elección del material de matriz se basa en la biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, aspecto cosmética y propiedades de interfaz. La aplicación particular de las composiciones en cuestión definirá la formulación apropiada. Las posibles matrices para las composiciones pueden ser sulfato de calcio, fosfato de tricalcio, hidroxiapatita, ácido poliláctico y polianhídridos biodegradables y químicamente definidos. Otros posibles materiales son biodegradables y biológicamente bien definidos, tales como hueso o colágeno dérmico. Las matrices adicionales están compuestas de proteínas puras o componentes de la matriz extracelular. Otras posibles matrices no son biodegradables y están químicamente definidas, tales como la hidroxiapatita sinterizada, biocristal, aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden estar compuestas de combinaciones de cualquiera de los tipos de material mencionados anteriormente, tales como ácido poliláctico e hidroxiapatita o colágeno y fosfato de tricalcio. Puede alterarse la composición de la biocerámica, tal como en aluminato fosfato de calcio y el procesamiento para alterar el tamaño de los poros, el tamaño de las partículas, la forma de las partículas y la biodegradabilidad.

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

Se entiende que la pauta posológica la determinará el médico responsable considerando diversos factores que modifican la acción de los compuestos en cuestión de la invención (por ejemplo, polipéptidos de trampa de GDF). Los diversos factores incluyen, pero sin limitarse a, el recuento de glóbulos rojos del paciente, el nivel de hemoglobina u otras evaluaciones de diagnóstico, el recuento deseado de glóbulos rojos diana, la edad, el sexo y la alimentación del paciente, la gravedad de cualquier enfermedad que pueda estar contribuyendo a un nivel bajo de glóbulos rojos, el tiempo de administración y otros factores clínicos. La adición de otros factores de crecimiento conocidos a la composición final también puede afectar la dosificación. El progreso se puede controlar mediante la evaluación periódica de los niveles de hemoglobina y glóbulos rojos, así como las evaluaciones de los niveles de reticulocitos y otros indicadores del proceso hematopoyético.

En ciertas realizaciones, también se divulga en el presente documento (no reivindicado) la terapia génica para la producción *in vivo* de polipéptidos de trampa de GDF. Dicha terapia lograría su efecto terapéutico mediante la introducción de las secuencias de polinucleótidos de trampa de GDF en células o tejidos que tienen los trastornos enumerados anteriormente. El suministro de secuencias de polinucleótidos de trampa de GDF se puede lograr usando un vector de expresión recombinante tal como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. El uso de liposomas dirigidos es el preferido para el suministro terapéutico de secuencias de polinucleótidos de trampa de GDF.

Diversos vectores víricos que se pueden utilizar para la terapia génica como se enseña en el presente documento incluyen adenovirus, virus del herpes, vaccinia o un virus de ARN tal como un retrovirus. El vector retroviral puede ser un derivado de un retrovirus murino o aviar. Los ejemplos de vectores retrovíricos en los que se puede insertar un solo gen extraño incluyen, pero no se limita a: el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), el virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), el virus del tumor mamario murino (MuMTV) y el virus del sarcoma de Rous (RSV). Varios vectores retrovíricos adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador de selección para que las células transducidas puedan identificarse

y generarse. Los vectores retrovíricos pueden hacerse específicos para la diana uniendo, por ejemplo, un azúcar, un glucolípido o una proteína. El direccionamiento preferido se logra mediante el uso de un anticuerpo. Los expertos en la materia reconocerán que las secuencias de polinucleótidos específicas pueden insertarse en el genoma retrovílico o unirse a una envoltura vírica para permitir el suministro específico al blanco del vector retrovílico que contiene el polinucleótido de trampa de GDF.

Alternativamente, las células de cultivo de tejidos pueden transfectarse directamente con plásmidos que codifican los genes estructurales retrovíricos gag, pol y env, mediante transfección convencional con fosfato de calcio. Estas células se transfectan luego con el plásmido vector que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retrovílico en el medio de cultivo.

Otro sistema de suministro dirigido para polinucleótidos de trampa de GDF es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferido de la presente invención es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificiales que son útiles como vehículos de suministro *in vitro* e *in vivo*. El ARN, el ADN y los viriones intactos pueden encapsularse dentro del interior acuoso y suministrarse a las células en una forma biológicamente activa (véase, por ejemplo, Fraley *et al.*, Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Los métodos para la transferencia eficiente de genes usando un vehículo de liposomas son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Mannino, *et al.*, Biotechniques, 6:682, 1988. La composición del liposoma suele ser una combinación de fosfolípidos, generalmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También se pueden usar otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

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

Ejemplificación

La invención, que ahora se describe de manera general, se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen simplemente con fines ilustrativos de ciertas realizaciones y realizaciones de la presente invención, y no pretenden limitar la invención.

Ejemplo 1. Generación de una trampa de GDF.

Los solicitantes construyeron una trampa de GDF de la siguiente manera. Un polipéptido que tiene un dominio extracelular modificado de ActRIIB con una unión a activina A muy reducida en relación con GDF11 y/o miostatina (como consecuencia de una sustitución de leucina a aspartato en la posición 79 en la SEQ ID NO: 1) se fusionó a un dominio Fc humano o de ratón con un conector mínimo (tres aminoácidos de glicina) en el medio. Las construcciones se denominan ActRIIB(L79D 20-134)-hFc y ActRIIB(L79D 20-134)-mFc, respectivamente. Las formas alternativas con un glutamato en lugar de un aspartato en la posición 79 se realizaron de manera similar (L79E). Las formas alternativas con una alanina en lugar de una valina en la posición 226 con respecto a la SEQ ID NO: 7, a continuación, también se generaron y se realizaron de manera equivalente en todos los aspectos probados. El aspartato en la posición 79 (en relación con la SEQ ID NO: 1, o la posición 60 en relación con la SEQ ID NO: 7) se resalta en gris a continuación. La valina en la posición 226 en relación con la SEQ ID NO: 7 también se resalta en gris a continuación.

La trampa de GDF ActRIIB(L79D 20-134)-hFc se muestra a continuación tal como se purificó a partir de líneas celulares CHO (SEQ ID NO: 7).

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
 GCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPT
 APTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
 PVP^{IE}KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPVLDS^{GS}FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
 LSPGK

La porción procedente de ActRIIB de la trampa de GDF tiene una secuencia de aminoácidos establecida a continuación (SEQ ID NO: 32), y esa porción podría usarse como un monómero o como una proteína de fusión sin Fc como un monómero, dímero o un complejo de orden mayor.

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIE
LVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYE
PPPTAPT (SEQ ID NO: 32)

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

- (i) Melitina de abeja melífera (HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 8)
- (ii) Activador de plasminógeno tisular (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 9)
- (iii) Nativa: MTAPWVALALLWGSLCAGS (SEQ ID NO: 10).

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

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCE
GEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE
GNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVIIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11)

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

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

La purificación se puede lograr mediante una serie de etapas de cromatografía en columna, que incluyen, por ejemplo, tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía en Q sefarosa, cromatografía de fenilsefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación podría completarse con filtración vírica e intercambio de tampón. En un ejemplo de un esquema de

purificación, el medio de cultivo celular se pasa por una columna de proteína A, se lava en Tris/NaCl 150 mM (pH 8,0), luego se lava en Tris/NaCl 50 mM (pH 8,0) y se eluye con glicina 0,1 M, pH 3,0. El eluato de pH bajo se mantiene a temperatura ambiente durante 30 minutos como una etapa de eliminación vírica. A continuación, el eluato se neutraliza y se pasa por una columna de intercambio iónico de Q sefarosa, y se lava en Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, y se eluye en Tris 50 mM pH 8,0, con una concentración de NaCl de entre 150 mM y 300 mM. El eluato se cambia luego a Tris 50 mM pH 8,0, sulfato de amonio 1,1 M y se pasa por una columna de fenilsefarosa, se lava y se eluye en Tris 50 mM pH 8,0 con sulfato de amonio entre 150 y 300 mM. El eluato se dializa y se filtra para su uso.

Trampas de GDF adicionales (proteínas de fusión ActRIIB-Fc modificadas para reducir la relación de unión a activina A con respecto a miostatina o GDF 11) se describen en

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

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

Se usó un ensayo de gen indicador A-204 para evaluar los efectos de las proteínas ActRIIB-Fc y las trampas de GDF sobre la señalización por GDF-11 y Activina A. Línea celular: Rbdomiosarcoma humano (obtenido de músculo). Vector informador: pGL3(CAGA)12 (descrito en Dennler *et al*, 1998, EMBO 17: 3091-3100). El motivo CAGA12 está presente en los genes sensibles a TGF-Beta (gen PAI-1), por lo que este vector es de uso general para los factores de señalización a través de Smad2 y 3.

