

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 734**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2007 E 07863068 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2012 EP 2124999**

54 Título: **Antagonistas de activina- ActRII y sus usos para tratar la anemia**

30 Prioridad:

18.12.2006 US 875682 P

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

25.02.2013

73 Titular/es:

**ACCELERON PHARMA, INC. (100.0%)
149 SIDNEY STREET
CAMBRIDGE, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

SHERMAN, MATTHEW L.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 396 734 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

Antagonistas de activina-ActRII y usos para tratar la anemia

5 Antecedentes de la invención

10 El glóbulo rojo maduro o eritrocito, es responsable del transporte de oxígeno en el sistema circulatorio de los vertebrados. Los glóbulos rojos transportan altas concentraciones de hemoglobina, una proteína que se une al oxígeno en los pulmones a una presión de oxígeno parcial (pO_2) relativamente alta y suministra oxígeno a las zonas del organismo con una pO_2 relativamente baja.

15 Los glóbulos rojos maduros se producen en células madre hematopoyéticas pluripotentes en un proceso denominado eritropoyesis. En individuos postnatales, la eritropoyesis se produce principalmente en la médula ósea y en la pulpa roja del bazo. La acción coordinada de varias vías de señalización controla el equilibrio de la proliferación, la diferenciación, la supervivencia y la muerte celular. En condiciones normales, los glóbulos rojos se producen a una velocidad que mantiene una masa constante de glóbulos rojos en el organismo, y la producción puede aumentar o disminuir en respuesta a diversos estímulos, que incluyen una tensión de oxígeno o demanda tisular aumentada o disminuida. El proceso de eritropoyesis comienza con la formación de células precursoras de linaje específico y avanza a través de una serie de distintos tipos de células precursoras. Las etapas finales de la eritropoyesis se producen a medida que los reticulocitos se liberan en el torrente sanguíneo y pierden sus mitocondrias y ribosomas mientras asumen la morfología de glóbulos rojos maduros. Un nivel elevado de reticulocitos, o una relación elevada reticulocito/eritrocito en la sangre, indica un aumento en las velocidades de producción de glóbulos rojos.

25 La eritropoyetina (Epo) es ampliamente reconocida como el regulador positivo más importante de la eritropoyesis en vertebrados postnatales. La Epo regula la respuesta eritropoyética compensatoria a la tensión de oxígeno tisular disminuida (hipoxia) y los bajos niveles de glóbulos rojos o los bajos niveles de hemoglobina. En los seres humanos, los niveles elevados de Epo promueven la formación de glóbulos rojos, estimulando la generación de los progenitores eritroides en la médula ósea y el bazo. En el ratón, la Epo aumenta la eritropoyesis principalmente en el bazo.

35 Los médicos utilizan diversas formas de Epo recombinante para aumentar los niveles de glóbulos rojos en diversos marcos clínicos y especialmente para el tratamiento de la anemia. La anemia es una afección ampliamente definida, caracterizada por niveles de hemoglobina o de glóbulos rojos en la sangre inferiores a los normales. En algunos casos, la anemia es causada por un trastorno primario en la producción o la supervivencia de los glóbulos rojos. Más comúnmente, la anemia es una enfermedad secundaria a enfermedades de otros sistemas (Weatherall y Provan (2000) Lancet 355, 1169-1175). La anemia puede resultar de una disminución en la velocidad de producción de los glóbulos rojos o un aumento en la velocidad de destrucción de los glóbulos rojos o por pérdida de glóbulos rojos debido a hemorragia. La anemia se puede producir a causa de diversos trastornos que incluyen, por ejemplo, insuficiencia renal crónica, síndrome mielodisplásico, artritis reumatoide y trasplante de médula ósea.

45 El tratamiento con Epo causa normalmente un aumento en la hemoglobina de aproximadamente 1-3 g/dL en seres humanos sanos en un período de semanas. Cuando se administra a individuos anémicos, este régimen de tratamiento a menudo proporciona aumentos sustanciales en los niveles de hemoglobina y glóbulos rojos, y mejora la calidad de vida y prolonga la supervivencia. La Epo no es uniformemente eficaz, y muchos individuos son resistentes incluso a dosis altas (Hori et al., (2000) Nephrol Dial Trasplant 15, 43-50). Más del 50% de los pacientes con cáncer tiene una respuesta inadecuada a la Epo, aproximadamente el 10% con enfermedad renal en etapa final tiene una respuesta inferior a la normal (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 responde favorablemente (Estey (2003) Curr Opin Hematol 10, 60-67). Varios factores, incluidos inflamación, deficiencia de hierro y vitaminas, diálisis inadecuada, toxicidad por aluminio e hiperparatiroidismo pueden predecir una mala respuesta terapéutica, aún no están claros los mecanismos moleculares de resistencia a la Epo.

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

Resumen de la invención

60 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un antagonista de activina-ActRII para usar en el tratamiento o la prevención de la anemia en un paciente humano que lo necesita, donde el antagonista de activina-ActRII es un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- a) la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 o una secuencia de aminoácidos al menos 90% o 95% idéntica a SEC ID N°: 2;
- b) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 3 o una secuencia de aminoácidos al menos 90% o 95%

idéntica a SEC. ID N°:3;

c) un polipéptido que contiene al menos 50 aminoácidos consecutivos seleccionados de SEC. ID N°: 2;

d) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 16 o una secuencia de aminoácidos al menos 90% o 95% idéntica a SEC. ID N°: 16;

5 e) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 17 o una secuencia de aminoácidos al menos 90% o 95% idéntica a SEC. ID N°: 17;

f) un polipéptido que contiene al menos 50 aminoácidos consecutivos seleccionados de SEC. ID N°: 16;

g) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 7 o una secuencia aminoácidos al menos 95% idéntica a SEC. ID N°: 7;

10 h) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 12 o una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a SEC. ID N°: 12;

i) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 20 o una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a SEC. ID N°: 20; y

15 j) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 21 o una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a SEC. ID N°: 21.

El antagonista puede ser una proteína de fusión por ejemplo, además de dicho polipéptido antagonista de activina-ActRII, una o más porciones de polipéptido que mejoren una o más de las siguientes: la estabilidad in vivo, la vida media in vivo, la absorción/administración, la localización o distribución tisular, la formación de complejos proteínicos y/o la purificación. Más específicamente, la proteína de fusión puede incluir una porción de polipéptido seleccionada del grupo que consiste en: un dominio Fc de inmunoglobulina y una albúmina sérica.

20

El polipéptido antagonista de activina o ActRII para usar según la invención puede incluir uno o más residuos de aminoácidos modificados, seleccionados entre: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a una porción lipídica y un aminoácido conjugado a un agente de derivatización orgánico.

25

La anemia es anemia que puede estar asociada a mieloma múltiple, a enfermedad renal crónica en el paciente, a quimioterapia antineoplásica del paciente, a síndrome mielodisplásico o a una talasemia.

30

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar un fármaco que aumente los niveles de glóbulos rojos, donde el método comprende:

a) poner en contacto un fármaco de interés con un polipéptido ActRII aislado que es normalmente capaz de unirse a activina;

35 b) agregar una composición que contenga activina;

c) cuantificar la eficacia del fármaco para inhibir la formación de complejos entre el polipéptido ActRII y activina;

y
d) evaluar el efecto del fármaco en los niveles de glóbulos rojos en un animal.

40 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una proteína de fusión ActRII-Fc para usar en el tratamiento o la prevención de anemia en un paciente humano que lo necesita, donde la proteína de fusión ActRII-Fc contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

a) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 3 o una secuencia que es al menos 90% o 95% idéntica a SEC. ID N°: 3,

45 b) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°:2 o una secuencia que es al menos 90% o 95% idéntica a SEC. ID N°: 2,

c) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°:7 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% o 95% idéntica a SEC. ID N°: 7,

50 d) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 12 o una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a SEC. ID N°: 12;

e) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 17 o una secuencia que es al menos 90% o 95% idéntica a SEC. ID N°: 17,

e) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 16 o una secuencia que es al menos 90% o 95% idéntica a SEC. ID N°: 16,

55 f) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°:20 o una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a SEC. ID N°: 20, y

g) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°:21 o una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a SEC. ID N°: 21.

La proteína puede causar menos de 15% de aumento en la masa del músculo esquelético del paciente. En una realización, la proteína se administra de modo que alcance una concentración sérica en el paciente de al menos 100 ng/ml durante un período de aproximadamente 20 a 30 días. La proteína se puede administrar de modo que alcance una concentración sérica en el paciente en el rango de 100 ng/ml a 1000 ng/ml. La proteína puede tener una vida media sérica entre 15 y 30 días. En ciertas realizaciones, la proteína está destinada a ser administrada al paciente con una frecuencia no mayor de una vez por semana, preferentemente no mayor de una vez por mes.

En parte, la divulgación demuestra que se pueden usar los antagonistas de la activina, así como los antagonistas de ActRIIa y ActRIIb, para aumentar los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina. En particular, la divulgación demuestra que una forma soluble de ActRIIa actúa como inhibidor de activina y, cuando se administra in vivo, aumenta los niveles sanguíneos de los glóbulos rojos. Se puede observar un efecto más suave con una forma soluble de ActRIIb, que se une a la activina A con menos afinidad que la ActRIIa soluble. Si bien ActRIIa y ActRIIb solubles pueden afectar los niveles de glóbulos rojos a través de un mecanismo diferente del antagonismo de activina, no obstante la divulgación demuestra que se pueden seleccionar agentes terapéuticos deseables, basándose en el antagonismo de activina o el antagonismo de ActRII o ambos. Dichos fármacos se denominan colectivamente antagonistas de activina-ActRII. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la invención proporciona antagonistas de activina-ActRII, que incluyen, por ejemplo, polipéptidos ActRIIa de unión a activina y polipéptidos ActRIIb de unión a activina, para aumentar los niveles de glóbulos rojos y de hemoglobina en los pacientes y para tratar trastornos asociados con bajos niveles de glóbulos rojos o de hemoglobina en pacientes que lo necesitan. Como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos N° 2007-0249022A1, los antagonistas de activina-ActRIIa se pueden usar para promover el crecimiento óseo y aumentar la densidad ósea. Como se describe en este documento, los efectos de esos antagonistas sobre los niveles de glóbulos rojos son más rápidos y se producen a dosis menores que los efectos de dichos antagonistas sobre el hueso. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, se puede usar un antagonista de activina-ActRIIa para aumentar los niveles de glóbulos rojos o hemoglobina sin causar un aumento significativo en la densidad ósea, por ejemplo, menos de 3%, 5%, 10% o 15% de aumento en la densidad ósea. Este efecto selectivo se puede lograr usando, por ejemplo, dosis menores de antagonista de activina-ActRIIa, dosis menos frecuentes o un antagonista de activina-ActRIIa de vida media sérica más corta en dosis y frecuencias calculadas para proporcionar una concentración sérica menor.

Los polipéptidos útiles en la presente invención pueden consistir en un polipéptido ActRII de unión a activina soluble que se une a activina. El polipéptido de unión a activina puede ser un polipéptido ActRIIa o un polipéptido ActRIIb. Los polipéptidos ActRII se pueden formular como una preparación farmacéutica que contenga el polipéptido ActRII de unión a activina y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El polipéptido ActRII de unión a activina se puede unir a la activina con una K_D menor de 1 micromolar o menor de 100, 10 o 1 nanomolar. Opcionalmente, el polipéptido ActRII de unión a activina se une selectivamente a activina frente a GDF11 y/o GDF8, y opcionalmente con una K_D que es al menos 10 veces, 20 veces o 50 veces menor con respecto a activina que con respecto a GDF11 y/o GDF8. Sin querer adherir a un mecanismo de acción particular, se espera que este grado de selectividad por la inhibición de activina con respecto a la inhibición de GDF11/GDF8 sea la razón de los efectos sobre el hueso o la eritropoyesis sin un efecto regularmente medible sobre el músculo. En muchas realizaciones, se seleccionará un polipéptido ActRII para que cause menos de 15%, menos de 10% o menos de 5% de aumento en el músculo a las dosis que logran efectos deseables sobre los niveles de glóbulos rojos. La composición puede ser al menos 95% pura, con respecto a otros componentes del polipéptido, evaluada por cromatografía de exclusión por tamaño, y opcionalmente, la composición es al menos 98% pura. Un polipéptido ActRIIa de unión a activina para usar en la invención puede ser cualquiera de los dados a conocer antes, como un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC. ID N°: 2, 3, 7 o 12 o que tenga una secuencia de aminoácidos que sea al menos 90%, 95%, 97% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC. ID N°: 2, 3, 7, 12 o 13. Un polipéptido ActRIIa de unión a activina puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido ActRIIa natural, como uno que comprenda al menos 10, 20 o 30 aminoácidos de una secuencia seleccionada entre SEQ ID N°: 1 a 3 o una secuencia de SEC. ID N°: 2, que carezca de los 10 a 15 aminoácidos C-terminales (la "cola"). Un polipéptido ActRIIb de unión a activina para usar en la invención puede ser cualquiera de los dados a conocer antes, como un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC. ID N°: 16, 17, 20, o 21 o que tenga una secuencia de aminoácidos que sea al menos 90%, 95%, 97% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC. ID N°: 16, 17, 20 o 21. Un polipéptido ActRIIb de unión a activina puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido ActRIIb natural, como uno que comprenda al menos 10, 20 o 30 aminoácidos de SEQ ID N°: 15 a 17 o una secuencia que carezca de los 10 a 15 aminoácidos C-terminales (la "cola") como SEC. ID N°: 17.

Un polipéptido ActRII de unión a activina soluble, puede incluir una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo en el dominio de unión al ligando) con respecto al polipéptido ActRII de origen natural. Se proporcionan ejemplos de polipéptidos ActRIIa y ActRIIb alterados en WO 2006/012627, pp. 59-60 y pp. 55-58, respectivamente. Por ejemplo, la alteración en la secuencia de aminoácidos puede, por ejemplo, alterar la glucosilación del polipéptido cuando se produce en una célula de mamífero, insectos u otra célula eucariota, o alterar la escisión proteolítica del polipéptido en relación con el polipéptido ActRII de origen natural. Un polipéptido ActRII de unión a activina útil en la invención, puede ser una proteína de fusión que tenga, como un dominio, un polipéptido

ActRII, (por ejemplo, una porción de unión al ligando de un ActRIIa o ActRIIb) y uno o más dominios adicionales que proporcionen una característica deseable, como una mejor farmacocinética, una purificación más fácil, que se dirija a tejidos particulares, etc. Por ejemplo, un dominio de una proteína de fusión puede mejorar uno o más de las siguientes: la estabilidad in vivo, la vida media in vivo, la absorción/administración, la localización o distribución tisular, la formación de complejos proteínicos, la multimerización de la proteína de fusión y/o la purificación. Una proteína de fusión ActRII de unión a activina puede incluir un dominio Fc de inmunoglobulina (tipo natural o mutante) o una albúmina sérica u otra porción de polipéptido que proporcione propiedades deseables como mejor farmacocinética, mayor solubilidad o mayor estabilidad. En una realización preferida, una fusión ActRII-Fc comprende un conector relativamente no estructurado colocado entre el dominio Fc y el dominio extracelular de ActRII. Este conector no estructurado puede corresponder a la región no estructurada de aproximadamente 15 aminoácidos en el extremo C-terminal del dominio extracelular de ActRII (la "cola"), o puede ser una secuencia artificial de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos o una longitud entre 5 y 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos que carezcan relativamente de estructura secundaria, o una mezcla de ambos. Un conector puede ser rico en residuos de glicina y prolina y puede, por ejemplo, contener una única secuencia de treonina/serina y glicinas o secuencias repetidas de treonina/serina y glicinas (p. ej., TG₄ (SEC. ID N°: 22), o singuletes o repeticiones de SG₄ (SEC. ID N°: 23)). Una proteína de fusión puede incluir una subsecuencia de purificación, como un epítipo marcador, un marcador FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión de GST. Opcionalmente, un polipéptido ActRII soluble incluye uno o más por residuos de aminoácidos modificados, seleccionados entre: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a una porción lipídica y un aminoácido conjugado a un agente de derivatización orgánico. Una preparación farmacéutica también puede incluir uno o más compuestos adicionales como un compuesto que se usa para tratar un trastorno óseo. Preferentemente, una preparación farmacéutica es sustancialmente apirógena. En general, es preferible que una proteína ActRII se exprese en una línea celular de mamíferos que medie adecuadamente la glucosilación natural de la proteína ActRII para disminuir la probabilidad de una respuesta inmunitaria desfavorable en un paciente. Se han utilizado con éxito las líneas celulares humana y CHO, y se espera que otros sistemas de expresión mamíferos comunes sean útiles.

Como se describe en este documento, las proteínas ActRIIa denominadas ActRIIa-Fc (una forma con un conector mínimo entre la porción ActRIIa y la porción Fc) tienen propiedades deseables, que incluyen la unión selectiva a activina frente a GDF8 y/o GDF11, gran afinidad de unión al ligando y mayor vida media sérica que las dos semanas en los modelos animales. En este documento se dan a conocer preparaciones farmacéuticas que contienen polipéptidos ActRII-Fc y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se dan a conocer en este documento ácidos nucleicos que codifican un polipéptido ActRII de unión a activina soluble, como un polipéptido ActRIIa o ActRIIb. Un polinucleótido aislado puede constar de una secuencia de codificación de un polipéptido ActRII de unión a activina soluble, como el descrito antes. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia de codificación de un dominio extracelular (por ejemplo, un dominio de unión al ligando) de un ActRII y una secuencia que codificaría parte o todo el dominio transmembrana y/o el dominio citoplasmático de un ActRII, pero de un codón de detención colocado dentro del dominio transmembrana o el dominio citoplasmático, o colocado entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana o citoplasmático. Por ejemplo, un polinucleótido aislado puede contener una secuencia del polinucleótido ActRIIa completo como SEC. ID N°: 4 o 5 o una secuencia del polinucleótido ActRIIb completo como SEC. ID N°: 18, o una versión parcialmente truncada de ActRIIa o ActRIIb, donde dicho polinucleótido aislado comprende además un codón de terminación de transcripción de al menos 600 nucleótidos antes del extremo 3' o de lo contrario colocado de modo que la traducción del polinucleótido dé lugar a un dominio extracelular opcionalmente fusionado a una porción truncada del ActRII completo. Una secuencia de ácido nucleico para ActRIIa es SEC. ID N°: 14. Los ácidos nucleicos dados a conocer en este documento están unidos operativamente a un promotor para la expresión, y la divulgación proporciona células transformadas con dichos polinucleótidos recombinantes. Preferentemente la célula es una célula de mamífero como una célula CHO.

Los métodos para preparar un polipéptido ActRII de unión a activina soluble, pueden incluir la expresión de cualquiera de los ácidos nucleicos (por ejemplo, SEC. ID N°: 4, 5, 14, 18 o 19) dados a conocer en este documento en una célula adecuada, como una célula de ovario de hámster chino (CHO). Dicho método puede comprender: a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido ActRII soluble, donde dicha célula es transformada con un constructo de expresión ActRII soluble; y b) recuperar el polipéptido ActRII soluble así expresado. Los polipéptidos ActRII solubles se pueden recuperar como fracciones crudas, parcialmente purificadas o muy purificadas. La purificación se puede llevar a cabo mediante una serie de pasos de purificación, que incluyen, por ejemplo, uno, dos o tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía en proteína A, cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, Q sefarosa), cromatografía de interacción hidrófoba (por ejemplo, fenilsefarosa), cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico.

Un antagonista de activina-ActRII dado a conocer en este documento, como un polipéptido ActRIIa de unión a activina soluble, o un polipéptido ActRIIb de unión a activina soluble, se puede usar en un método para promover la producción de glóbulos rojos o aumentar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto. Se dan a conocer métodos para

tratar un trastorno asociado con bajos recuentos de glóbulos rojos o bajos niveles de hemoglobina (por ejemplo una anemia), o para promover la producción de glóbulos rojos, en pacientes que lo necesitan. Un método puede comprender la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad eficaz de un antagonista de activina-ActRII. En ciertos aspectos, la divulgación proporciona usos de antagonistas de activina-ActRII para preparar un medicamento para el tratamiento de un trastorno o una afección como los descritos en este documento.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona un método para identificar un fármaco que estimule la producción de glóbulos rojos. El método comprende: a) identificar un fármaco de prueba que se une a activina o a un dominio de unión al ligando de un polipéptido ActRII; y b) evaluar el efecto del fármaco sobre los niveles de glóbulos rojos, de hemoglobina y/o de los precursores de los glóbulos rojos (por ejemplo, niveles de reticulocitos).

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la purificación de ActRIIa-hFc expresada en células CHO. La proteína se purifica como un pico único y bien definido según se visualiza mediante la columna de clasificación por tamaño (panel izquierdo) y SDS-PAGE con tinción de Coomassie (panel derecho) (carril izquierdo: estándares de peso molecular, carril derecho: ActRIIa-hFc).

La figura 2 muestra la unión de ActRIIa-hFc a activina y GDF-11, medida por el ensayo BiaCore™.

La figura 3 muestra los efectos de ActRIIa-hFc sobre el recuento de glóbulos rojos en primates no humanos hembra. Se trataron monos filipinos hembra (cuatro grupos de cinco monos cada uno) con placebo o 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg de ActRIIa-hFc el día 0, el día 7, el día 14 y el día 21. La figura 3A muestra recuentos de glóbulos rojos (RGR). La figura 3B muestra los niveles de hemoglobina. La significación estadística es con relación a la línea de base (valores al inicio) para cada grupo de tratamiento. El día 57, permanecían dos monos en cada grupo.

La figura 4 muestra los efectos de ActRIIa-hFc sobre el recuento de glóbulos rojos en primates no humanos macho. Se trataron monos filipinos macho (cuatro grupos de cinco monos cada uno) con placebo o 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg de ActRIIa-hFc el día 0, el día 7, el día 14 y el día 21. La figura 4A muestra recuentos de glóbulos rojos (RGR). La figura 4B muestra los niveles de hemoglobina. La significación estadística es con relación a la línea de base para cada grupo de tratamiento. El día 57, permanecían dos monos en cada grupo.

La figura 5 muestra los efectos de ActRIIa-hFc sobre el recuento de reticulocitos en primates no humanos hembra. Se trataron monos filipinos (cuatro grupos de cinco monos cada uno) con placebo o 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg de ActRIIa-hFc el día 0, el día 7, el día 14 y el día 21. La figura 5A muestra los recuentos absolutos de reticulocitos. La figura 5B muestra el porcentaje de reticulocitos con relación a los recuentos de glóbulos rojos. La significación estadística es con respecto a la línea de base para cada grupo. El día 57, permanecían dos monos en cada grupo.

La figura 6 muestra los efectos de ActRIIa-hFc sobre el recuento de reticulocitos en primates no humanos hembra. Se trataron monos filipinos (cuatro grupos de cinco monos cada uno) con placebo o 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg de ActRIIa-hFc el día 0, el día 7, el día 14 y el día 21. La figura 6A muestra los recuentos absolutos de reticulocitos. La figura 6B muestra el porcentaje de reticulocitos con relación a los recuentos de glóbulos rojos. La significación estadística es con respecto a la línea de base para cada grupo. El día 57, permanecían dos monos en cada grupo.

La figura 7 muestra los resultados del ensayo clínico en humanos descrito en el ejemplo 5, donde el área bajo la curva (AUC) y la dosis administrada de ActRIIa-hFc tienen una correlación lineal, independientemente de si ActRIIa-hFc se administró por vía intravenosa (IV) o subcutánea (SC).

La figura 8 muestra una comparación de los niveles séricos de ActRIIa-hFc en pacientes a los que se les administró por vía IV o SC.

La figura 9 muestra los niveles de fosfatasa alcalina ósea (BAP) en respuesta a diferentes niveles de dosis de ActRIIa-hFc. BAP es un marcador para el crecimiento óseo anabólico.

La figura 10 ilustra el cambio medio desde la línea de base de los niveles de hematocrito del ensayo clínico en humanos descrito en el ejemplo 5. ActRIIa-hFc se administró por vía intravenosa (IV) a la dosis indicada.

La figura 11 ilustra el cambio medio desde la línea de base de los niveles de hemoglobina en el ensayo clínico en humanos descrito en el ejemplo 5. ActRIIa-hFc se administró por vía intravenosa (IV) a la dosis indicada.

La figura 12 ilustra el cambio medio desde la línea de base del recuento de glóbulos rojos (eritrocitos) del ensayo clínico en humanos descrito en el ejemplo 5. ActRIIa-hFc se administró por vía intravenosa (IV) a la dosis indicada.

La figura 13 ilustra el cambio medio desde la línea de base del recuento de reticulocitos del ensayo clínico en

humano descrito en el ejemplo 5. ActRIIa-hFc se administró por vía intravenosa (IV) en la dosis indicada.

Descripción detallada de la invención

5 1. Visión general

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) contiene diversos factores de crecimiento que comparten elementos de secuencia comunes y motivos estructurales. Se sabe que esas proteínas ejercen efectos biológicos sobre una gran variedad de tipos de células tanto en vertebrados como invertebrados. Los integrantes de la superfamilia realizan funciones importantes durante el desarrollo embrionario en la formación del patrón y la especificación del tejido y pueden influir sobre diversos procesos de diferenciación, incluidos 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/Activina/BMP10, cuyos integrantes tienen efectos diversos, a menudo complementarios. Manipulando la actividad de un integrante de la familia de TGF-beta, a menudo es posible causar cambios fisiológicos significativos en un organismo. Por ejemplo, las razas de ganado piamontés y belga azul tienen una mutación de pérdida de función en el gen GDF8 (también denominado miostatina) que provoca un marcado aumento de la masa muscular. Grobet et al., Nat Genet. 1997, 17(1):71-4. Además, en humanos los alelos inactivos de GDF8 se asocian a mayor masa muscular y según se dice, una fortaleza excepcional. Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350:2682-8.

Las activinas son factores de crecimiento, polipéptidos diméricos, que pertenecen a la superfamilia de TGF-beta. Existen tres formas principales de activina (A, B y AB) que son homo/heterodímeros de dos subunidades β estrechamente relacionadas ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$ y $\beta_A\beta_B$, respectivamente). El genoma humano también codifica una activina C y una activina E, que se expresan principalmente en el hígado, y también se conocen formas heterodiméricas que contienen β_C o β_E . En la superfamilia de TGF-beta, las activinas son factores únicos y multifuncionales que pueden estimular la producción hormonal en células de ovario y placenta, ayudan a la supervivencia de células neuronales, influyen positiva o negativamente en el progreso del ciclo celular dependiendo del tipo de célula e inducen 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, el factor de diferenciación eritroide (FED) aislado de las células leucémicas monocítica estimuladas humanas resultó para ser idéntico a activina A (Murata et al., 1988, PNAS, 85:2434). Se ha sugerido que la activina A promueve 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 folículo-estimulante (FSH) desde la hipófisis, la activina promueve la secreción y la síntesis de FSH, mientras la inhibina evita la secreción y la síntesis de FSH. Otras proteínas que pueden regular la bioactividad de la activina y/o unirse a la activina incluyen la folistatina (FS), la proteína relacionada a folistatina (FSRP) y la α_2 -macroglobulina.

Las señales de TGF- β son mediadas por complejos heteroméricos de receptores de serina/treonina quinasa tipo I y tipo II, los cuales fosforilan y activan secuencia abajo las proteínas Smad luego de 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 de un dominio extracelular de unión al ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con especificidad pronosticada de serina/treonina. Los receptores tipo I son esenciales para la señalización; y los receptores tipo II son necesarios para unir ligandos y para la expresión de los receptores tipo I. Los receptores de activina tipos I y II forman un complejo estable luego de la unión del ligando, que da lugar a la fosforilación de los receptores tipo I por los receptores tipo II.

Se identificaron dos receptores tipo II relacionados (ActRII), ActRIIa y ActRIIb, como 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 interaccionar bioquímicamente con varias otras proteínas de la familia de 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 principal receptor tipo I para las activinas, particularmente para la activina A, y ALK-7 también puede servir como receptor para las activinas, particularmente para la activina B.