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

Día 2: Células A-204 transfectadas con 10 µg de pGL3(CAGA)12 o pGL3(CAGA)12(10 µg)+ pRLCMV (1 µg) y Eugene.

Día 3: Agregar factores (diluidos en medio + BSA al 0,1 %). Los inhibidores deben preincubarse con factores durante 1 hora antes de agregarlos a las células. 6 horas más tarde, las células se lavan con PBS y las células se someten a lisis.

Esto es seguido por un ensayo de luciferasa. En ausencia de inhibidores, la Activina A mostró una estimulación de la expresión del gen informador de 10 veces y una DE50 de ~ 2 ng/ml. GDF-11: estimulación de 16 veces, DE50: ~ 1,5 ng/ml.

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

Ejemplo 3. Inhibición de GDF-11 por truncamientos aminoterminales y carboxiterminales

Se generaron variantes de ActRIIB(20-134)-hFc con truncamientos en el extremo amino y/o carboxilo y se probó su actividad como inhibidores de GDF-11 y activina. Las actividades se muestran a continuación (medidas en medios condicionados):

Truncamientos de ActRIIB-hFc carboxiterminales:

	CI50 (ng/ml)	
	GDF-11	Activina
ActRIIB(20-134)-hFc (referencia)	45	22
ActRIIB(20-132)-hFc (referencia)	87	32
ActRIIB(20-131)-hFc (referencia)	120	44
ActRIIB(20-128)-hFc (referencia)	130	158

Como se puede ver, los truncamientos de tres (que acaban con ...PPT), seis (que acaban con ...YEP) o más aminoácidos en el extremo carboxilo provocan una disminución de tres veces o mayor de la actividad de la molécula. El truncamiento de los 15 aminoácidos finales de la porción ActRIIB provoca una mayor pérdida de actividad (véase el documento WO2006/012627).

Se hicieron truncamientos amino terminales en el contexto de una proteína ActRIIB(20-131)-hFc. Las actividades se muestran a continuación (medidas en medios condicionados):

Truncamientos de ActRIIB-hFc aminoterminales:

	CI50 (ng/ml)	
	GDF-11	Activina
ActRIIB(20-131)-hFc (GRG...) (referencia)	183	201
ActRIIB(21-131)-hFc (RGE...) (referencia)	121	325
ActRIIB(22-131)-hFc (GEA...) (referencia)	71	100
ActRIIB(23-131)-hFc (EAE...) (referencia)	60	43
ActRIIB(24-131)-hFc (AET...) (referencia)	69	105

Por consiguiente, los truncamientos de dos, tres o cuatro aminoácidos del extremo N conducen a la producción de una proteína más activa que las versiones con un dominio extracelular de longitud completa. Experimentos adicionales muestran que un truncamiento de cinco aminoácidos, ActRIIB(25-131)-hFc tiene una actividad equivalente a la forma no truncada, y las eliminaciones adicionales en el extremo N continúan degradando la actividad de la proteína. Por lo tanto, las construcciones óptimas tendrán un extremo C que termina entre el aminoácido 133-134 de la SEQ ID NO: 1 y un extremo N que comienza en los aminoácidos 22-24 de la SEQ ID NO: 1. Un extremo N correspondiente a los aminoácidos 21 o 25 dará una actividad similar a la construcción ActRIIB(20-134)-hFc. Estos truncamientos también se pueden usar en el contexto de las trampas de GDF de acuerdo con la invención, que son las variantes L79D o L79E (es decir, que tienen un ácido aspártico (D) o un ácido glutámico (E) en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1).

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

La actividad de las proteínas ActRIIB-Fc y las trampas de GDF se probó en un ensayo basado en células, como se describió anteriormente. Los resultados se resumen en la tabla a continuación. Algunas variantes se probaron en diferentes construcciones de truncamiento carboxiterminal. Como se analizó anteriormente, los truncamientos de cinco o quince aminoácidos provocaron una reducción en la actividad. Las trampas de GDF (variantes L79D y L79E) mostraron una pérdida sustancial de la unión a activina mientras conservaban una inhibición casi de tipo silvestre de GDF-11.

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

Variaciones ActRIIB-Fc	Porción de ActRIIB (corresponde a los aminoácidos de la SEQ ID NO: 1)	Actividad de inhibición de GDF11	Actividad de inhibición de activina
R64	20-134	+++ (K _i de aprox. 10 ⁻⁸ M)	+++ (K _i de aprox. 10 ⁻⁸ M)
A64	20-134	+ (K _i de aprox. 10 ⁻⁶ M)	+ (K _i de aprox. 10 ⁻⁶ M)
R64	20-129	+++	+++
R64 K74A	20-134	++++	++++
R64 A24N	20-134	+++	+++
R64 A24N	20-119	++	++
R64 A24N K74A	20-119	+	+
R64 L79P	20-134	+	+
R64 L79P K74A	20-134	+	+
R64 L79D	20-134	+++	+
R64 L79E	20-134	+++	+
R64K	20-134	+++	+++
R64K	20-129	+++	+++
R64 P129S P130A	20-134	+++	+++
R64N	20-134	+	+
(Las variantes L79D y L79E están de acuerdo con la invención) + Actividad pobre (K _i de aproximadamente 1x10 ⁻⁶) ++ Actividad moderada (K _i de aproximadamente 1x10 ⁻⁷) +++ Actividad buena (tipo silvestre) (K _i de aproximadamente 1x10 ⁻⁸) ++++ Mayor que la actividad de tipo silvestre			

Se han evaluado varias variantes en cuanto a la semivida en suero en ratas. ActRIIB(20-134)-Fc tiene una semivida en suero de aproximadamente 70 horas. ActRIIB(A24N 20-134)-Fc tiene una semivida en suero de aproximadamente 100-150 horas. La variante A24N tiene actividad en el ensayo basado en células (arriba) y en los ensayos *in vivo* (abajo) que son equivalentes a la molécula de tipo silvestre. Junto con la semivida más larga, esto significa que con el tiempo una variante A24N dará un mayor efecto por unidad de proteína que la molécula de tipo

silvestre. La variante A24N, y cualquiera de las otras variantes probadas anteriormente, se pueden combinar con las moléculas de trampa de GDF de acuerdo con la invención, que son las variantes L79D o L79E.

Ejemplo 5. Unión a GDF-11 y Activina A.

La unión de ciertas proteínas ActRIIB-Fc y trampas de GDF a ligandos se probó en un ensayo BiaCore™.

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

Variantes de IIB con especificidad de unión a ligando

	GDF11		
Proteína	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB (20-134)-hFc	1,34e-6	1,13 e-4	8,42e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	1,21e-6	6,35e-5	5,19e-11
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	6,7e-5	4,39e-4	6,55e-10
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3,8e-5	2,74e-4	7,16e-10
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6,77e-5	2,41e-5	3,56e-11
	GDF8		
Proteína	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	3,69e-5	3,45e-5	9,35e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc			
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	3,85e-5	8,3e-4	2,15e-9
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3,74e-5	9e-4	2,41e-9
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	2,25e-5	4,71e-5	2,1e-10
ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	9,74e-4	2,09e-4	2,15e-9
ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	1,08e-5	1,8e-4	1,67e-9
ActRIIB(K74A 20-134)-hFc	2,8e-5	2,03e-5	7,18e-11
	Activina A		
Proteína	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActIIB (20-134)-hFc	5,94e6	1,59e-4	2,68e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	3,34e6	3,46e-4	1,04e-10
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc			Unión baja
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc			Unión baja
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6,82e6	3,25e-4	4,76e-11
ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	7,46e6	6,28e-4	8,41e-11
ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	5,02e6	4,17e-4	8,31e-11
(Las variantes L79D y L79E están de acuerdo con la invención)			

Estos datos confirman los datos del ensayo basado en células, lo que demuestra que la variante A24N retiene la actividad de unión al ligando que es similar a la de la molécula ActRIIB(20-134)-hFc, y que la molécula L79D o L79E retiene la unión a miostatina y a GDF 11, pero muestra una unión marcadamente disminuida (no cuantificable) a Activina A.