Como se demostró en este documento, un polipéptido ActRIIa soluble (sActRIIa), que muestra una preferencia sustancial por unirse a la activina A a diferencia de otros integrantes de la familia de TGF-beta, como GDF8 o GDF11, es eficaz para aumentar los niveles de glóbulos rojos in vivo. Sin desear adherir a ningún mecanismo particular, se espera que el efecto de sActRIIa sea causado principalmente por un efecto antagonista de la activina, dada la muy fuerte unión a la activina (constante de disociación picomolar) exhibida por el constructo sActRIIa particular utilizado en esos estudios. Independientemente del mecanismo, resulta evidente a partir de esta divulgación que los antagonistas de ActRIIa-activina aumentan los niveles de glóbulos rojos en roedores, monos y seres humanos. Debe señalarse que la hematopoyesis es un proceso complejo, regulado por diversos factores, que incluyen la homeostasia de eritropoyetina, G-CSF y hierro. Las expresiones "aumenta los niveles de glóbulos rojos" y "promueve la formación de glóbulos rojos" se refieren a mediciones clínicamente observables, como el hematocrito,

el recuento de glóbulos rojos y las mediciones de hemoglobina y pretenden ser neutras en cuanto al mecanismo por el cual se producen esos cambios.

5 Como también se demostró en este documento, un polipéptido ActRIIb soluble (sActRIIb) es eficaz para aumentar el nivel de reticulocitos in vivo, un efecto que, se espera que cause un aumento de los niveles de hemotocrito durante un periodo más prolongado .

10 Los datos reportados en el presente documento con respecto a los primates no humanos son reproducibles también en ratones, ratas y seres humanos, y por lo tanto, se pueden utilizar polipéptidos ActRII y otros antagonistas de activina-ActRII para promover la producción de glóbulos rojos y aumentar los niveles de glóbulos rojos en mamíferos, desde roedores hasta seres humanos. Los antagonistas de activina-ActRII incluyen, por ejemplo, polipéptidos ActRIIa de unión a activina solubles, polipéptidos ActRIIb de unión a activina solubles, anticuerpos que se unen a activina (particularmente a las subunidades de activina A o B, también denominadas βA o βB) y desestabilizan la unión de ActRIIa y/o ActRIIb, anticuerpos que se unen a ActRIIa y desestabilizan la unión de activina, anticuerpos que se unen a ActRIIb y desestabilizan la unión de activina, proteínas no anticuerpos seleccionadas para la unión de activina, ActRIIb o ActRIIa (véase por ejemplo, WO/2002/088171, WO/2006/055689 y WO/2002/032925 por ejemplos de dichas proteínas y métodos para diseñarlas y seleccionarlas), péptidos aleatorios seleccionados para la unión de activina, ActRIIb o ActRIIa, a menudo fijados a un dominio Fc. Dos proteínas diferentes (u otras porciones) con actividad de unión a activina, ActRIIb o ActRIIa, especialmente ligantes de activina que bloquean los sitios de unión del receptor tipo I (por ejemplo, un receptor de activina tipo I soluble) y tipo II (por ejemplo, un receptor de activina tipo II soluble), respectivamente, se pueden unir entre sí para crear una molécula de unión bifuncional. Aptámeros de ácido nucleico, moléculas pequeñas y otros agentes que inhiben el eje de señalización de activina-ActRII se incluyen como antagonistas de activina-ActRII. Diversas proteínas tienen actividad antagonista de activina-ActRII, incluida la inhibina (es decir, la subunidad alfa de inhibina), aunque la inhibina no antagoniza universalmente a la activina en todos los tejidos, folistatina (p. ej., folistatina-288 y folistatina-315), FSRP, activina C, alfa (2)-macroglobulina y un mutante de activina A M108A (cambio de metionina a alanina en la posición 108). En general, formas alternativas de activina, particularmente aquellas con alteraciones en el dominio de unión del receptor tipo I se pueden unir a receptores tipo II y no pueden formar un complejo ternario activo, actuando por lo tanto como antagonistas. Además se pueden usar ácidos nucleicos, como moléculas antisentido, ARNip o ribozimas que inhiben la activina A, B, C o E, o, particularmente, la expresión de ActRIIa o ActRIIb, como antagonistas de activina-ActRII. El antagonista de activina-ActRII para usar, puede tener selectividad por la inhibición de la señalización mediada por activina frente a otros miembros de la familia de TGF-beta, y particularmente con respecto a GDF8 y GDF11.

35 Los términos utilizados en esta especificación tienen en general los significados corrientes en el área, en el contexto de esta invención y en el contexto específico en el que cada término es utilizado. Algunos términos se discuten a continuación o en otra parte de la especificación, para proporcionar orientación adicional a quien la practique al describir las composiciones y los métodos de la invención y cómo prepararlas y utilizarlas. El alcance o el significado de cualquier uso de un término resultará evidente a partir del contexto específico en que se utiliza el término.

40 "Alrededor de" y "aproximadamente" significarán generalmente un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o la precisión de las mediciones. Habitualmente, grados de error de ejemplo suelen estar dentro del 20 por ciento (%), preferentemente dentro del 10% y más preferentemente dentro del 5% de un determinado valor o rango de valores.

45 Alternativamente y, en particular en sistemas biológicos, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" pueden significar los valores que están dentro de un orden de magnitud, preferentemente en un entorno de 5 veces y más preferentemente en un entorno de 2 veces un determinado valor. Las cantidades numéricas presentadas en este documento son aproximadas a menos que se indique lo contrario, lo que significa que se puede inferir el término "alrededor de" o "aproximadamente" cuando no haya sido expresamente indicado.

50 Las secuencias se pueden comparar entre sí, incluidas la secuencia natural y una o más mutantes (variantes de secuencia). Dichas comparaciones comprenden habitualmente alineamientos de secuencias de polímeros, por ejemplo, usando programas de alineamiento de secuencias y/o algoritmos que son bien conocidos en el área (como BLAST, FASTA y MEGALIGN, por nombrar unos pocos). El experto puede apreciar fácilmente que, en tales alineaciones, cuando una mutación contiene una inserción o delección de un residuo, la alineación de secuencias introducirá un "hueco" (gap) (normalmente representado por un guión, o "A") en la secuencia del polímero que no contiene el residuo insertado o eliminado.

60 "Homóloga", en todas sus formas gramaticales y variaciones de ortografía, se refiere a la relación entre dos proteínas que poseen un "origen evolutivo común," incluidas las proteínas de superfamilias de la misma especie de organismos, así como las proteínas homólogas de diferentes especies de organismos. Dichas proteínas (y los ácidos nucleicos que las codifican) 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, alude al grado de identidad o correspondencia entre secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos que pueden o no compartir un origen evolutivo común.

Sin embargo, en el uso común y en esta solicitud, el término "homóloga", cuando es modificado con un adverbio, como "altamente", puede referirse a la similitud de secuencia, y puede relacionarse, o no, con un origen evolutivo común.

2. Polipéptidos ActRII

En ciertos aspectos, la presente invención se refiere a ciertos polipéptidos ActRII para usar en el tratamiento o la prevención de la anemia. Según se usa en este documento, el término "ActRII" se refiere a la familia de receptores de activina tipo II. Esta familia incluye el receptor de activina tipo IIa y el receptor de activina tipo IIb.

Según se usa en este documento, el término "ActRIIa" se refiere a proteínas de una familia de receptores de activina tipo IIa (ActRIIa) de cualquier especie, y a variantes derivadas de dichas proteínas ActRIIa por mutagénesis u otra modificación. La referencia a ActRIIa en el presente documento se entiende como una referencia a cualquiera de las formas identificadas en la actualidad. Los integrantes de la familia de ActRIIa son generalmente proteínas transmembrana, compuestas de un dominio extracelular de unión al ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad pronosticada de serina/treonina quinasa.

La expresión "polipéptido ActRIIa" incluye polipéptidos que contienen cualquier polipéptido de origen natural de un integrante de la familia de ActRIIa, así como cualquiera de sus variantes (que incluyen mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que conserven una actividad útil. Véase por ejemplo WO/2006/012627. Por ejemplo, los polipéptidos ActRIIa incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier ActRIIa conocido que tenga una secuencia por lo menos 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido ActRIIa y opcionalmente al menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o más de identidad. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIa de la invención se puede unir a, y puede inhibir la función de, una proteína ActRIIa y/o activina. Un polipéptido ActRIIa se puede seleccionar para que tenga actividad de promoción de la formación de glóbulos rojos in vivo. Los ejemplos de polipéptidos ActRIIa incluyen el polipéptido precursor de ActRIIa humano (SEC. ID N°: 1) y polipéptidos ActRIIa solubles humanos (p. ej., SEQ ID N°: 2, 3, 7 y 12).

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

MGAAAKLFAVFLISCSSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEP
CYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSP
EVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTOPTSNPVTPKPPYYNILLVSLVPL
 MLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLVPTQDPGPPPPSPLLGLKPLQLLE
 VKARGRFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKHEN
 ILQFIGAEKRGTSDVDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVVSWNELCHIAE
 TMARGLAYLHEDI PGLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFLG
 ALKFEAGKSAGDTHGOVGTRRYMAPEVLEGAINFORDAFLRIDMYAMGL
 VLWELASRCTAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEDMQEVVVHKKRPVL
 RDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMQRLTNIIT
 TEDI VTVVTMVTNVDFPPKESL (SEQ ID NO: 1)

El péptido señal está subrayado simple; el dominio extracelular está en negrita y los posibles sitios de glucosilación unidos a N están subrayados doble.

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

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISG
SIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP
EMEVTOPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 2)

ES 2 396 734 T3

El extremo C-terminal "cola" del dominio extracelular está subrayado. La secuencia con la "cola" eliminada (una secuencia $\Delta 15$) es la siguiente:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTVGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISG
SIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP
EM (SEQ ID NO:3)

5 La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína precursora de ActR1la humano es la siguiente (nucleótidos 164-1705 de Genbank entrada NM_001616):

ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGCCGTCTTTCTTATCTCCTGTT
CTTCAGGTGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTCTT
TAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAAGTGGTGTGAACCG
TGTTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGA
ATATTTCTGGTTCCATTGAAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGA
TATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCT
GAAGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTT
CTTATTTTCCAGAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTAC
ACCTAAGCCACCCTATTACAACATCCTGCTCTATTCTTGGTGCCACTT
ATGTTAATTGCGGGGATTGTCATTTGTGCATTTTGGGTGTACAGGCATC
ACAAGATGGCCTACCCCTCTGTACTTGTCCAACCAAGACCCAGGACC
ACCCCCACCTTCTCCATTACTAGGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAA
GTGAAAGCAAGGGGAAGATTTGGTTGTGTCTGGAAAGCCAGTTGCTTA
ACGAATATGTGGCTGTCAAAATATTTCCAATACAGGACAAACAGTCATG
GCAAAATGAATACGAAGTCTACAGTTTGCCTGGAATGAAGCATGAGAAC
ATATTACAGTTCATTGGTGCAGAAAAACGAGGCACCAGTGTGATGTGG
ATCTTTGGCTGATCACAGCATTTTCATGAAAAGGGTTCACTATCAGACTT
TCTTAAGGCTAATGTGGTCTCTTGAATGAACTGTGTCATATTGCAGAA
ACCATGGCTAGAGGATTGGCATATTTACATGAGGATATACCTGGCCTAA
AAGATGGCCACAAACCTGCCATATCTCACAGGGACATCAAAGTAAAAA
10 TGTGCTGTTGAAAAACAACCTGACAGCTTGCAATGCTGACTTTGGGTTG
GCCTTAAAATTTGAGGCTGGCAAGTCTGCAGGCGATACCCATGGACAGG
TTGGTACCCGGAGGTACATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTGTATATAA
CTTCAAAGGGATGCATTTTTGAGGATAGATATGTATGCCATGGGATTA
GTCCTATGGGAACTGGCTTCTCGCTGTACTGCTGCAGATGGACCTGTAG
ATGAATACATGTTGCCATTTGAGGAGGAAATTGGCCAGCATCCATCTCT
TGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGTGCATAAAAAAAGAGGCCTGTTTTA
AGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGAATGGCAATGCTCTGTGAAACCA
TTGAAGAATGTTGGGATCACGACGCAGAAGCCAGGTTATCAGCTGGATG
TGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCAGAGACTAACAAATATTATTACC
ACAGAGGACATTGTAACAGTGGTCACAATGGTGACAAATGTTGACTTTC
CTCCCAAAGAATCTAGTCTATGA (SEQ ID NO: 4)

La secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIa soluble (extracelular) humano es la siguiente:

ATACTTGGTAGATCAGAAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATT
 GGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCGTGTATGGTGA
 CAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGT
 TCCATTGAAATAGTGAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAAACCTGCT
 ATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTT
 TTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCA
 GAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCAC
 CC (SEQ ID NO: 5)

5 Según se usa en este documento, el término "ActRIIb" se refiere a una familia de proteínas que son receptores de
 activina tipo IIb (ActRIIb) de cualquier especie y a las variantes derivadas de dichas proteínas ActRIIb por
 mutagénesis u otra modificación. La referencia a ActRIIb en el presente documento se entiende como una referencia
 a cualquiera de las formas identificadas en la actualidad. Los integrantes de la familia de ActRIIb son generalmente
 proteínas transmembrana, compuestas de un dominio extracelular de unión al ligando con una región rica en
 10 cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad prevista de serina/treonina quinasa.

10 La expresión "polipéptido ActRIIb" incluye polipéptidos que contienen cualquier polipéptido de origen natural de un
 integrante de la familia de ActRIIb, así como sus variantes (que incluyen mutantes, fragmentos, fusiones y formas
 peptidomiméticas) que conserven una actividad útil. Véase por ejemplo WO/2006/012627. Por ejemplo, los
 polipéptidos ActRIIa son polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier ActRIIa conocido que tenga una
 15 secuencia al menos 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido ActRIIa y opcionalmente al menos 85%, 90%,
 95%, 97%, 99% o más de identidad. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIb de la invención se puede unir a, y puede
 inhibir la función de, una proteína ActRIIb y/o activina. Un polipéptido ActRIIb se puede seleccionar para que tenga
 actividad de promoción de la formación de glóbulos rojos in vivo. Los ejemplos de polipéptidos ActRIIb incluyen el
 polipéptido precursor de ActRIIb humano (SEC. ID N°: 15) y polipéptidos ActRIIb solubles humanos (p. ej., SEC. ID
 20 N°: 16, 17, 20 y 21).