Se han generado y probado otras variantes, como se informa en el documento WO2006/012627, véase, por ejemplo, las págs. 59-60, usando ligandos acoplados al dispositivo y haciendo fluir el receptor sobre los ligandos acoplados. De manera destacable, K74Y, K74F, K74I (y presumiblemente otras sustituciones hidrófobas en K74, tal como K74L) y D80I, provocan una disminución en la proporción de unión de Activina A a GDF11, en relación con la molécula K74 de tipo silvestre. A continuación, se reproduce una tabla de datos con respecto a estas variantes (para

referencia):

Variantes solubles de ActRIIB-Fc que se unen a GDF11 y Activina A (ensayo BiaCore)

ActRIIB	ActA	GDF11
TS (64A)	KD=1,8e-7 M (+)	KD= 2,6e-7 M (+)
TS (64R)	nd	KD= 8,6e-8 M (+++)
+ cola de 15	KD ~2,6 e-8 M (+++)	KD= 1,9e-8 M (++++)
E37A	*	*
R40A	-	-
D54A	-	*
K55A	++	*
R56A	*	*
K74A	KD=4,35e-9 M +++++	KD=5,3e-9 M +++++
K74Y	*	-
K74F	*	-
K74I	*	-
W78A	*	*
L79A	+	*
D80K	*	*
D80R	*	*
D80A	*	*
D80F	*	*
D80G	*	*
D80M	*	*
D80N	*	*
D80I	*	-
F82A	++	-
* Sin unión observada - unión <1/5 de la unión del TS - unión ~1/2 de la unión del TS + TS ++ unión aumentada <2x +++ unión aumentada ~5x ++++ unión aumentada ~10x +++++ unión aumentada ~ 40x		

5

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

Se administró ActRIIB(20-134)-hFc (IgG1) (referencia) una vez por semana durante 1 mes a macacos cangrejeros macho y hembra mediante inyección subcutánea. Cuarenta y ocho macacos cangrejeros (24/sexo) fueron asignados a uno de los cuatro grupos de tratamiento (6 animales/sexo/grupo) y se les administraron inyecciones subcutáneas de vehículo o ActRIIB-hFc a 3, 10 o 30 mg/kg una vez por semana durante 4 semanas (total de 5 dosis). Los parámetros evaluados incluyeron patología clínica general (hematología, bioquímica clínica, coagulación y análisis de orina). ActRIIB-hFc causó valores medios de reticulocitos absolutos elevados estadísticamente significativos hacia el día 15 en los animales tratados. Hacia el día 36, ActRIIB-hFc causó varios cambios hematológicos, que incluyeron valores medios absolutos elevados de reticulocitos y de distribución de anchos de los glóbulos rojos y una concentración de hemoglobina corpuscular media más baja. Se vieron afectados todos los grupos tratados y ambos sexos. Estos efectos son concordantes con un efecto positivo de ActRIIB-hFc sobre la liberación de reticulocitos inmaduros a partir de la médula ósea. Este efecto se invirtió después de eliminar el fármaco de los animales tratados (en el día de estudio 56). Por consiguiente, se concluye que ActRIIB-hFc estimula la eritropoyesis.

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

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

Animales:

Se utilizaron 16 ratones C57BL/6 hembra de 6 a 8 semanas de edad en el estudio. A ocho ratones se les inyectó por vía subcutánea el compuesto de prueba ActRIIB-mFc en los días 1 y 3 a una dosis de 10 mg/kg y a ocho ratones se les inyectó por vía subcutánea control de vehículo, solución salina tamponada con fosfato (PBS), a un volumen de 100 µl por ratón. Todos los ratones se sacrificaron 8 días después de la primera inyección en conformidad con las Directrices sobre el Cuidado de Animales pertinentes. Se recolectaron muestras de sangre periférica (SP) de animales individuales mediante punción cardíaca y se usaron para recuentos sanguíneos completos y diferenciales (RSC/Dif.). Se recogieron fémures y bazos de cada ratón.

Pruebas realizadas:

Recuentos RSC/Dif.

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

Ensayos clonogénicos

Los progenitores clonogénicos de los linajes mieloides, eritroides y linfoides se evaluaron usando los sistemas de medios basados en metilcelulosa *in vitro* descritos a continuación.

Progenitores eritroides maduros:

Los progenitores clonogénicos de los linajes eritroides maduros (CFU-E) se cultivaron en MethoCult™ 3334, un medio a base de metilcelulosa que contiene eritropoyetina humana recombinante (hr) (3 U/ml).

Progenitores linfoides:

Los progenitores clonogénicos del linaje linfóide (CFU-pre-B) se cultivaron en MethoCult® 3630, un medio a base de metilcelulosa que contiene Interleucina 7 hr (10 ng/ml).

Progenitores eritroides mieloides e inmaduros:

Los progenitores clonogénicos de los linajes de granulocitos-monocitos (CFU-GM), eritroides (BFU-E) y multipotenciales (CFU-GEMM) se cultivaron en MethoCult™ 3434, un medio a base de metilcelulosa que contiene factor de células madre murino recombinante (mr) (50 ng/ml), Interleucina hr 6 (10 ng/ml), Interleucina 3 mr (10 ng/ml) y eritropoyetina hr (3 U/ml).

Métodos:

Los fémures y bazos de ratón se procesaron mediante protocolos convencionales. En resumen, se obtuvo médula ósea lavando la cavidad femoral con medio Dulbecco modificado de Iscove que contenía suero fetal bovino al 2 % (IMDM SFB al 2 %) usando una aguja de calibre 21 y una jeringa de 1 cc. Las células de bazo se obtuvieron triturando bazos a través de un filtro de 70 µm y enjuagando el filtro con IMDM SFB al 2 %. Los recuentos de células nucleadas en ácido acético glacial al 3 % se realizaron a continuación sobre las suspensiones de células individuales usando una cámara de recuento de Neubauer para poder calcular el total de células por órgano. Para eliminar los glóbulos rojos contaminantes, las células del bazo total se diluyeron con 3 veces el volumen de tampón de lisis de cloruro de amonio y se incubaron en hielo durante 10 minutos. A continuación, las células se lavaron y se volvieron a suspender en IMDM SFB al 2 %, y se realizó un segundo recuento celular para determinar la concentración celular de las células después de la lisis.

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

Análisis:

Se calculó la desviación típica media ± 1 para los cultivos por triplicado de los ensayos clonogénicos y para los grupos de control y de tratamiento para todos los conjuntos de datos.

La frecuencia de células formadoras de colonias (CFC) en cada tejido se calculó de la siguiente manera:

Células sembradas por placa

CFC medias puntuadas por placa

Las CFC totales por fémur o bazo se calcularon de la siguiente manera:

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

Número de células nucleadas cultivadas

Se realizaron pruebas de la t convencionales para evaluar si había diferencias en el número medio de células o progenitores hematopoyéticos entre los ratones de control de PBS y los ratones tratados con compuestos. Debido a la posible subjetividad de la enumeración de colonias, un valor de p menor que 0,01 se considera significativo. Los valores medios (\pm DT) para cada grupo se muestran en las tablas a continuación.

Tabla: Parámetros hematológicos

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

Tabla: CFC de fémur y bazo

Grupo de tratamiento	CFC totales por fémur	CFC totales por bazo	CFU-E totales por fémur	CFU-E totales por bazo
PBS (n=8)	88 \pm 10	54 \pm 14	156 \pm 27	131 \pm 71
ActRIIB-mFc (n=8)	85 \pm 9	79 \pm 6*	164 \pm 23	436 \pm 86*
* el análisis preliminar indica $p < 0,05$				

El tratamiento de ratones con ActRIIB(20-134)-mFc, en el breve período de tiempo de este estudio, no dio lugar a aumentos significativos en el contenido de hemoglobina o glóbulos rojos. Sin embargo, el efecto sobre el contenido en células progenitoras fue notable. En los fémures no hubo diferencia en los números de células nucleadas o el contenido de progenitores entre los grupos de control y tratado. En los bazos, el grupo tratado con compuestos experimentó un aumento estadísticamente significativo en el número de células nucleadas antes de la lisis de los glóbulos rojos y en el número de colonias de progenitores eritroides maduros (UFC-E) por placa, la frecuencia y el número total de progenitores por bazo. Además, se observó un aumento en el número de mieloides (CFU-GM), eritroides inmaduros (BFU-E) y el número total de progenitores por bazo. Por consiguiente, se espera que, durante un curso de tiempo más largo, el tratamiento con ActRIIB(20-134)-mFc pueda dar como resultado un contenido elevado de glóbulos rojos y hemoglobina.

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

Se asignaron ratones C57BL/6NTac machos de doce semanas de edad a uno de los dos grupos de tratamiento

(N=10). Los ratones se dosificaron con vehículo o con un polipéptido ActRIIB variante ("Trampa de GDF") [ActRIIB(L79D 20-134)-hFc] por inyección subcutánea (SC) a 10 mg/kg dos veces por semana durante 4 semanas. Al finalizar el estudio, se recolectó sangre completa por punción cardíaca en tubos que contenían EDTA y se analizó la distribución celular usando un analizador de hematología HM2 (Abaxis, Inc).