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

MTAPWVALALLWGSLWPG**SGRGEAETRECIYYNANWELERTN**Q**SGLERC**
EGEQDKRLHCYASWAN**SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ**
VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIG
 GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPSPLVGLKPLQLLEIK
 ARGREGCVWKAQLMNDVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLL
 QFIAAEKGRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGKNIITWNECHVAETM
 SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLA
 VRFEPGKPPGDTHGQVGTTRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLV
 LWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSEELQEVVVHKKMRPTIK
 DHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS
 25 DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEQ ID NO: 15)

El péptido señal está subrayado simple; el dominio extracelular está en negrita y los posibles sitios de glucosilación
 unidos a N están en cuadros.

La secuencia de polipéptido procesado ActRIIb soluble (extracelular) humano, es la siguiente:

SGRGEAETRECIYYNANWELERTN**Q**SGLERCE**EGEQDKRLH**CYASWAN**SS**
 GTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEEN**PQ**VYFCCCEGNFCNERF**THL**
 PEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 16)

ES 2 396 734 T3

La "cola" C-terminal del dominio extracelular está debilitada. La secuencia con la "cola" eliminada (una secuencia $\Delta 15$) es la siguiente:

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSS
GTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHL
PEA (SEQ ID NO: 17)

5 La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína precursora de ActRIIb humano es la siguiente: (nucleótidos 5-1543 de Genbank entrada NM_001106)

ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGGC
CCGGCTCTGGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAA
CGCCAACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGC
GAAGGGGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACA
GCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTT
CAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAG
GTGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTC
ATTTGCCAGAGGCTGGGGGCCCGGAAGTACGTACGAGCCACCCCCGAC
AGCCCCACCCTGCTCACGGTGTGGCCTACTCACTGCTGCCCATCGGG
GGCCTTTCCCTCATCGTCCTGCTGGCCTTTTGGATGTACCGGCATCGCA
AGCCCCCTACGGTCATGTGGACATCCATGAGGACCCTGGGCCTCCACC
ACCATCCCCCTCTGGTGGGCCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAAG
GCTCGGGGGCGCTTTGGCTGTGTCTGGAAGGCCAGCTCATGAATGACT
TTGTAGCTGTCAAGATCTTCCACTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAG
TGAACGGGAGATCTTACGACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCTGCTA
CAGTTCATTGCTGCCGAGAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAGCTGT
GGCTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCCTCACGGATTACCTCAA
GGGGAACATCATCACATGGAACGAACTGTGTCATGTAGCAGAGACGATG
TCACGAGGCCTCTCATACCTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGGCGTGGCG
AGGGCCACAAGCCGTCTATTGCCACAGGGACTTTAAAAGTAAGAATGT
ATTGCTGAAGAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCTGACTTTGGCTTGGCT
GTTTCGATTTGAGCCAGGGAAACCTCCAGGGGACACCCACGGACAGGTAG
GCACGAGACGGTACATGGCTCCTGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTT
CCAGAGAGATGCCTTCCTGCGCATTGACATGTATGCCATGGGGTTGGTG
CTGTGGGAGCTTGTGTCTCGCTGCAAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATG
10 AGTACATGCTGCCCTTTGAGGAAGAGATTGGCCAGCACCTTCGTTGGA
GGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTGCACAAGAAGATGAGGCCACCATTAAA
GATCACTGGTTGAAACACCCGGGCCTGGCCCAGCTTTGTGTGACCATCG
AGGAGTGTGGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTGTCCGCGGGCTGTGT
GGAGGAGCGGGTGTCCCTGATTCGGAGGTCGGTCAACGGCACTACCTCG
GACTGTCTCGTTTCCCTGGTGACCTCTGTCCCAATGTGGACCTGCCCC
CTAAAGAGTCAAGCATCTAA (SEQ ID NO: 18)

La secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIa soluble (extracelular) humano es la siguiente:

```
TCTGGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCA
ACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGG
CGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACAGCTCT
GGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACT
GCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTA
CTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTTG
CCAGAGGCTGGGGGCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCGACAGCCC
CCACC (SEQ ID NO: 19)
```

5 En una realización específica, la invención se refiere a usos de ciertos polipéptidos ActRII solubles. Según se describe en este documento, la expresión "polipéptido ActRII soluble" se refiere generalmente a polipéptidos que contienen un dominio extracelular de una proteína ActRIIa o ActRIIb. La expresión "polipéptido ActRII soluble" según se usa en este documento, incluye cualquier dominio extracelular de origen natural de una proteína ActRIIa o ActRIIb, así como cualquiera de sus variantes (que incluyen mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas). Un polipéptido ActRII de unión a activina es aquel que conserva la capacidad de unirse a la activina, incluidas, por ejemplo, activina AA, AB, BB o formas que incluyan la subunidad C o E. Opcionalmente, un polipéptido ActRII de unión a activina se unirá a la activina AA con una constante de disociación de 1 nM o menor. El dominio extracelular de una proteína ActRII se une a activina y es generalmente soluble y por lo tanto se puede denominar polipéptido ActRII de unión a activina soluble. Los ejemplos de polipéptidos ActRIIa de unión a activina solubles, incluyen los polipéptidos solubles ilustrados en SEQ ID N°: 2, 3, 7, 12 y 13. SEC. ID N°: 7 se conoce como ActRIIa-hFc y se describe más profundamente en los ejemplos. Otros ejemplos de polipéptidos ActRIIa de unión a activina solubles, comprenden una secuencia señal además del dominio extracelular de una proteína ActRIIa, por ejemplo, la secuencia líder melitina de miel de abeja (SEC. ID N°: 8), la secuencia líder activador tisular del plasminógeno (TPA) (SEC. ID N°: 9) o la secuencia líder ActRIIa natural (SEC. ID N°: 10). El polipéptido ActRIIa-hFc ilustrado en SEC. ID N°: 13 utiliza una secuencia líder TPA. Los ejemplos de polipéptidos ActRIIb de unión a activina solubles, incluyen los polipéptidos solubles ilustrados en SEQ ID N°: 16, 17, 20. Los polipéptidos ActRIIb de unión a activina también pueden contener una secuencia señal además del dominio extracelular de una proteína ActRIIb, por ejemplo, la secuencia líder melitina de miel de abeja (SEC. ID N°: 8) o la secuencia líder activador tisular del plasminógeno (TPA) (SEC. ID N°: 9).

25 Los fragmentos funcionalmente activos de los polipéptidos ActRII se pueden obtener mediante cribado de polipéptidos producidos recombinantemente a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRII. Además, los fragmentos se pueden sintetizar químicamente utilizando técnicas conocidas en el área como la técnica en fase sólida de Merrifield o la química f-Moc o t-Boc convencionales. Los fragmentos se pueden producir (recombinantemente o por síntesis química) y probar para identificar aquellos fragmentos peptídico que pueden actuar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRII o la señalización mediada por activina.

30 Las variantes funcionalmente activas de los polipéptidos ActRII se pueden obtener por cribado de colecciones de polipéptidos modificados producidos recombinantemente a partir de los ácidos nucleicos mutados correspondientes que codifican un polipéptido ActRII. Las variantes se pueden producir y probar para identificar las que pueden actuar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRII o la señalización mediada por activina. Una variante funcional de los polipéptidos ActRIIa puede contener una secuencia de aminoácidos que es al menos 75% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID N°: 2 o 3. En ciertos casos, la variante funcional tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID N°: 2 o 3. Una variante funcional de los polipéptidos ActRIIb puede contener una secuencia de aminoácidos que es al menos 75% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID N°: 16 o 17. En ciertos casos, la variante funcional tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID N°: 17 o 18.

45 Las variantes funcionales se pueden generar modificando la estructura de un polipéptido ActRII para fines tales como aumentar la eficacia terapéutica, o la estabilidad (por ejemplo, la vida útil ex vivo y la resistencia a la degradación proteolítica in vivo). Dichos polipéptidos ActRII modificados cuando se seleccionan para que conserven la unión a activina, se consideran equivalentes funcionales de los polipéptidos ActRII naturales. Los polipéptidos ActRII modificados también se pueden producir, por ejemplo, mediante sustitución, delección o adición de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o una valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado (por ejemplo, mutaciones conservadoras) no tendrá un efecto importante

en la actividad biológica de la molécula resultante. Los reemplazos conservadores son los que tienen lugar en una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActRII da como resultado un homólogo funcional, se puede determinar fácilmente mediante evaluación de la capacidad del polipéptido ActRII variante para producir una respuesta en las células de manera similar al polipéptido ActRII natural.

En ciertas realizaciones, la divulgación actual contempla mutaciones específicas de los polipéptidos ActRII con el fin de alterar la glucosilación del polipéptido. Dichas mutaciones se pueden seleccionar con el fin de introducir o eliminar uno o más sitios de glucosilación, como sitios de glucosilación unidos a O o a N. Los sitios de reconocimiento de glucosilación unidos a asparagina comprenden generalmente una secuencia de tres péptidos, asparagina-X-treonina o asparagina-X-serina (donde "X" es cualquier aminoácido) que es reconocido específicamente por las enzimas de glucosilación celular adecuadas. La alteración también se puede hacer mediante adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del polipéptido ActRII natural (para sitios de glucosilación unidos a O). Diversas sustituciones o deleciones de aminoácidos en una o ambas posiciones del primer o tercer aminoácido de un sitio de reconocimiento de glucosilación (y/o deleción de aminoácidos en la segunda posición) se traduce en no-glucosilación en la secuencia del tripéptido modificado. Otro medio de aumentar el número de porciones carbohidrato en un polipéptido ActRII es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido ActRII. Según el modo de acoplamiento utilizado, el o los azúcares se pueden unir a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres como los de cisteína; (d) grupos hidroxilo libres como los de serina, treonina o hidroxiprolina; (e) residuos aromáticos como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (f) el grupo amida de la glutamina. La eliminación de una o más porciones carbohidrato presentes en un polipéptido ActRII se puede hacer químicamente y/o enzimáticamente. La desglucosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido ActRII al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o a un compuesto equivalente. Este tratamiento resulta en la escisión de la mayoría o todos los azúcares excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando intacta la secuencia de aminoácidos. La escisión enzimática de porciones carbohidrato en los polipéptidos ActRII se puede lograr mediante el uso de diversas endo- y exo-glucosidasas como describen Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. La secuencia de un polipéptido ActRII se puede ajustar, según corresponda, en función del tipo de sistema de expresión utilizado, puesto que las células de mamíferos, levadura, insectos y células vegetales todas pueden introducir diferentes patrones de glucosilación que pueden ser afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas ActRII para usar en seres humanos se pueden expresar en una línea celular de mamífero que proporcione una glucosilación adecuada, como líneas celulares HEK293 o CHO, aunque se espera que otras líneas celulares de expresión de mamíferos también sean útiles.

Esta divulgación contempla además un método para generar mutantes, especialmente conjuntos de mutantes combinatorios de un polipéptido ActRII, así como mutantes de truncamiento; mezclas de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificar secuencias de variantes funcionales. El propósito del cribado de dichas colecciones combinatorias puede ser generar, por ejemplo, variantes del polipéptido ActRII que se unan a activina u otros ligandos. A continuación se proporcionan diversos ensayos de cribado, y dichos ensayos se pueden usar para evaluar las variantes. Por ejemplo, una variante del polipéptido ActRII se puede cribar para determinar si tiene capacidad para unirse a un ligando de ActRII, para evitar la unión de un ligando de ActRII a un polipéptido ActRII o para interferir con la señalización causada por un ligando de ActRII.

La actividad de un polipéptido ActRII o sus variantes también se puede probar en un ensayo in vivo o basado en células. Por ejemplo, se puede evaluar el efecto de una variante del polipéptido ActRII sobre la expresión de genes involucrados en la hematopoyesis. Este se puede realizar, según sea necesario, en presencia de una o más proteínas ligando de ActRII recombinantes (por ejemplo, activina), y las células se pueden transfectar para producir un polipéptido ActRII y/o sus variantes, y opcionalmente un ligando de ActRII. Asimismo, se puede administrar a un ratón u otro animal un polipéptido ActRII, y se pueden evaluar una o más determinaciones sanguíneas, como recuento de glóbulos rojos, hemoglobina o recuento de reticulocitos.

Se pueden generar variantes derivadas combinatoriamente que tengan una potencia selectiva o generalmente mayor en relación con un polipéptido ActRII natural. Asimismo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tengan vidas medias intracelulares marcadamente diferentes de la correspondiente a un polipéptido ActRII natural. Por ejemplo, la proteína alterada se puede volver más estable o menos estable a la degradación proteolítica u otros procesos celulares que resulten en la destrucción, o de lo contrario la inactivación, de un polipéptido ActRII natural. Dichas variantes y los genes que las codifican, se pueden utilizar para alterar los niveles de polipéptido ActRII modulando la vida media de los polipéptidos ActRII. Por ejemplo, una vida media corta puede dar lugar a más efectos biológicos transitorios y, cuando es parte de un sistema de expresión inducible, puede permitir un control más estricto de los niveles de polipéptido ActRII recombinante dentro de la célula. En una proteína de fusión Fc, las mutaciones se pueden hacer en el conector (si existe) y/o en la porción Fc para alterar la vida media de la proteína.

Una genoteca combinatoria se puede producir mediante una genoteca degenerada de genes que codifican una colección de polipéptidos los cuales incluyen al menos una porción de las posibles secuencias del polipéptido ActRII.

Por ejemplo, se puede ligar enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias de genes tal que el conjunto degenerado de secuencias posibles de nucleótidos del polipéptido ActRII se pueda expresar como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para la expresión en fago).

Hay muchas maneras mediante las cuales la colección de homólogos potenciales puede ser generada a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerados. La síntesis química de una secuencia de genes degenerados se puede llevar a cabo en un sintetizador automático de ADN y los genes sintéticos se pueden después ligar a un vector adecuado para la expresión. La síntesis de oligonucleótidos degenerados es bien conocida en el área (véase por ejemplo, Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al., (1981) *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp 273-289; Itakura et al., (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al., (1984) *Science* 198:1056; Ike et al., (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477). Dichas técnicas se emplearon en la evolución directa de otras proteínas (véase, por ejemplo, Scott et al., (1990) *Science* 249:386-390; Roberts et al., (1992) *PNAS USA* 89:2429-2433; Devlin et al., (1990) *Science* 249: 404-406; Cwirla et al., (1990) *PNAS USA* 87: 6378-6382; así como las patentes de los Estados Unidos N°: 5,223,409, 5,198,346 y 5,096,815).

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

Se conoce una amplia gama de técnicas en el área para el cribado de productos génicos de colecciones combinatorias hechas mediante mutaciones y truncamientos puntuales y, respecto a eso, para cribar genotecas de ADNc en busca de productos génicos que tengan una propiedad determinada. Dichas técnicas serán generalmente adaptables para el cribado rápido de las genotecas generadas por mutagénesis combinatoria de polipéptidos ActRII. Las técnicas más ampliamente utilizadas para el cribado de genotecas grandes comprende normalmente clonar la genoteca en vectores de expresión replicables, transformando células adecuadas con la colección de vectores resultante y expresando los genes combinatorios en condiciones en las cuales la detección de una actividad deseada haga relativamente fácil el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto fue detectado. Los ensayos preferidos incluyen ensayos de unión a activina y ensayos de señalización celular mediada por activina.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRII útiles en la invención pueden contener además modificaciones postraduccionales adicionales a todas las que están naturalmente presentes en los polipéptidos ActRII. Dichas modificaciones incluyen, pero no exclusivamente, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos ActRII modificados pueden contener elementos no aminoacídicos, como polietilenglicoles, lípidos, poli o mono sacáridos y fosfatos. Los efectos de dichos elementos no aminoacídicos sobre la funcionalidad de un polipéptido ActRII pueden ser analizados como se describe en este documento para otras variantes del polipéptido ActRII. Cuando se produce un polipéptido ActRII en las células por escisión de una forma incipiente del polipéptido ActRII, el procesamiento postraducciona también puede ser importante para el correcto plegado y/o la función de la proteína. Diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades postraduccionales y se pueden elegir de modo de garantizar la modificación y el procesamiento correctos de los polipéptidos ActRII.

Las variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos ActRII incluyen proteínas de fusión que pueden tener al menos una porción de los polipéptidos ActRII y uno o más dominios de fusión. Ejemplos bien conocidos de dichos dominios de fusión incluyen, pero no exclusivamente, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tiorredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), proteína de unión a maltosa (MBP) o albúmina sérica humana. Se puede seleccionar un dominio de fusión con el fin de conferirle una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión por cromatografía de afinidad. Con el propósito de purificación por afinidad, se usan matrices aplicables a cromatografía por afinidad, tales como resinas conjugadas a glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Muchas de dichas matrices están disponibles en forma de "kit", como el sistema de purificación de Pharmacia GST y el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil con compañeros de fusión (HIS6). Como otro ejemplo, se puede seleccionar un dominio de la fusión con el fin de facilitar la detección de los polipéptidos ActRII. Los ejemplos de dichos dominios

de detección incluyen diversas proteínas fluorescentes (p. ej., GFP) así como " epítomos marcadores" que son secuencias de péptidos generalmente cortas para las cuales hay un anticuerpo específico disponible. Los epítomos marcadores bien conocidos para las cuales hay anticuerpos monoclonales específicos fácilmente obtenibles incluyen marcadores FLAG, hemaglutinina del virus de la gripe (HA) y c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de proteasa, como para el factor Xa o trombina, el cual permite a la proteasa pertinente digerir parcialmente las proteínas de fusión y de esa manera liberar de allí las proteínas recombinantes. Después, las proteínas liberadas se pueden aislar del dominio de fusión por separación cromatográfica subsiguiente. En algunas realizaciones preferidas, un polipéptido ActRII se fusiona con un dominio que estabiliza al polipéptido ActRII in vivo (un dominio "estabilizador"). Mediante "estabilizar" se quiere dar a entender cualquier cosa que aumente la vida media sérica, independientemente de si se debe a una menor destrucción, a una menor depuración por el riñón o a otro efecto farmacocinético. Se sabe que las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina confieren propiedades farmacocinética deseables a una amplia gama de proteínas. Asimismo, las fusiones a albúmina sérica humana pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que se pueden seleccionar incluyen dominios de multimerización (por ejemplo, dimerización, tetramerización) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, como una estimulación adicional del crecimiento muscular).

Como ejemplo específico, la presente invención usa una proteína de fusión que contiene un dominio extracelular de ActRIIa soluble fusionado a un dominio Fc (por ejemplo SEQ ID NO: 6). 6).

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVPIEKTISKAK
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
 PFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK*

Como un ejemplo específico adicional, la presente invención usa una proteína de fusión que contiene un dominio extracelular soluble de ActRIIb fusionado a un dominio Fc (por ej., SEC. ID N°: 21).

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLD
 DFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCP
 PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Opcionalmente, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en residuos como Asp-265, lisina 322 y Asn-434. En ciertos casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de esas mutaciones (por ejemplo, mutación Asp-265) tiene menor capacidad de unirse a los receptores Fcγ en comparación con un dominio Fc natural. En otros casos, el dominio Fc del mutante que tiene una o más de esas mutaciones (por ejemplo, la mutación Asn-434) tiene mayor capacidad de unirse al receptor Fc relacionado con un MHC de clase I (FcRN) en comparación con un dominio Fc natural.

Se entiende que los diferentes elementos de las proteínas de fusión se pueden organizar de cualquier manera que sea compatible con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido ActRII puede estar colocado C-terminal en relación con un dominio heterólogo, o, alternativamente, un dominio heterólogo puede estar colocado C-terminal en relación con un polipéptido ActRII. El dominio del polipéptido ActRII y el dominio heterólogo no necesitan estar adyacentes en una proteína de fusión, y puede haber otros dominio o secuencias de aminoácidos C- o N-terminales en relación con cada dominio o entre los dominios.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos ActRII útiles en la presente invención contienen una o más modificaciones capaces de estabilizar a los polipéptidos ActRII. Por ejemplo, dichas modificaciones potencian la vida media in vitro de los polipéptidos ActRII, aumentan la vida media circulatoria de los polipéptidos ActRII o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos ActRII. Esas modificaciones estabilizantes incluyen, pero no exclusivamente, proteínas de fusión (entre otras, por ejemplo, las proteínas de fusión que contienen un polipéptido ActRII y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glucosilación (incluida, por ejemplo, la adición de un sitio de glucosilación a un polipéptido ActRII) y modificaciones de la porción carbohidrato (como, por ejemplo, la eliminación de porciones carbohidrato de un polipéptido ActRII). Según se usa en este documento, la expresión "dominio estabilizador" no sólo 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 como una porción carbohidrato, o porción no proteica, como polietilenglicol.

5 En ciertas realizaciones, la presente invención torna disponibles formas aisladas o purificadas de los polipéptidos ActRII, que están aisladas, o de lo contrario sustancialmente exentas, de otras proteínas. Los polipéptidos ActRII se producirán generalmente mediante la expresión de ácidos nucleicos recombinantes.

3. Ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos ActRII

10 En este documento se dan a conocer ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican cualquiera de los polipéptidos ActRII (por ejemplo, polipéptidos ActRIIa solubles y polipéptidos ActRIIb solubles) que incluyen fragmentos, variantes funcionales y proteínas de fusión dadas a conocer en este documento. Por ejemplo, SEC. ID N°: 4 codifica el polipéptido precursor del ActRIIa humano natural, mientras SEC. ID N°: 5 codifica el dominio extracelular procesado de ActRIIa. Por ejemplo, SEC. ID N°: 18 codifica el polipéptido precursor de ActRIIb humano natural, mientras SEC. ID N°: 19 codifica el dominio extracelular procesado de ActRIIb. Los ácidos nucleicos del tema pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Dichos ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Esos ácidos nucleicos se pueden usar, por ejemplo, en métodos para preparar polipéptidos ActRII o como agentes terapéuticos directos (por ejemplo, en genoterapia).

20 En ciertos aspectos, los ácidos nucleicos del tema que codifican polipéptidos ActRIIa se entiende además que incluyen ácidos nucleicos que son variantes de SEC. ID N°: 4 o 5. En ciertos aspectos, los ácidos nucleicos del tema que codifican polipéptidos ActRIIb se entiende además que incluyen ácidos nucleicos que son variantes de SEC. ID N°: 18 o 19. Las secuencias de nucleótidos variantes incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos, como variantes alélicas.

25 Se dan a conocer secuencias aisladas o recombinantes de ácidos nucleicos que son al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticas a SEQ ID N°: 4, 5, 18 o 19. Un experto comprenderá que se pueden proporcionar secuencias de ácidos nucleicos complementarias de SEC. ID N° 4, 5, 18 o 19, y variantes de SEC. ID N° 4, 5, 18 o 19. La secuencia de ácidos nucleicos se puede aislar, recombinar y/o fusionar con una secuencia de nucleótidos heteróloga, o en una genoteca.

35 Los ácidos nucleicos dados a conocer en este documento también pueden incluir secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones muy rigurosas a la secuencia de nucleótidos designada en SEC. ID N°: 4, 5, 18 o 19, la secuencia complementaria de SEC. ID N°: 4, 5, 18 o 19, o sus fragmentos. Como se discutió antes, un experto comprenderá fácilmente que se pueden variar las condiciones rigurosas adecuadas que promueven la hibridación del ADN. Un experto comprenderá fácilmente que se pueden variar las condiciones rigurosas adecuadas que promueven la hibridación del ADN. Por ejemplo, se podría realizar la hibridación en 6.0 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a alrededor de 45 °C, seguida de un lavado de 2.0 x SSC a 50 °C. Por ejemplo, la concentración de sal en el paso de lavado se puede seleccionar desde una baja rigurosidad de aproximadamente 2.0 x SSC a 50 °C a una alta rigurosidad de aproximadamente 0,2 x SSC a 50 °C. Además, la temperatura del paso de lavado se puede aumentar desde condiciones de baja rigurosidad a temperatura ambiente, alrededor de 22 °C, hasta condiciones de alta rigurosidad a alrededor de 65 °C. Se pueden variar la temperatura y la concentración de sal, o se puede mantener constante la temperatura o la concentración de sal mientras se cambia la otra variable. Se pueden proporcionar ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de baja rigurosidad de 6 x SSC a temperatura ambiente seguido de un lavado en 2 x SSC a temperatura ambiente.

45 También se pueden proporcionar ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos indicados en SEQ ID n°: 4, 5, 18 o 19 debido a la degeneración en el código genético. Por ejemplo, un número de aminoácidos es designado por más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos para histidina) pueden causar mutaciones "silenciosas" que no afectan a la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que los polimorfismos de la secuencia de ADN que sí conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas del tema existirán en células de mamíferos. Un experto comprenderá que esas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta alrededor de 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.

60 Los ácidos nucleicos recombinantes se pueden unir operativamente a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras en un constructo de expresión. Las secuencias de nucleótidos reguladoras serán en general adecuadas para la célula huésped utilizada para la expresión. Se conocen en el área numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas para diversas células huésped. Habitualmente, dichas una o más secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, pero no exclusivamente, secuencias promotoras, secuencias líder o señal, sitios de unión ribosómicos, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias de inicio y terminación de la traducción y secuencias potenciadoras o activadoras. Se pueden usar promotores constitutivos o inducibles conocidos en el área. Los promotores pueden ser promotores de origen natural o promotores híbridos que

combinan elementos de más de un promotor. Puede haber un constructor de expresión presente en una célula en un episoma, como un plásmido, o el constructo de expresión se puede insertar en un cromosoma. El vector de expresión puede contener un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células huésped transformadas. Los genes marcadores seleccionables son bien conocidos en el área y variarán según la célula huésped utilizada.

El ácido nucleico del tema se puede proporcionar en un vector de expresión que contenga una secuencia de nucleótidos que codifique un polipéptido ActRII y que se una operativamente a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras son conocidas en el área y se seleccionan para dirigir la expresión de un polipéptido ActRII. En consecuencia, la expresión secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Se describen ejemplos de secuencias reguladoras en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, se puede usar cualquier secuencia, de una amplia variedad de secuencias de control de la expresión, que controle la expresión de una secuencia de ADN cuando está unida operativamente a ella en esos vectores, para expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido ActRII. Dichas secuencias de control de la expresión útiles, incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío de SV40, el promotor tet, el promotor inmediato temprano del adenovirus o citomegalovirus, los promotores RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión es dirigida por la T7 ARN polimerasa, las principales regiones promotora y operadora del fago lambda, las regiones de control de la proteína de la envoltura de fd, el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de apareamiento α de la levadura, el promotor del poliedro del sistema del baculovirus y otras secuencias que se sabe que controlan la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus, y diversas combinaciones de éstos. Se debe entender que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se va a transformar y/o el tipo de proteína que se desea expresar. Por otra parte, también se debe considerar el número de copias del vector, la capacidad de controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, como marcadores de antibióticos.

Se puede producir un ácido nucleico recombinante de la invención ligando el gen clonado, o una porción de éste, en un vector adecuado para la expresión en células procariotas o células eucariotas (levadura, aves, insectos o mamíferos) o ambos. Los vehículos de expresión para la producción de una polipéptido ActRII recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para la expresión en células procariotas, como *E. coli*.