5

Designación de grupo

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

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

15

Resultados de hematología

	GR $10^{12}/l$	HGB (g/dl)	HCT (%)	RDWc (%)
PBS	$10,7 \pm 0,1$	$14,8 \pm 0,6$	$44,8 \pm 0,4$	$17,0 \pm 0,1$
Trampa de GDF	$12,4 \pm 0,4^{**}$	$17,0 \pm 0,7^{*}$	$48,8 \pm 1,8^{*}$	$18,4 \pm 0,2^{**}$
*=p<0,05, **= p<0,01				

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

20

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

25

El tratamiento con ActRIIB-Fc o la trampa de GDF no tuvo un efecto significativo sobre los números de glóbulos blancos (GB) en comparación con los controles de vehículo. El recuento de glóbulos rojos (GR), el hematocrito (HCT) y los niveles de hemoglobina fueron todos elevados en los ratones tratados con trampa de GDF en comparación con los controles o la construcción de tipo silvestre (véase la tabla a continuación). Por lo tanto, en una comparación directa, la trampa de GDF propicia aumentos en los glóbulos rojos en un grado significativamente mayor que una proteína ActRIIB-Fc de tipo silvestre. De hecho, en este experimento, la proteína ActRIIB-Fc de tipo silvestre no causó un aumento estadísticamente significativo en los glóbulos rojos, lo que sugiere que se necesitaría una dosis más larga o más alta para revelar este efecto.

30

35

Resultados hematológicos después de tres semanas de dosificación

	GR ($10^{12}/ml$)	% de HCT	HGB g/dl
TBS	$11,06 \pm 0,46$	$46,78 \pm 1,9$	$15,7 \pm 0,7$
ActRIIB-mFc	$11,64 \pm 0,09$	$49,03 \pm 0,3$	$16,5 \pm 1,5$
Trampa de GDF	$13,19 \pm 0,2^{**}$	$53,04 \pm 0,8^{**}$	$18,4 \pm 0,3^{**}$
**=p<0,01			

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

40

Como se describe en el Ejemplo 1, se generó una trampa de GDF denominada ActRIIB(L79D 20-134)-hFc por fusión aminoterminal de la líder de TPA con el dominio extracelular de ActRIIB (residuos 20-134 en la SEQ ID NO: 1) que contiene una sustitución de leucina a aspartato (en el residuo 79 en la SEQ ID NO: 1) y fusión carboxiterminal del dominio Fc humano con un conector mínimo (tres residuos de glicina) (Figura 3). Una secuencia de nucleótidos correspondiente a esta proteína de fusión se muestra en la Figura 4.

45

Se generó una trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB truncado, denominada ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, por fusión aminoterminal de la líder de TPA con el dominio extracelular truncado (residuos 25-131 en la SEQ ID NO: 1) que contiene una sustitución de leucina a aspartato (en el residuo 79 en la SEQ ID NO: 1) y fusión carboxiterminal del dominio Fc humano con un conector mínimo (tres residuos de glicina) (Figura 5). Una secuencia de nucleótidos correspondiente a esta proteína de fusión se muestra en la Figura 6.

Ejemplo 11. Unión selectiva a ligandos por la trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB doblemente truncado

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

Selectividad de ligando de variantes de ActRIIB-hFc:

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

La trampa de GDF con un dominio extracelular truncado, ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, igualó o superó la selectividad de ligandos mostrada por la variante más larga, ActRIIB(L79D 20-134)-hFc, con pérdida pronunciada de unión a activina A y activina B y la retención casi completa de la unión a GDF11 en comparación con sus equivalentes de ActRIIB-hFc que carecen de la sustitución L79D. Nótese que el truncamiento solo (sin sustitución de L79D) no alteró la selectividad entre los ligandos que se muestran en este caso [compárese ActRIIB(L79 25-131)-hFc con ActRIIB(L79 20-134)-hFc].

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

Para generar ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, el dominio extracelular ActRIIB humano con una sustitución de aspartato en la posición 79 nativa (SEQ ID NO: 1) y con truncamientos aminoterminal y carboxiterminal (residuos 25-131 en la SEQ ID NO: 1) se fusionó de forma aminoterminal con una secuencia líder de TPA en lugar de la líder de ActRIIB nativa y de forma carboxiterminal con un dominio Fc humano a través de un conector mínimo (tres residuos de glicina) (Figura 5). Una secuencia de nucleótidos que codifica esta proteína de fusión se muestra en la Figura 6 (SEQ ID NO: 27), y una secuencia de nucleótidos alternativa que codifica exactamente la misma proteína de fusión se muestra en la Figura 9 (SEQ ID NO: 30). Esta proteína se expresó y purificó utilizando la metodología descrita en el Ejemplo 1.

Ejemplo 13. La trampa de GDF con un dominio extracelular de ActRIIB truncado aumenta la proliferación de progenitores eritroides en ratones

Se evaluó ActRIIB(L79D 25-131)-hFc para determinar su efecto sobre la proliferación de progenitores eritroides. Se trataron ratones C57BL/6 machos (8 semanas de edad) con ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, s.c.; n = 6) o vehículo (TBS; n = 6) en los días 1 y 4, luego se sacrificaron el día 8 para la recolección de bazo, tibias, fémures y sangre. Las células del bazo y la médula ósea se aislaron, se diluyeron en medio Dulbecco modificado de Iscove que contenía suero fetal bovino al 5 %, se suspendieron en medio especializado a base de metilcelulosa y se cultivaron durante 2 o 12 días para evaluar los niveles de progenitores clonogénicos en la fase de eritroide de unidades formadoras de colonias (CFU-E) y eritroide de unidades formadoras de brotes (BFU-E), respectivamente. El medio a base de metilcelulosa para la determinación de BFU-E (MethoCult M3434, Stem Cell Technologies) incluyó factor de células madre murino recombinantes, interleucina 3 e interleucina 6, que no estaban presentes en el medio de metilcelulosa para la determinación de CFU-E (MethoCult M3334, Stem Cell Technologies), a la vez que ambos medios contenían eritropoyetina, entre otros componentes. Tanto para BFU-E como para CFU-E, se determinó el número de colonias en placas de cultivo duplicadas procedentes de cada muestra de tejido, y el análisis estadístico de los resultados se basó en el número de ratones por grupo de tratamiento.

Los cultivos procedentes de bazo de ratones tratados con ActRIIB(L79D 25-131)-hFc tenían el doble de colonias de CFU-E que los cultivos correspondientes de ratones de control (P<0,05), mientras que el número de colonias de BFU-E no difirió significativamente con el tratamiento *in vivo*. El número de colonias CFU-E o BFU-E de cultivos de médula ósea tampoco difirió significativamente con el tratamiento. Como se esperaba, el aumento en los números de colonias de CFU-E en cultivos procedentes de bazo estuvo acompañado por cambios altamente significativos (P

<0,001) en el nivel de glóbulos rojos (aumento del 11,6 %), la concentración de hemoglobina (aumento del 12 %) y el nivel de hematocrito (11,6 % de aumento) en el momento de la eutanasia en ratones tratados con ActRIIB(L79D 25-131)-hFc en comparación con los controles. Estos resultados indican que la administración *in vivo* de una trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB truncado puede estimular la proliferación de progenitores eritroides como parte de su efecto general para aumentar los niveles de glóbulos rojos.

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

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

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

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

Ejemplo 15. La trampa de GDF con un dominio extracelular de ActRIIB truncado invierte la anemia inducida por nefrectomía en ratones

Los solicitantes investigaron el efecto de ActRIIB(L79D 25-131)-hFc sobre la anemia en un modelo nefrectomizado de ratón de enfermedad renal crónica. Los ratones C57BL/6 machos (11 semanas de edad) se sometieron a una operación simulada o a una nefrectomía unilateral para reducir la capacidad de producción de eritropoyetina. A los ratones se les permitió una semana para la recuperación posquirúrgica y luego se trataron dos veces por semana con ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, i.p.; n = 15 por condición) o vehículo (TBS; n = 15 por condición) durante un total de 4 semanas. Se recolectaron muestras de sangre antes del inicio de la dosificación y después de 4 semanas de tratamiento. Mientras que los ratones nefrectomizados tratados con vehículo mostraron un descenso significativo en el número de glóbulos rojos durante el período de tratamiento de 4 semanas, el tratamiento con ActRIIB(L79D 25-131)-hFc no solo previno el descenso, sino que *aumentó* los niveles de glóbulos rojos en un 17 % (P <0,001) por encima del valor inicial (Figura 12), a pesar de la capacidad renal reducida para la producción de eritropoyetina. En los ratones nefrectomizados, ActRIIB(L79D 25-131)-hFc también generó aumentos significativos desde el valor inicial en la concentración de hemoglobina y el nivel de hematocrito y, de forma notable, estimuló cada uno de estos parámetros eritropoyéticos aproximadamente en la misma medida en condiciones de nefrectomía que en condiciones de operación simulada (Figura 13). Por tanto, una trampa de GDF con el dominio extracelular de ActRIIB truncado puede aumentar los niveles de glóbulos rojos lo suficiente como para invertir la anemia en un modelo de enfermedad renal crónica.