Algunos vectores de expresión mamíferos contienen secuencias procariotas para facilitar la propagación del vector en las bacterias y una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan en las células eucariotas. Los vectores derivados de peDNAI/amp, peDNAI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamíferos adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de esos vectores son modificados con secuencias de plásmidos bacterianos, como pBR322, para facilitar la replicación y la selección de resistencia a los fármacos tanto en células procariotas como eucariotas. Alternativamente, se pueden usar derivados de virus como el virus del papiloma bovino (BPV-1), o el virus Epstein - Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Los ejemplos de otros sistemas de expresión viral (incluida retroviral) se pueden encontrar más adelante en la descripción de los sistemas de administración de genoterapia. Los diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos huéspedes son muy conocidos en el área. Por otros sistemas de expresión adecuados para células procariotas y eucariotas, así como por procedimientos generales de recombinación, véase Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3ª Ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). En algunos casos, puede ser conveniente expresar polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Los ejemplos de dichos sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (como pAcUW1) y vectores derivados de pBlueBac (como los B-gal que contienen pBlueBac III).

Se puede diseñar un vector para la producción de los polipéptidos ActRII del tema en células CHO; como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wise). Como resultará evidente, los constructos génicos del tema se pueden utilizar para causar la expresión de los polipéptidos ActRII del tema en células propagadas en cultivo, por ejemplo, para producir proteínas, incluidas proteínas de fusión o proteínas variantes, para purificación.

En este documento se da a conocer una célula huésped transfectada con un gen recombinante, que incluye una secuencia de codificación (por ejemplo, SEC. ID N°: 4, 5, 18 o 19) para uno o más de los polipéptidos ActRII del tema. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido ActRII de la invención se puede expresar en: células bacterianas, como *E. coli*, células de insectos (por ejemplo, usando un sistema de expresión de baculovirus), levadura, o células de mamíferos. Los expertos conocen otras células

huésped adecuadas.

En consecuencia, en este documento se dan a conocer métodos de producción de los polipéptidos ActRII del tema. Por ejemplo, una célula huésped transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido ActRIIa o un polipéptido ActRIIb se puede cultivar en condiciones adecuadas para permitir que se produzca la expresión del polipéptido ActRII. El polipéptido ActRII puede ser secretado y aislado de una mezcla de células y medio que contengan el polipéptido ActRII. Alternativamente, se puede retener el polipéptido ActRII citoplasmáticamente o en una fracción de la membrana y cosechar y lisar las células, y aislar la proteína. Un cultivo celular incluye células huésped, medios y otros subproductos. En el área se conocen medios de cultivo celular adecuados. Los polipéptidos ActRII del tema se pueden aislar del medio de cultivo celular, de las células huésped o de ambos, utilizando técnicas conocidas en el área para la purificación de proteínas, que incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis, purificación por inmunofinidad con anticuerpos específicos para epítomos particulares de los polipéptidos ActRII y purificación por afinidad con un agente que se una a un dominio fusionado al polipéptido ActRII (por ejemplo, se puede usar una columna de proteína A para purificar una fusión ActRIIa-Fc o ActRIIb-Fc). El polipéptido ActRII puede ser una proteína de fusión que contenga un dominio que facilite su purificación. La purificación se puede lograr mediante una serie de pasos de cromatografía en columna, como, por ejemplo, tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía en proteína A, cromatografía en sefarsa Q, cromatografía en fenilsefarsa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación se pudo completar con filtración viral e intercambio de solución amortiguadora. Como se demostró en este documento, la proteína ActRIIa-hFc se purificó hasta una pureza >98% según se determinó por cromatografía de exclusión por tamaño y >95% según se determinó por SDS PAGE. Este nivel de pureza fue suficiente para lograr resultados deseables en ratones, ratas y primates no humanos.

Un gen de fusión que codifica una secuencia líder de purificación, como una secuencia de sitio de escisión de poli-(His)-enteroquinasa en el extremo N-terminal de la porción deseada del polipéptido ActRII recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada mediante cromatografía por afinidad usando una resina metálica de Ni²⁺. A continuación se puede eliminar la secuencia líder de purificación por tratamiento con enteroquinasa para proporcionar el polipéptido ActRII purificado (por ejemplo, véase Hochuli et al., (1987) J. Chromatography 411:177; y Janknecht et al., PNAS USA 88:8972).

Las técnicas para preparar genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, la unión de varios fragmentos de ADN que codifican secuencias de polipéptidos diferentes se realiza según técnicas convencionales, empleando extremos romos o irregulares para el ligamiento, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos adecuados, relleno de extremos cohesivos según sea adecuado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables y ligamiento enzimático. El gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, se puede llevar a cabo la amplificación por PCR de fragmentos del gen utilizando iniciadores de anclaje (anchor primers) que dan lugar a salientes complementarias entre dos fragmentos del gen consecutivos que posteriormente se pueden aparear para generar una secuencia de genes quimérica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

4. Ensayos de cribado

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona un método para identificar un agente que aumente los niveles de glóbulos rojos y se refiere al uso de polipéptidos ActRII (p. ej., polipéptidos ActRIIa o ActRIIb solubles) y polipéptidos activina para identificar compuestos (fármacos) que sean agonistas o antagonistas de la vía de señalización de activina-ActRIIa y/o activina-ActRIIb. Los compuestos identificados mediante este cribado se pueden probar a fin de evaluar su capacidad para modular los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina y/o reticulocitos in vivo o in vitro. Esos compuestos se pueden probar, por ejemplo, en modelos animales.

Existen numerosos métodos para el cribado de agentes terapéuticos que aumenten los niveles de glóbulos rojos o hemoglobina dirigiéndose a la señalización de activina y a la señalización de ActRII. En algunas realizaciones, se puede llevar a cabo un cribado de alto rendimiento de compuestos para identificar a fármacos que alteran los efectos mediados por activina o ActRII sobre una línea celular elegida. En ciertas realizaciones, el ensayo se lleva a cabo para cribar e identificar compuestos que inhiben o disminuyen, específicamente, la unión de un polipéptido ActRIIa o ActRIIb a activina. Alternativamente, el ensayo se puede usar para identificar compuestos que aumentan la unión de un polipéptido ActRIIa o ActRIIb a activina. En otra realización, los compuestos se pueden identificar por su capacidad para interactuar con una activina, un polipéptido ActRIIb o un polipéptido ActRIIa.

Una diversidad de formatos de ensayo será suficiente y, a la luz de la presente divulgación, los que no están expresamente descritos en este documento serán sin embargo comprendidos por un técnico con experiencia en el tema. Como se describe en este documento, los compuestos de prueba (fármacos) de la invención se pueden crear por cualquier método de química combinatoria. Alternativamente, los compuestos del tema pueden ser biomoléculas naturales sintetizadas in vivo o in vitro. Los compuestos (fármacos) que se van a probar en cuanto a su capacidad

para actuar como moduladores del crecimiento tisular pueden ser, producidos por ejemplo, por bacterias, levaduras, plantas u otros organismos (por ejemplo, productos naturales), producidos químicamente (por ejemplo, moléculas pequeñas, incluidos peptidomiméticos), o producidos recombinantemente. Los compuestos de prueba considerados por la presente invención incluyen moléculas orgánicas no peptídicas, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas y moléculas de ácidos nucleicos. En una realización específica, el agente de prueba es una molécula orgánica pequeña con un peso molecular inferior a aproximadamente 2000 Dalton.

Los compuestos de prueba de la invención se pueden proporcionar como entidades discretas, individuales, o proporcionar en colecciones de mayor complejidad, como las elaboradas por química combinatoria. Esas colecciones pueden comprender, por ejemplo, alcoholes, halogenuros de alquilo, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de compuestos orgánicos. La presentación del compuesto de prueba al sistema de prueba puede ser en forma aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en los pasos de cribado iniciales. Opcionalmente, los compuestos pueden ser derivatizados con otros compuestos y tener grupos de derivatización que faciliten el aislamiento de los compuestos. Los ejemplos no limitantes de grupos de derivatización incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína verde fluorescente, isótopos, polihistidina, perlas magnéticas, glutatión S transferasa (GST), reticulantes fotoactivables o cualquier combinación de éstos.

En muchos programas de cribado de fármacos que analizan colecciones de compuestos y extractos naturales, son deseables ensayos de prueba de alto rendimiento para maximizar el número de compuestos estudiados en un período determinado de tiempo. Los ensayos que se realizan en sistemas exentos de células, como los que se pueden obtener con proteínas purificadas o semipurificadas, a menudo se prefieren como cribas "primarias" en cuanto a que se pueden generar para permitir el desarrollo rápido y la detección relativamente fácil de una alteración en un objetivo molecular la cual es mediada por un compuesto de prueba. Por otra parte, en general se pueden ignorar los efectos de la toxicidad celular o la biodisponibilidad del compuesto de prueba en el sistema in vitro, en su lugar el ensayo se centra principalmente en el efecto del fármaco sobre el objetivo molecular ya que se puede manifestar en una alteración de la afinidad de unión entre un polipéptido ActRIIa y activina o entre un polipéptido ActRIIb y activina.

Meramente para ilustrar, en un ensayo de cribado de ejemplo de la presente invención, el compuesto de interés se pone en contacto con un polipéptido ActRIIa aislado y purificado que es normalmente capaz de unirse a activina. A la mezcla del compuesto y el polipéptido ActRIIa se le agrega después una composición que contiene un ligando de ActRIIa. La detección y la cuantificación de complejos ActRIIa/activina proporciona un medio para determinar la eficacia del compuesto para inhibir (o potenciar) la formación del complejo entre el polipéptido ActRIIa y activina. La eficacia del compuesto se puede evaluar generando curvas dosis-respuesta a partir de los datos obtenidos utilizando diversas concentraciones del compuesto de prueba. Además también se puede llevar a cabo un ensayo de control para establecer una línea de base para la comparación. Por ejemplo, en un ensayo de control, se agrega activina aislada y purificada a una composición que contiene el polipéptido ActRIIa, y se cuantifica la formación de complejo ActRIIa/activina en ausencia del compuesto de prueba. Se entenderá que, en general, el orden en el que se pueden mezclar los reactivos se puede variar y que se pueden mezclar simultáneamente. Por otra parte, en lugar de proteínas purificadas, se pueden utilizar extractos celulares y lisados para proporcionar un sistema de ensayo adecuado que carezca de células. Los compuestos que afectan la señalización de ActRIIb se pueden identificar de manera similar utilizando un polipéptido ActRIIb y un ligando de ActRIIb.

La formación de complejos entre el polipéptido ActRII y activina puede ser detectada por diversas técnicas. Por ejemplo, se puede cuantificar la modulación de la formación de complejos utilizando, por ejemplo, proteínas marcadas detectablemente como radiomarcadas (p. ej., ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C o ^3H), marcadas fluorescentemente (por ejemplo, FITC), o el polipéptido ActRIIa o ActRIIb o activina marcados enzimáticamente, mediante inmunoensayo, o por detección cromatográfica.

En ciertas realizaciones, la presente invención considera el uso de ensayos de polarización de la fluorescencia y ensayos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) para medir, directa o indirectamente, el grado de interacción entre un polipéptido ActRII y su proteína de unión. Además, otros modos de detección, tales como los basados en guías de onda ópticas (publicación PCT WO 96/26432 y Pat de los Estados Unidos N° 5,677,196), resonancia de plasmones superficiales (SPR), sensores de carga superficial y sensores de fuerza superficial, son compatibles con muchas realizaciones de la invención.

Por otra parte, la presente invención contempla el uso de un ensayo de trampa de interacción, también conocido como el "ensayo de dos híbridos," para identificar agentes que trastoran o potencian la interacción entre un polipéptido ActRII y su proteína de unión. Véase por ejemplo, la patente de los Estados Unidos 5,283,317; Zervos et al., (1993) *Cellular* 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, la presente invención considera el uso de sistemas de dos híbridos inversos para identificar compuestos (por ejemplo, moléculas pequeñas o péptidos) que disocian las interacciones entre un polipéptido ActRII y su proteína de unión. Véase por ejemplo, Vidal y Legrain, (1999) *Nucleic Acids Res* 27:919-29; Vidal y Legrain, (1999) *Trends Biotechnol*

17:374-81; y las patentes de los Estados Unidos N° 5,525,490; 5,955,280; y 5,965,368.

En ciertas realizaciones, los compuestos del tema se identifican por su capacidad para interaccionar con un polipéptido ActRII o activina de la invención. La interacción entre el compuesto y el polipéptido ActRIIa, ActRIIb o activina puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, dicha interacción se puede identificar a nivel de la proteína mediante métodos bioquímicos in vitro, incluidos foto-entrecruzamiento, unión de ligando radiomarcado y cromatografía de afinidad (Jakoby WB et al., 1974, Methods in Enzymology 46: 1). En ciertos casos, los compuestos se pueden cribar en un ensayo basado en un mecanismo, como un ensayo para detectar compuestos que se unen a un polipéptido activina o ActRII. Éste puede incluir un episodio de unión en fase sólida o en fase líquida. Alternativamente, el gen que codifica un polipéptido activina o ActRII se puede transinfectar con un sistema reportero (p. ej., β -galactosidasa, luciferasa o proteína verde fluorescente) en una célula y cribar contra la colección, opcionalmente mediante un ensayo de cribado de alto rendimiento o con miembros individuales de la colección. Se pueden usar otros ensayos de unión basados en mecanismos, por ejemplo, ensayos de unión que detectan cambios en la energía libre. Se pueden realizar ensayos de unión con el objetivo fijado a un pocillo, perla o chip o capturado por un anticuerpo inmovilizado o resuelto por electroforesis capilar. Habitualmente se pueden detectar los compuestos unidos usando colorimetría o fluorescencia o resonancia de plasmones de superficie.

5. Usos terapéuticos

Los antagonistas de activina-ActRII (por ejemplo, polipéptidos ActRIIa o ActRIIb) se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos en mamíferos como roedores y primates, y especialmente en pacientes humanos. Algunos antagonistas de activina-ActRII se pueden utilizar en métodos para tratar o prevenir la anemia en un individuo que lo necesita o en métodos para promover la formación de glóbulos rojos en un individuo. Esos métodos se pueden emplear para tratamientos terapéuticos y profilácticos de mamíferos y especialmente de seres humanos.

Según se usa en este documento, un agente terapéutico que "previene", un trastorno o afección se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la incidencia del trastorno o la afección en la muestra tratada con respecto a una muestra testigo, o retrasa la aparición o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o la afección en relación con la muestra testigo. El término "tratar" según se usa en este documento incluye la profilaxis de la afección mencionada o la mejoría o eliminación de la afección una vez que se ha instalado. En cualquiera de los casos, la prevención o el tratamiento se puede discernir del diagnóstico de un médico u otro proveedor de asistencia médica y del resultado previsto de la administración del agente terapéutico.

Como se muestra en este documento, los antagonistas de activina-ActRIIa y los antagonistas de activina-ActRIIb se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina o reticulocitos en individuos sanos y dichos antagonistas se pueden utilizar en poblaciones de pacientes elegidas. Los ejemplos de poblaciones de pacientes adecuadas incluyen las que tienen niveles indeseablemente bajos de glóbulos rojos o hemoglobina, como los pacientes que tienen anemia, y las que corren riesgo de presentar niveles indeseablemente bajos de glóbulos rojos o hemoglobina, como los pacientes que están por someterse a una cirugía mayor u otros procedimientos que pueden provocar una pérdida de sangre considerable. Un paciente con niveles adecuados de glóbulos rojos puede ser tratado con un antagonista de activina-ActRIIa o un antagonista de activina-ActRIIb para aumentar los niveles de glóbulos rojos, y luego extraerle sangre y almacenarla para el uso posterior en transfusiones sanguíneas.

Los antagonistas de activina-ActRII dados a conocer en este documento, y especialmente las proteínas ActRIIa-Fc y ActRIIb, se pueden utilizar para aumentar los niveles de glóbulos rojos en pacientes con anemia. Al observar los niveles de hemoglobina en los seres humanos, un nivel menor de lo normal para la categoría de género y edad apropiada puede ser indicativo de anemia, aunque se toman en cuenta las variaciones individuales. Por ejemplo, un nivel de hemoglobina de 12 g/dl se considera habitualmente el límite inferior de lo normal en la población adulta general. Las causas posibles pueden ser pérdida de sangre, déficits nutricionales, reacción a medicamentos, diversos problemas con la médula ósea y muchas enfermedades. Más particularmente, la anemia se ha asociado con diversos trastornos que incluyen, por ejemplo, insuficiencia renal crónica, síndrome mielodisplásico, artritis reumatoide y trasplante de médula ósea. La anemia también puede estar asociada a las afecciones siguientes: tumores sólidos (por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon); tumores del sistema linfático (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica, linfomas de Hodgkin y no hodgkiniano); tumores del sistema hematopoyético (por ej. leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple); radioterapia; quimioterapia (p. ej. regímenes que contienen platino); enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, incluidas, pero no exclusivamente, artritis reumatoide, otras artritis inflamatorias, lupus eritematoso sistémico (SLE), enfermedades cutáneas agudas o crónicas (por ejemplo, psoriasis), enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); enfermedad renal aguda o crónica o insuficiencia, incluidas afecciones congénitas o idiopáticas; enfermedad hepática aguda o crónica; hemorragia aguda o crónica; situaciones en que la transfusión de glóbulos rojos no es posible debido a alo - o autoanticuerpos del paciente o por razones religiosas (por ejemplo, algunos testigos de Jehová); infecciones (por ejemplo, malaria, osteomielitis); hemoglobinopatías, incluidas, por ejemplo, anemia drepanocítica, talasemias; uso de drogas o drogadicción, por ejemplo, uso indebido de alcohol;

pacientes pediátricos con anemia por cualquier causa para evitar la transfusión; y en pacientes ancianos o en pacientes con enfermedad cardiopulmonar subyacente con anemia que no pueden recibir transfusiones por riesgo de sobrecarga circulatoria.

5 Los pacientes se pueden tratar con un régimen de dosificación destinado a restaurar en el paciente un nivel de hemoglobina, generalmente entre aproximadamente 10 g/dl y aproximadamente 12.5 g/dl y normalmente de aproximadamente 11.0 g/dl (véase también Jacobs et al (2000) *Nephrol Dial trasplante* 15, 15-19), aunque niveles finales más bajos pueden causar 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
10 medida del estado de los glóbulos rojos. Los niveles de hematocrito para individuos sanos varían de 41 a 51% para los hombres adultos y de 35 a 45% para las mujeres adultas. Los niveles de hematocrito buscados suelen ser de alrededor de 30 a 33%. Por otra parte, los niveles de hemoglobina/hematocrito varían de persona a persona. Por lo tanto, en condiciones óptimas, el nivel buscado de hemoglobina/hematocrito puede ser individualizado para cada paciente.

15 El rápido efecto sobre los niveles de glóbulos rojos de los antagonistas de activina-ActRIIa dados a conocer en este documento indica que esos agentes actúan por un mecanismo diferente del de Epo. En consecuencia, esos antagonistas pueden ser útiles para aumentar los niveles de glóbulos rojos y de hemoglobina en pacientes que no responden bien a Epo. Por ejemplo, un antagonista de activina-ActRIIa puede ser beneficioso para un paciente en el que la administración de una dosis de normal a aumentada (> 300 UI/kg/semana) de Epo no da como resultado el aumento del nivel de hemoglobina hasta el nivel deseado. Se encuentran pacientes con una respuesta inadecuada a Epo en todos los tipos de anemia, pero particularmente se han observado cifras mayores de no respuesta en pacientes con cáncer y pacientes con enfermedad renal en etapa final. Una respuesta a Epo inadecuada, puede ser constitutiva (es decir, observada luego del primer tratamiento con Epo) o adquirida (por ejemplo, observada al repetir el tratamiento con Epo).
20
25

Los antagonistas de activina-ActRII también se pueden usar para tratar pacientes que son propensos a los efectos adversos de Epo. Los principales efectos adversos de Epo son un aumento excesivo de los niveles de hematocrito o hemoglobina y policitemia. Los niveles de hematocrito elevados pueden provocar hipertensión (más particularmente agravamiento de la hipertensión) y trombosis vascular. Otros efectos adversos de Epo que han sido reportados, algunos de los cuales se relacionaban con 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(suppl 6), S36-S43; Horl et al. (2000) *Nephrol Dial Transplant* 15(suppl 4), 51-56; Delanty et al. (1997) *Neurology* 49, 686-689; Bunn (2002) *N Engl J Med* 346(7), 522-523).
30
35

6. Composiciones farmacéuticas

Los antagonistas de activina-ActRII (por ejemplo, polipéptidos ActRIIa y ActRIIb) se pueden formular con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, un polipéptido ActRII se puede administrar solo o como un componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Los compuestos el tema se pueden formular para la administración de cualquier manera conveniente para el uso en medicina humana o veterinaria.
40

En ciertas realizaciones, la invención incluye la administración de la composición por vía sistémica o local como un implante o dispositivo. Cuando la composición terapéutica para usar en esta invención se administra, se encuentra, por supuesto, en una forma fisiológicamente aceptable, apirógena. Otros agentes terapéuticamente útiles distintos de los antagonistas de activina-ActRII que también pueden ser incluidos en la composición como se describió antes, se pueden administrar simultáneamente o consecutivamente con los compuestos del tema (por ejemplo, polipéptidos ActRIIa y ActRIIb) en los métodos de la invención.
45
50

Normalmente, los antagonistas de activina-ActRII se administrarán por vía parenteral. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden contener uno o más polipéptidos ActRII en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones farmacéuticamente aceptables estériles, isotónicas, acuosas o no acuosas, o polvos estériles que pueden ser reconstituidos en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, amortiguadores del pH, bacteriostáticos, solutos que tornan la formulación isotónica con la sangre del destinatario, o suspensivos o espesantes. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y sus mezclas adecuadas, aceites vegetales, como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, como oleato de etilo. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.
55
60

Además, la composición se puede encapsular o inyectar en una forma para la liberación en el lugar deseado del

tejido (por ejemplo, médula ósea). En ciertas realizaciones, las composiciones útiles en la presente invención pueden incluir una matriz capaz de liberar uno o más terapéuticos compuestos (por ejemplo, polipéptidos ActRIIa o ActRIIb) a un lugar deseado del tejido (por ejemplo, médula ósea), proporcionando una estructura para el tejido en desarrollo y óptimamente capaz de ser reabsorbida en el organismo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar una liberación lenta de los polipéptidos ActRII. Dichas matrices se pueden elaborar de materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantables.

La elección del material de la matriz se basa en la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, las propiedades mecánicas, el aspecto cosmético y las propiedades de la interfase. La aplicación particular de las composiciones del tema definirá la formulación adecuada. Las matrices posibles para las composiciones pueden ser sulfato de calcio, fosfato tricálcico, hidroxapatita, ácido poliláctico y polianhídridos biodegradables y químicamente definidos. Otros materiales posibles son biodegradables y biológicamente bien definidos, como hueso o colágeno dérmico. Otras matrices están compuestas de proteínas puras o componentes de la matriz extracelular. Otras matrices posibles son no biodegradables y químicamente definidas, como hidroxapatita sinterizada, biovidrio, aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden estar compuestas por combinaciones de cualquiera de los tipos anteriores de materiales, como ácido poliláctico e hidroxapatita o colágeno y fosfato tricálcico. Se puede alterar la composición de las biocerámicas como en fosfato aluminato de calcio y procesar para modificar el tamaño del poro, el tamaño de partícula, la forma de la partícula y la biodegradabilidad.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se pueden administrar por vía oral, por ejemplo, en forma de cápsulas, obleas, píldoras, comprimidos, tabletas (utilizando una base saborizada, generalmente sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia) y/o como enjuagues bucales, y análogos, cada uno con una cantidad predeterminada de un fármaco como principio activo. Un fármaco también se puede administrar en forma de bolo, remedio azucarado o pasta.

En las formas farmacéuticas sólidas para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), se pueden mezclar uno o más compuestos terapéuticos de la presente invención con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, como citrato de sodio, fosfato dicálcico y/o cualquiera de los siguientes: (1) rellenos o diluyentes, como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes, como glicerol; (4) desintegrantes, como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5) retardadores de la solución, como parafina; (6) aceleradores de la absorción, como compuestos de amonio cuaternario; (7) humectantes, como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de éstos; y (10) colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden incluir amortiguadores del pH. También se pueden emplear composiciones sólidas de tipo similar como relleno de cápsulas de gelatina blanda y dura, utilizando excipientes como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral incluyen, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente utilizados en el área, como agua u otros solventes, solubilizantes y emulsionantes, como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, maní, maíz, germen de trigo, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfílico, polietilenglicoles y ésteres de sorbitán de ácidos grasos y sus mezclas. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes como humectantes, emulsionantes y suspendentes, edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumes y conservantes.

Las suspensiones, además de los principios activos, pueden contener suspendentes como alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y sus mezclas.

Las composiciones de la invención también pueden contener adyuvantes, como conservantes, humectantes, emulsionantes y dispersantes. Se puede prevenir la acción de los microorganismos mediante la inclusión de varios antibacterianos y antimicóticos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir en las composiciones agentes isotónicos, como azúcares, cloruro de sodio y análogos. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción, como monoestearato de aluminio y gelatina.

Se entiende que el régimen de dosificación será determinado por el médico teniendo en cuenta diversos factores

que modifican la acción de los compuestos de la invención (por ejemplo, polipéptidos ActRIIa y ActRIIb). Los diversos factores incluyen, pero no exclusivamente, el recuento de glóbulos rojos, el nivel de hemoglobina u otras evaluaciones diagnósticas del paciente, el recuento de glóbulos rojos de destino buscado, la edad, el género y la dieta del paciente, la gravedad de cualquier enfermedad que pueda estar contribuyendo a un nivel deprimido de los 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 dosis. La evolución se puede monitorear mediante evaluación periódica de los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina, así como mediante evaluaciones de los niveles de reticulocitos y otros indicadores del proceso hematopoyético.

Los experimentos con primates y seres humanos han demostrado que los efectos de ActRIIa-Fc sobre los niveles de glóbulos rojos son detectables cuando el compuesto se administra a intervalos y en cantidades suficientes para alcanzar concentraciones séricas de alrededor de 100 ng/ml o mayores, durante un período de al menos unos 20 a 30 días. También se puede utilizar una dosificación para obtener niveles séricos de 200 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml o mayores durante un período de al menos 20 a 30 días. Los efectos óseos se pueden observar a niveles séricos de aproximadamente 200 ng/ml, con efectos sustanciales comenzando a alrededor de 1000 ng/ml o más, durante un período de al menos aproximadamente 20 a 30 días. Por lo tanto, si se desea para lograr efectos sobre los glóbulos rojos pero con poco efecto sobre el hueso, se puede diseñar un esquema de dosificación para proporcionar una concentración sérica entre alrededor de 100 y 1000 ng/ml durante un período de aproximadamente 20 a 30 días. En los seres humanos, se pueden lograr niveles séricos de 200 ng/ml con una sola dosis de 0,1 mg/kg o mayor y se pueden lograr niveles séricos de 1000 ng/ml con una sola dosis de 0,3 mg/kg o mayor. La vida media sérica observada de la molécula es entre alrededor de 20 y 30 días, sustancialmente más larga que la mayoría de las proteínas de fusión Fc y por lo tanto se puede lograr un nivel sérico sostenido eficaz, por ejemplo, administrando alrededor de 0,05 a 0,5 mg/kg semanal o quincenalmente, o se pueden utilizar dosis más altas a intervalos más prolongados entre administraciones. Por ejemplo, podrían utilizarse dosis de 0,1 a 1 mg/kg mensual o bimestralmente.

En este documento se da a conocer una genoterapia para la producción in vivo de polipéptidos ActRII. Dicha terapia lograría su efecto terapéutico mediante la introducción de las secuencias de polinucleótidos ActRIIa o ActRIIb en células o tejidos que tienen los trastornos mencionados antes. La administración de secuencias de polinucleótidos ActRII se puede lograr usando un vector de expresión recombinante como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. Se prefiere el uso de liposomas dirigidos para la administración terapéutica de secuencias de polinucleótidos ActRII.