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

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

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

Se substituyó un volumen igual de solución salina tamponada con fosfato a través del catéter en el momento de la extracción de sangre. Las ratas se trataron con ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, s.c.; n = 5) o vehículo (TBS; n

= 5) en los días 0 y 3. Se extrajeron muestras de sangre para el análisis de CBC a través de catéter en los días -1 (valor inicial), 0, 2, 4 y 6.

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

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

Se evaluaron dos trampas de GDF, ActRIIB(L79D 20-134)-hFc y ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, por su capacidad para estimular la producción de glóbulos rojos en el macaco cangrejero. Los monos se trataron por vía subcutánea con trampa de GDF (10 mg/kg; n = 4 machos/4 hembras), o vehículo (n = 2 machos/2 hembras) en los días 1 y 8. Se recolectaron muestras de sangre en los días 1 (valor inicial de pretratamiento), 3, 8, 15, 29 y 44, y se analizaron los niveles de glóbulos rojos (Figura 15), el hematocrito (Figura 16), los niveles de hemoglobina (Figura 17) y los niveles de reticulocitos (Figura 18). Los monos tratados con vehículo presentaron niveles disminuidos de glóbulos rojos, hematocrito y hemoglobina en todos los puntos de tiempo posteriores al tratamiento, un efecto esperado del muestreo repetido de sangre. En contraste, el tratamiento con ActRIIB(L79D 20-134)-hFc o ActRIIB(L79D 25-131)-hFc aumentó estos parámetros en el primer punto de tiempo posterior al tratamiento (día 3) y los mantuvo a niveles sustancialmente elevados durante el tiempo del estudio (Figuras 15-17). Es importante destacar que los niveles de reticulocitos en los monos tratados con ActRIIB(L79D 20-134)-hFc o ActRIIB(L79D 25-131)-hFc aumentaron sustancialmente en los días 8, 15 y 29 en comparación con el vehículo (Figura 18). Este resultado demuestra que el tratamiento con trampa de GDF aumentó la producción de precursores de glóbulos rojos, lo que dio como resultado niveles elevados de glóbulos rojos.

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

Ejemplo 18. Trampa de GDF obtenida de ActRIIB5

Otros autores han informado una forma alternativa y soluble de ActRIIB (designada ActRIIB5), en que el exón 4, incluido el dominio transmembrana de ActRIIB, se ha reemplazado por una secuencia carboxiterminal diferente (documento WO2007/053775).

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

```
GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWLD79DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGS79GALWLCLEGPAHE
(SEQ ID NO: 36)
```

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

```
GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWLD79DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGS79GALWLCLEGPAHE
(SEQ ID NO: 37)
```

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

5

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWDDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCLEGPAHE TGGG THTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLF
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 38)

Esta construcción puede expresarse en células CHO.

10

Si bien se han analizado realizaciones específicas del objeto, la memoria descriptiva anterior es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variaciones que caen dentro del alcance de las reivindicaciones se harán evidentes para los expertos en la materia tras la revisión de la presente memoria descriptiva y las siguientes reivindicaciones. El alcance total de la invención debe determinarse por referencia a las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido para su uso en un método de tratamiento de la anemia en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido comprende un ácido glutámico o un ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido se une a GDF11 y/o a miostatina, en donde el polipéptido se administra por vía parenteral.
2. El polipéptido para el uso de la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1.
3. El polipéptido para el uso de la reivindicación 1, en donde el polipéptido es una proteína de fusión de trampa de GDF y comprende (i) la secuencia de aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 1, pero en donde el polipéptido comprende un ácido glutámico o un ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1; (ii) un conector y (iii) un dominio Fc.
4. El polipéptido para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el polipéptido comprende uno o más residuos de aminoácidos modificados seleccionados de: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con una fracción lipídica y un aminoácido conjugado con un agente de derivatización orgánico.
5. El polipéptido para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el polipéptido inhibe
 - i) la señalización por GDF11 y miostatina en un ensayo basado en células;
 - ii) la señalización por GDF11 en un ensayo basado en células; o
 - iii) la señalización por miostatina en un ensayo basado en células.
6. El polipéptido para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el polipéptido es una proteína de fusión de trampa de GDF y comprende además una región constante de una inmunoglobulina, en donde la región constante se obtiene de una cadena pesada de IgG, en donde la región constante de una inmunoglobulina es un dominio Fc y en donde el polipéptido forma un homodímero.
7. El polipéptido para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en:
 - a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 28;
 - b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 28;
 - c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 28; y
 - d) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28, en donde el polipéptido comprende un ácido glutámico o un ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1.
8. El polipéptido para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1, pero en donde el polipéptido comprende un ácido glutámico o un ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1.
9. El polipéptido para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido comprende un ácido glutámico o un ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1.
10. El polipéptido para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido comprende un ácido glutámico o un ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1.
11. El polipéptido para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 1, pero en donde el polipéptido comprende un ácido glutámico o un ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1.
12. El polipéptido para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el sujeto está recibiendo una transfusión de sangre.

13. El polipéptido para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el sujeto tiene síndrome mielodisplásico.
14. El polipéptido para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el sujeto tiene talasemia.

ActRIIa	ILGRSETQEC	LFENANWEKD	RTNQTGVEPC	YGDKDKRRHC	FATWKNISGS
ActRIIb	GRGEAETREC	IYYNANWELE	RTN <u>Q</u> SGLERC	EGE <u>Q</u> DKRLHC	YASWRN <u>S</u> SGT

IEIVKQGWL	DDINCYDRTD	CVEKKDSPEV	YFCCCEGNMC	NEKFSYFPFM
IELVKKGWL	DDFN <u>C</u> YDRQE	CVATEENPQV	YFCCCEGNFC	NERFTHLPEA

EVTQPTSNPV	TPKPPT
GGPEVTYEPP	PTAPT

FIGURA 1

		10	20	30	40	50	
Rata IIb	MTAPWAA-LALLWGS	LCAGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLER-CEGEQDKR					
Cerdo IIb	MTAPWAA-LALLWGS	LCVGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLER-CEGEQDKR					
Ratón IIb	MTAPWAA-LALLWGS	LCAGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLER-CEGEQDKR					
Humano IIb	MTAPWAA-LALLWGS	LCAGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLER-CEGEQDKR					
Bobino IIb	MTAPWAA-LALLWGS	LCAGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLER-CEGERDKR					
Xenopus IIb	MGASVALTFLLLLATFRAGSGHDEVE	TRECIYYNANWELERTNQSGVERLV	EGKKDKR				
Humano IIA	MGAAAKLAFAYFLISCS	SGAILGRSETQDECLFFNANWEKDR	TNQTGVET-CYGDQDKR				
Consenso	MTAPWAA	XIaIIWGSICAGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGIERLcGQDKR					
	60	70	80	90	100	110	
Rata IIb	LHCYASWRNNS	SGTIELVKKGCWLD	DFNCYDRDEC	CVATEENFQVYFCCCEGNFCNERFT			
Cerdo IIb	LHCYASWRNNS	SGTIELVKKGCWLD	DFNCYDRDEC	CVATEENFQVYFCCCEGNFCNERFT			
Ratón IIb	LHCYASWRNNS	SGTIELVKKGCWLD	DFNCYDRDEC	CVATEENFQVYFCCCEGNFCNERFT			
Humano IIb	LHCYASWRNNS	SGTIELVKKGCWLD	DFNCYDRDEC	CVATEENFQVYFCCCEGNFCNERFT			
Bobino IIb	LHCYASWRNNS	SGTIELVKKGCWLD	DFNCYDRDEC	CVATEENFQVYFCCCEGNFCNERFT			
Xenopus IIb	LHCYASWRNNS	SGTIELVKKGCWLD	DFNCYDRDEC	IAKEENFQVYFCCCEGNFCNERFT			
Humano IIA	RHCFATWKNIS	SGSIEIVKGCWLD	DFNCYDRDEC	VEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFS			
Consenso	IHCASWRNNS	SGTIELVKKGCWLD	DFNCYDRDEC	CVATEENFQVYFCCCEGNFCNERFT			
	120	130	140	150			
Rata IIb	HLPEAGGPEV	TYEP-PPTAPTLL	VLAYSLLRIGGGLS-				
Cerdo IIb	HLPEAGGPEV	TYEP-PPTAPTLL	VLAYSLLRIGGGLS-				
Ratón IIb	HLPEAGGPEV	TYEP-PPTAPTLL	VLAYSLLRIGGGLS-				
Humano IIb	HLPEAGGPEV	TYEP-PPTAPTLL	VLAYSLLRIGGGLS-				
Bobino IIb	HLPEAGGPEV	TYEP-PPTAPTLL	VLAYSLLRIGGGLS-				
Xenopus IIb	HLPEV---	ETFDPKPQPSASV	LNILIIYSLLRIVGLSM				
Humano IIA	YFPEMEV	TQRTSNF-VTRKPPYYN	ILLYSLVRLMLI--				
Consenso	HLPEAGGPEV	TYEP-PPTAPTLL	VLAYSLLRIGGGLSM				

FIGURA 2

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

FIGURA 3


```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
   TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG
   TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGAGACCCGC ACCCCTCCGA CTCTGTGCCC

101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC
    TCACGTAGAT GATGTTGCGG TTGACCCTCG ACCTCGCGTG GTTGGTCTCG

151 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC
    CCGACCTCG CGACGCTTCC GCTCGTCCTG TTCGCCGACG TGACGATGCG

201 CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT
    GAGGACCGCG TTGTCGAGAC CGTGGTAGCT CGAGCACTTC TTCCCGACGA

251 GGGATGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG
    CCCTACTACT GAAGTTGACG ATGCTATCCG TCCTCACACA CCGGTGACTC

301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA
    CTCTTGGGGG TCCACATGAA GACGACGACA CTTCCGTTGA AGACGTTGCT

351 GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC
    CGCGAAGTGA GTAAACGGTC TCCGACCCCC GGGCCTTCAG TGCATGCTCG

401 CACCCCCGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGA A CTCACACATG CCCACCGTGC
    GTGGGGGCTG TCGGGGGTGG CCACCACCTT GAGTGTGTAC GGGTGGCAGC

451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAAA
    GGTCGTGGAC TTGAGGACCC CCCTGGCAGT CAGAAGGAGA AGGGGGGTTT

501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
    TGGGTTTCCTG TGGGAGTACT AGAGGGCCTG GGGACTCCAG TGTACGCACC

551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
    ACCACCTGCA CTCGGTGCTT CTGGGACTCC AGTTCAAGTT GACCATGCAC

601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
    CTGCCGCACC TCCACGTATT ACGGTTCTGT TTCGGCGCCC TCCTCGTCAT

651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT
    GTTGTCTGTC ATGGCACACC AGTCGCAGGA GTGGCAGGAC GTGGTCTCTGA

701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
    CCGACTTACC GTTCCTCATG TTCACGTTCC AGAGGTTGTT TCGGGAGGGT

751 GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
    CGGGGGTAGC TCTTTTGTA GAGGTTTCGG TTTCCCGTCG GGGCTCTTGG

```

FIGURA 4

```

801  ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
      TGTCCACATG TGGGACGGGG GTAGGGCCCT CCTCTACTGG TTCTTGGTCC

851  TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
      AGTCGGACTG GACGGACCAG TTTCCGAAGA TAGGGTCGCT GTAGCGGCAC

901  GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
      CTCACCTCTT CGTTACCCGT CGGCCTCTTG TTGATGTTCT GGTGCGGAGG

951  CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CTTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
      GCACGACCTG AGGCTGCCGA GGAAGAAGGA GATATCGTTC GAGTGGCACC

1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
      TGTTCCTCGTC CACCGTCGTC CCCTTGCGA AGAGTACGAG GCACTACGTA

1051 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCCCCGGG
      CTCCGAGACG TGTTGGTGAT GTGCGTCTTC TCGGAGAGGG ACAGGGGCCC

1101 TAAATGA (SEQ ID NO:25)
      ATTTACT (SEQ ID NO:33)

```

FIGURA 4 CONT.

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

FIGURA 5

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
   TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

                                     E T R E C I Y Y
51  AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA
   TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGC GACTCTG TGCCCTCACG TAGATGATGT

N A N W E L E R T N Q S G L E R C
101 ACGCCAAC TG GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC
   TGCGGTTGAC CCTCGACCTC GCGTG GTTGG TCTCGCCGGA CCTCGCGACG

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

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

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

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

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

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

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
   GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
   GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCAcca CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
   GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

```

FIGURA 6

```

601  AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
      TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

651  CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
      GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

701  GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
      CGTTCCAGAG GTTGTTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751  AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
      TTTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

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

851  GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
      CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901  GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
      CTCTTGTTGA TGTCTTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951  CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
      GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT

1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
      TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 27)
      GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 34)

```

FIGURA 6 CONT.

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

FIGURA 7

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

FIGURA 8


```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
   TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

                               E T R E C I Y Y
51  AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCCGAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA
   TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGC GGCTTTG GCGCTTACA TAAATAATGT

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

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

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

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

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

P E A G G P E V T Y E P P P T
351 CCCCGAAAGCC GGCGGGCCCG AGGTGACCTA TGAACCCCGC CCCACCGGTG
   GGGGCTTCGG CCGCCCGGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGGC GGGTGGCCAC

401 GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA
   CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
   GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
   GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
   GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
   TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
   GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

```

FIGURA 9

ES 2 949 049 T3

```

701   GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
      CGTTCCAGAG GTTGTTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751   AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
      TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

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

851   GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
      CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901   GAGAACA ACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
      CTCTTGTTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951   CTCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
      GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT

1001  ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
      TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051  CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 30)
      GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 35)

```

FIGURA 9 CONT.

GAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA ATGCTAATTG GGA^{ACTCGAA} CGGACGAACC
AATCCGGGCT CGAACGGTGT GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTCGT
GGAGGAACTC CTCCGGGACG ATTGAACTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTTC
ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTCGCGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC TATTTCTGTT
GTTGCGAGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT CCCCGAAGCC GGC^{GGGCCCG}
AGGTGACCTA TGAACCCCG CCCACC (SEQ ID NO: 31)

FIGURA 10

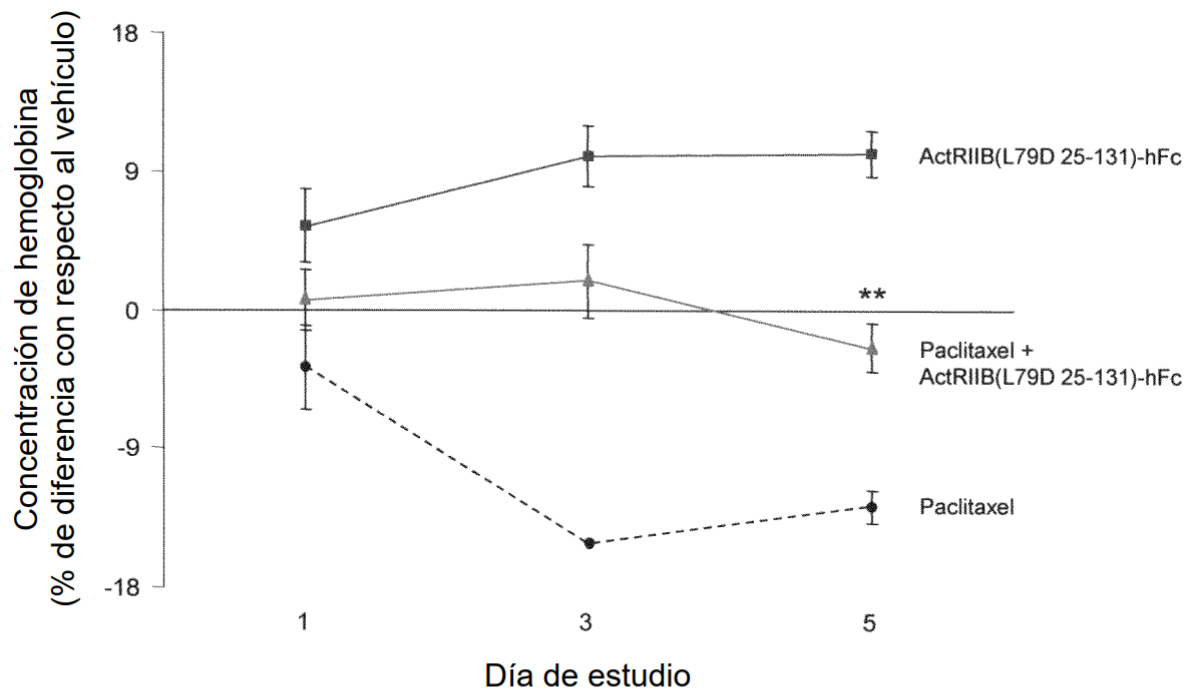


FIGURA 11

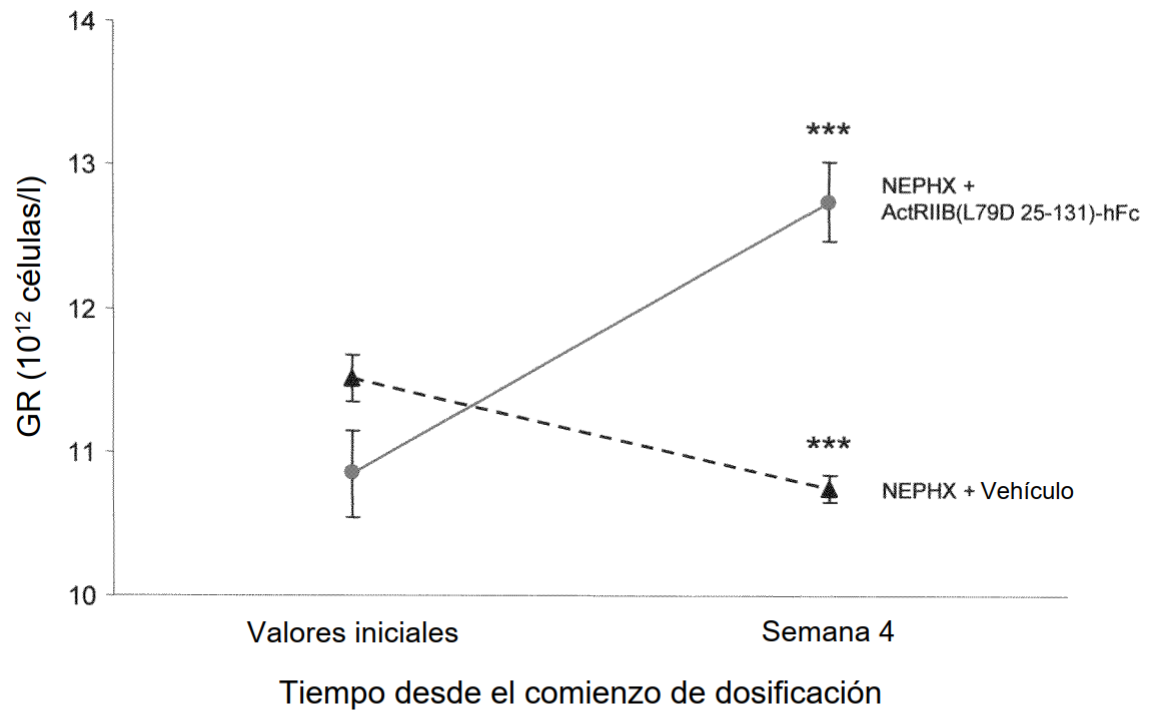


FIGURA 12

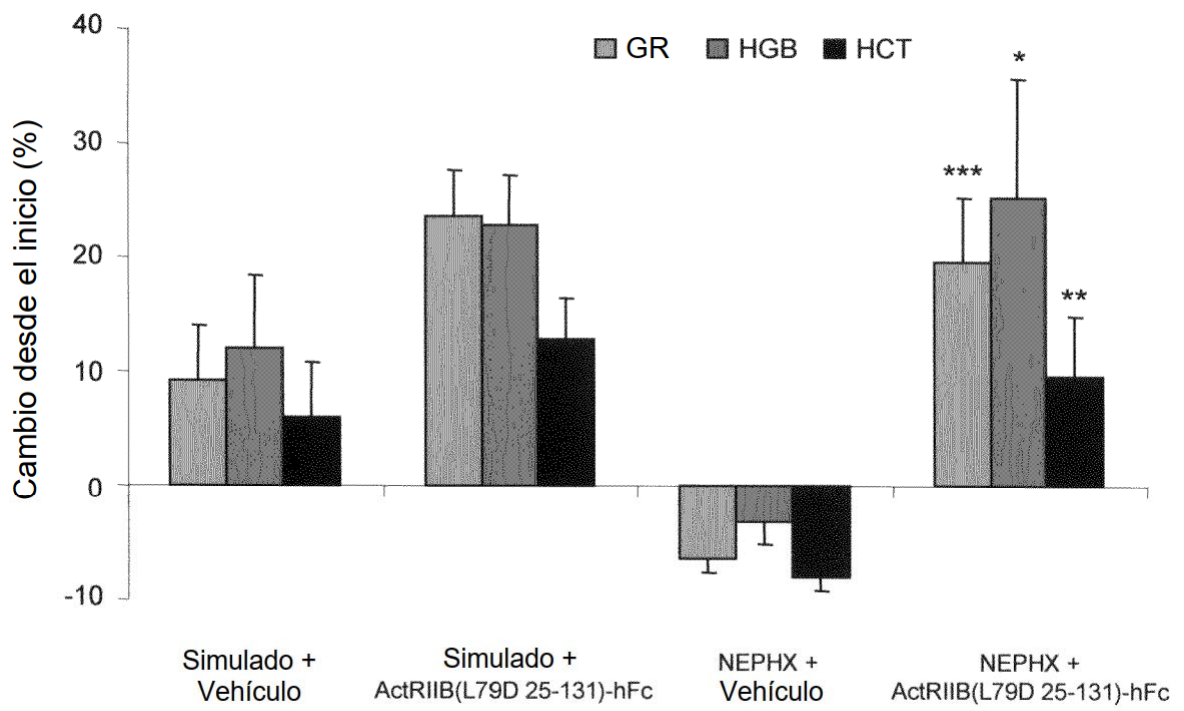


FIGURA 13

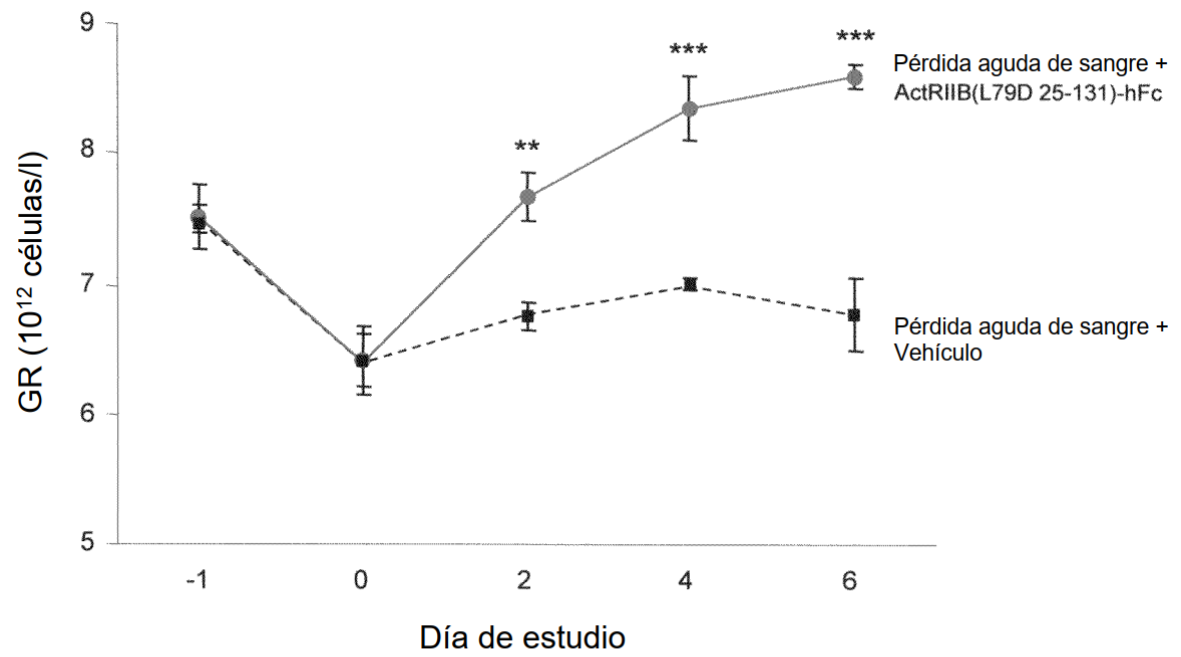


FIGURA 14

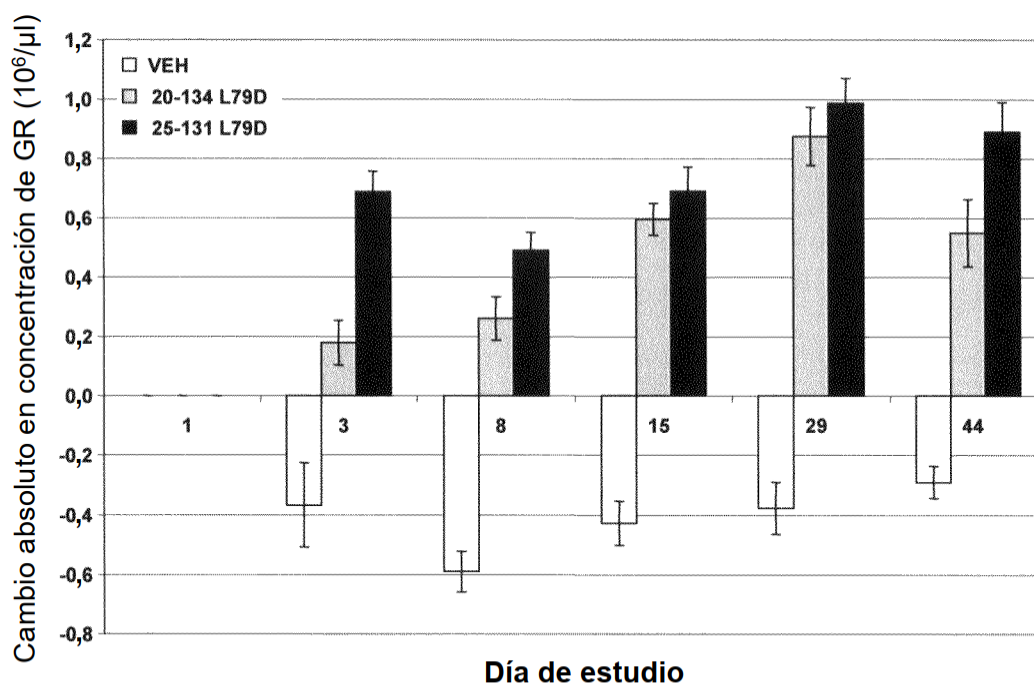


FIGURA 15

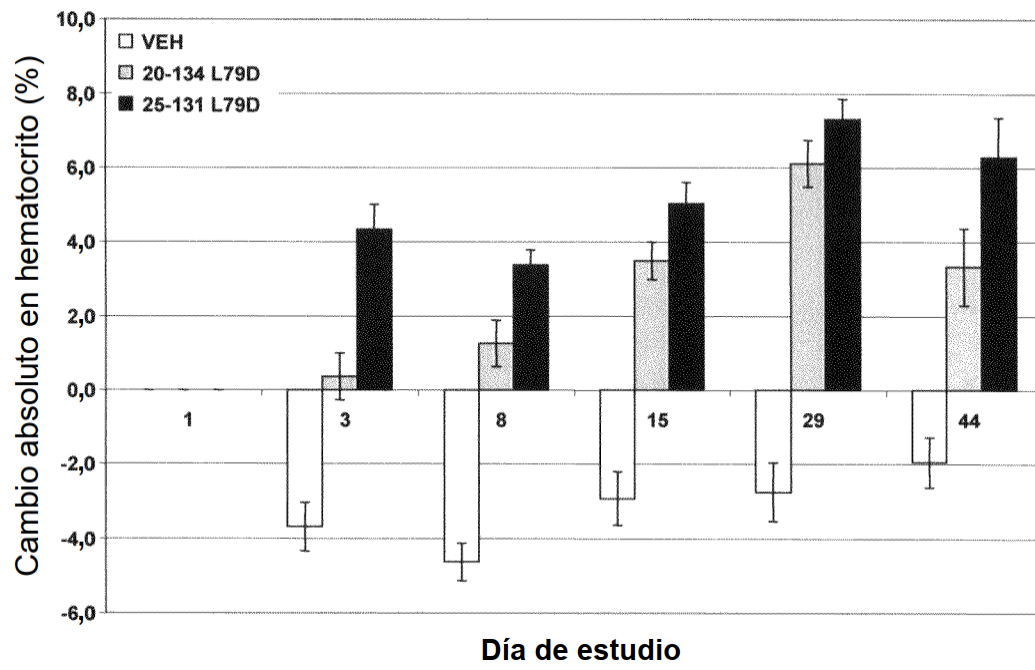


FIGURA 16

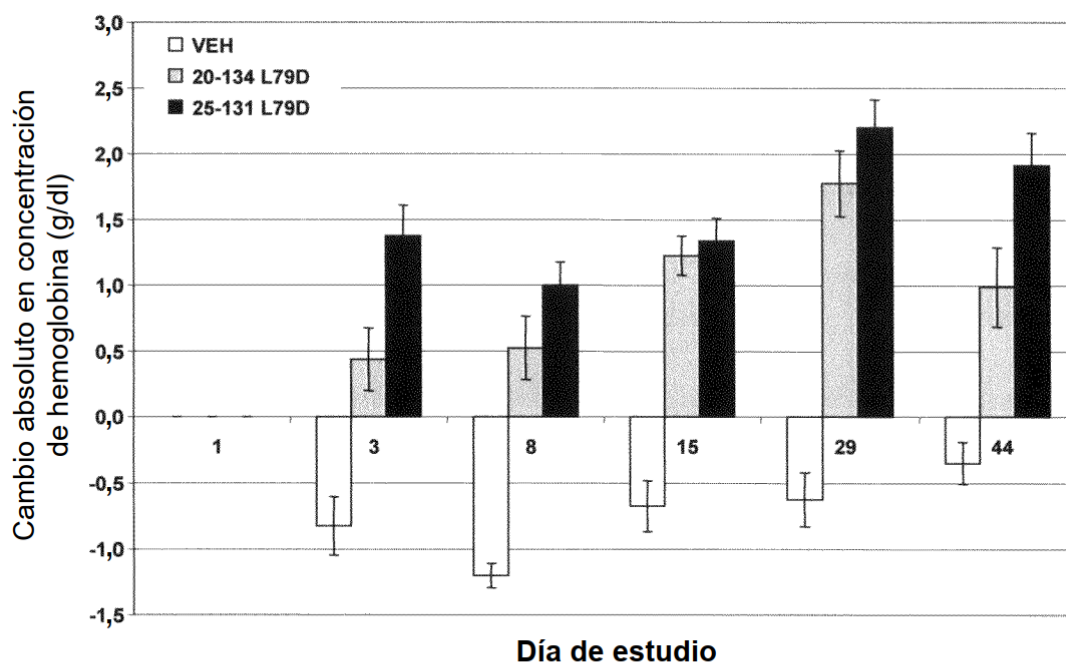


FIGURA 17

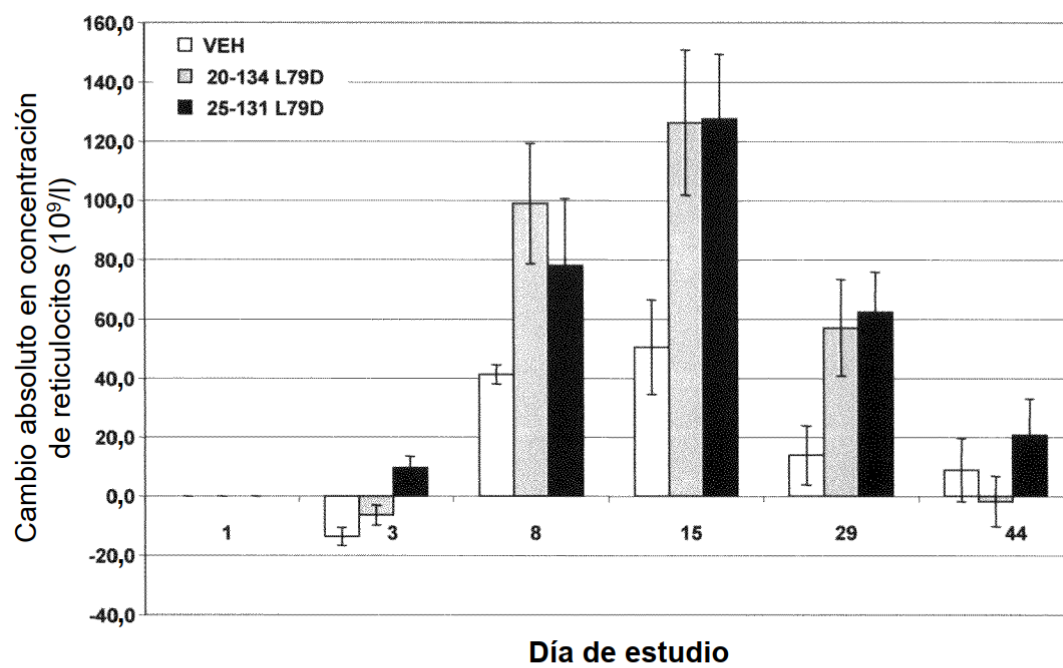


FIGURA 18