Varios vectores virales que se pueden usar para la genoterapia que se enseña en este documento incluyen adenovirus, virus del herpes, vaccinia o un virus de ARN como un retrovirus. El vector retroviral puede ser un derivado de un retrovirus aviar o murino. Los ejemplos de vectores retrovirales en los cuales se puede insertar un solo gen foráneo incluyen, pero no exclusivamente: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV) y virus del sarcoma de Rous (VRS). Una serie de vectores retrovirales adicionales puede incorporar múltiples genes. Todos esos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable para que las células transducidas puedan ser identificadas y generadas. Los vectores retrovirales se pueden hacer específicos del objetivo uniéndoles, por ejemplo, un azúcar, un glucolípido o una proteína. La administración dirigida preferida se logra mediante el uso de un anticuerpo. Los expertos en el área reconocerán que se pueden insertar secuencias de polinucleótidos específicas en el genoma retroviral o unir a una envoltura viral para permitir la administración específica en el objetivo del vector retroviral que contiene el polinucleótido ActRII.

Alternativamente, las células de cultivo tisular se pueden transfectar directamente con plásmidos que codifican los genes estructurales retrovirales gag, pol y env, mediante transfección convencional con fosfato de calcio. Luego, esas células se transfectan con el plásmido vector que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retroviral en el medio de cultivo.

Otro sistema de administración dirigida para los polinucleótidos ActRII es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos macromoleculares, nanocápsulas, microsferas, perlas y sistemas a base de lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal preferido es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificiales, útiles como vehículos de administración in vitro e in vivo. Los viriones de ARN, ADN e intactos se pueden encapsular en el interior acuoso y administrar a las células en una forma biológicamente activa (véase por ej., 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 el área, véase por ejemplo, Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988. La composición del liposoma es generalmente una combinación de fosfolípidos, habitualmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También se pueden utilizar 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, como el

fosfatidilglicerol, la fosfatidilcolina, la fosfatidilserina, la fosfatidiletanolamina, los esfingolípidos, los cerebrósidos y los gangliósidos. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina. La administración dirigida de los liposomas también es posible basándose en, por ejemplo, la especificidad por el órgano, la especificidad por la célula y la especificidad por el organelo, como se sabe en el área.

Ejemplos

La invención que se está describiendo en general, se comprenderá más fácilmente por referencia a los ejemplos siguientes, que se incluyen sólo a efectos ilustrativos de ciertas realizaciones y realizaciones de la presente invención, y no pretenden limitar la invención.

Ejemplo 1: proteínas de fusión ActR11a-Fc

Los solicitantes construyeron una proteína de fusión ActR11a soluble que tiene el dominio extracelular de ActR11a humano fusionado a un dominio Fc humano o de ratón con un conector mínimo entre ellos. Los constructos se denominan ActR11a-hFc y mFc-ActR11a, respectivamente.

A continuación se muestra ActR11a-hFc como se purificó de líneas celulares CHO (SEC. ID N°: 7):

**ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
CWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPK
PPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
VPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK**

Las proteínas ActR11a-hFc y ActR11a-mFc se expresaron en líneas celulares CHO. Se consideraron tres secuencias líderes diferentes:

- (i) Melitina de miel de abeja (HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEC. ID N°: 8)
- (ii) Activador tisular del plasminógeno (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEC. ID N°: 9)
- (iii) Natural: MGAAAKLAFVFLISCSGA (SEC. ID N°: 10).

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

**MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCY
GDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEG
NMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:13)**

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

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCT
 TCGTTTCGCCCCGGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTT
 TTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGTAACCGTGT
 ATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGG
 TTCCATTGAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACA
 GGACTGATTGTGTAGAAAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGA
 GGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCGGAGATGGAAGTCACACAG
 CCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGGAACTCACACAT
 GCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC
 CCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG
 GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
 GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG
 CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGTCCCCATCGAGAAA
 ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC
 CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGCCTGGTCAA
 GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
 AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT

 ATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
 GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
 GTCTCCGGGTAAATGAGAATTC (SEQ ID NO:14)

5 Tanto ActR11a-hFc como ActR11a-mFc fueron notablemente propensas a la expresión recombinante. Como se muestra en la figura 1, la proteína se purificó como un pico de proteína único y bien definido. La secuenciación N-terminal mostró una sola secuencia de ILGRSTQE (SEC. ID N°: 11). La purificación se pudo lograr mediante una serie de pasos de cromatografía en columna, incluidos, por ejemplo, tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía en proteína A, cromatografía en sefarosa Q, cromatografía en fenilsefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación se pudo completar con filtración viral e intercambio de solución amortiguadora. La proteína ActR11a-hFc se purificó hasta una pureza >98% según se determinó por cromatografía de exclusión por tamaño y > 95% según se determinó por SDS PAGE.

10 ActR11a-hFc y ActR11a-mFc mostraron una alta afinidad por los ligandos, particularmente por activina A. Se inmovilizaron GDF-11 o activina A ("ActA") en un chip CM5 de Biacore usando un procedimiento estándar de acoplamiento de amina. Se cargaron las proteínas ActR11a-hFc y ActR11a-mFc en el sistema y se midió la unión. ActR11a-hFc se unió a la activina con una constante de disociación (K_D) de 5×10^{12} y la proteína se unió a GDF11 con una K_D de 9.96×10^{-9} . Véase figura 2 ActR11a-mFc se comportó de manera similar.

15 ActR11a-hFc fue muy estable en los estudios farmacocinéticos. Se administraron a ratas 1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg de proteína ActR11a-hFc y se midieron los niveles plasmáticos de la proteína a las 24, 48, 72, 144 y 168 horas. En un estudio aparte, se administraron a ratas 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg. En las ratas, ActR11a-hFc tuvo una vida media sérica de 11 a 14 días y los niveles circulantes del fármaco fueron bastante altos después de dos
 20 semanas (11 µg/ml, 110 µg/ml o 304 µg/ml para las administraciones iniciales de 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg,
 25

respectivamente.) En monos filipinos, la vida media plasmática fue sustancialmente mayor de 14 días y los niveles circulantes del fármaco fueron 25 µg/ml, 304 µg/ml o 1440 µg/ml para las administraciones iniciales de 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg, respectivamente.

5 Ejemplo 2: ActRIIa-hFc aumenta los niveles de glóbulos rojos en primates no humanos

10 El estudio empleó cuatro grupos de cinco monos filipinos macho y cinco monos filipinos hembra cada uno, con tres por sexo por grupo con una terminación programada el día 29 y dos por sexo por grupo con una terminación programada el día 57. Cada animal recibió vehículo (grupo 1) o ActRIIa-Fc a dosis de 1, 10 o 30 mg/kg (grupos 2, 3 y 4, respectivamente) mediante inyección intravenosa (IV) los días 1, 8, 15 y 22. El volumen de dosis se mantuvo a 3 mL/kg. Se evaluaron varias medidas de los niveles de glóbulos rojos dos días antes de la primera administración y los días 15, 29 y 57 (para los restantes dos animales) después de la primera administración.

15 La ActRIIa-hFc causa incrementos estadísticamente significativos en la media de los parámetros de los glóbulos rojos (recuento de glóbulos rojos [RBC], [HGB] hemoglobina y hematocrito [HCT]) para machos y hembras, a todos los niveles de dosis y tiempos durante todo el estudio, con elevaciones acompañantes en los recuentos de reticulocitos absoluto y relativo (ARTC; RTC). Véanse las figuras 3 - 6.

20 Se calculó la significación estadística para cada grupo de tratamiento respecto a la media para el grupo de tratamiento al inicio del estudio (línea de base).

25 Notablemente, los aumentos en los recuentos de glóbulos rojos y los niveles de hemoglobina son aproximadamente equivalentes en magnitud a los efectos reportados con eritropoyetina. La aparición de esos efectos es más rápida con ActRIIa-Fc que con eritropoyetina.

Se observaron resultados similares con ratas y ratones.

Ejemplo 3: ActRIIa-hFc aumenta los niveles de glóbulos rojos en pacientes humanos

30 Se administró la proteína de fusión ActRIIa-hFc que se describe en el ejemplo 1 a pacientes humanos en un estudio aleatorio, doble ciego, controlado con placebo que se realizó para evaluar, fundamentalmente, la seguridad de la proteína en mujeres posmenopáusicas, saludables. Cuarenta y ocho sujetos se distribuyeron al azar en cohortes de 6 para recibir una dosis única de ActRIIa-hFc o placebo (5 activos: 1 placebo). Los niveles de dosis variaron entre 0,01 y 3,0 mg/kg por vía intravenosa (IV) y, entre 0,03 a 0,1 mg/kg por vía subcutánea (SC). Todos los sujetos se 35 siguieron durante 120 días. Además de los análisis farmacocinéticos PK), la actividad biológica de ActRIIa-hFc también se evaluó por medición de marcadores bioquímicos de formación y resorción ósea y niveles de FSH.

40 Para buscar posibles cambios, se examinaron en detalle los valores numéricos de hemoglobina y recuentos de glóbulos rojos para todos los sujetos en el transcurso del estudio y se compararon con los niveles al inicio. Se compararon los recuentos de plaquetas durante el mismo tiempo que el control. No hubo cambios clínicamente significativos de los valores iniciales en el tiempo para los recuentos de plaquetas.

45 El análisis farmacocinético de ActRIIa-hFc mostró un perfil lineal con la dosis y una media de la vida media de aproximadamente 25 a 32 días. El área bajo la curva (AUC) para ActRIIa-hFc se relacionó linealmente con la dosis, y la absorción tras la administración SC fue esencialmente completa (véanse las figuras 7 y 8). Estos datos indican que la vía SC es un método de dosificación deseable porque proporciona biodisponibilidad y vida media sérica equivalentes para el fármaco, en tanto evita el pico en las concentraciones séricas del fármaco asociadas con los primeros días de dosificación IV (véase figura 8). ActRIIa-hFc provocó un aumento rápido, sostenido y dependiente de la dosis en los niveles séricos de la fosfatasa alcalina específica del hueso (BAP), que es un marcador del 50 crecimiento óseo anabólico, y una disminución dependiente de la dosis en el telopéptido del colágeno tipo 1 C-terminal y los niveles de fosfatasa ácida tartrato-resistente 5b, que son marcadores de resorción ósea. Otros marcadores, como P1NP mostraron resultados no concluyentes. Los niveles de BAP mostraron efectos próximos a la saturación a la dosis mayor del fármaco, lo que indica que se pueden lograr efectos de la mitad del máximo en este biomarcador óseo anabólico a dosis de 0,3 mg/kg, con aumentos que van hasta 3 mg/kg. Calculada como una 55 relación del efecto farmacodinámico para AUC para el fármaco, la CE50 es 51.465 (día * ng/ml). Véase la figura 9. Estos cambios en el radiomarcador óseo se mantuvieron durante aproximadamente 120 días a los niveles de dosis más altos probados. También hubo una disminución dependiente de la dosis en los niveles séricos de FSH compatible con la inhibición de activina.

60 En general hubo una muy pequeña disminución en la hemoglobina, no relacionada con el fármaco, durante la primera semana del estudio probablemente relacionada con flebotomía del estudio en los grupos de 0,01 y 0,03 mg/kg de dosis ya hay sido administrada IV o SC. Los resultados de hemoglobina correspondientes a 0,1 mg/kg SC e IV fueron estables o mostraron incrementos modestos hacia los días 8 a 15. Al nivel de dosis de 0,3 mg/kg IV hubo un claro aumento en los niveles de HGB visto tan pronto como el día 2 y a menudo con un máximo en los días 15 a

29 que no se vio en los sujetos del placebo. En este punto del estudio, este cambio no alcanzó significación estadística.

5 En general, ActRIIa-hFc mostró un efecto dependiente de la dosis en los recuentos de glóbulos rojos y de reticulocitos. Para un resumen de los cambios hematológicos, véanse las figuras 10-13.

Ejemplo 4: Proteínas ActRIIa-Fc alternativas

10 Diversas variantes de ActRIIa que se pueden utilizarse de conformidad con los métodos descritos en este documento se describen en la solicitud de patente internacional publicada como WO2006/012627 (véanse p. ej., págs. 55-58). Un constructo alternativo puede tener una delección de la cola C terminal (los 15 aminoácidos finales del dominio extracelular de ActRIIa. A continuación se presenta la secuencia para dicho constructo (porción Fc subrayada) (SEC. ID N°: 12):

15 ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
CWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPMTGGGTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPRE
POVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGD
SFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK

Ejemplo 5: Proteínas de fusión ActRIIb-Fc

20 Los solicitantes construyeron una proteína de fusión ActRIIb soluble que tiene el dominio extracelular de ActRIIb humano fusionado a un dominio Fc humano. Una estructura co-cristalina de activina y ActRIIb extracelular no mostró ningún papel para los 15 aminoácidos finales (C-terminales) (denominados la "cola" en este documento) del dominio extracelular del ligando de unión. Esta secuencia no se pudo resolver en la estructura cristalina, lo que sugiere que esos residuos están presentes en un lazo flexible que no se empacó, uniformemente en el cristal. Thompson et al. EMBO J. 2003 Apr 1;22(7):1555-66. Esta secuencia también está poco conservada entre ActRIIb y ActRIIa. En consecuencia, estos residuos fueron omitidos en el constructo de fusión básico, o de fondo, ActRIIb-Fc. Además, la posición 64 en la forma de fondo está ocupada por una alanina, que se considera generalmente la forma "natural", aunque un alelo A64R se produce naturalmente. Por lo tanto, la fusión de fondo ActRIIb-Fc tiene la secuencia (porción Fc subrayada) (SEC. ID N°: 20):

25 SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVK
KGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGGTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQP
REPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK

30 Sorprendentemente, se encontró que la cola C-terminal aumenta la unión de activina y GDF-11, por lo tanto una versión preferida de ActRIIb-Fc tiene una secuencia (porción Fc subrayada) (SEC. ID N°: 21):

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVK
KGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPVTEYPPP
TAPTGGGTHTCPPCPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPVPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
OPENNYKTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTOKSL
SLSPGK

Diversas variantes de ActRIIb que se pueden usar de acuerdo con los métodos descritos en este documento se describen en la solicitud de patente internacional publicada como WO2006/012627 (véanse por ejemplo, pp. 59-60).

Ejemplo 6: ActRIIb-hFc estimula la eritropoyesis en primates no humanos

5 Se administró ActRIIb-hFc (IgG1) una vez por semana durante 1 mes a monos filipinos machos y hembras mediante inyección subcutánea. Cuarenta y ocho monos filipinos (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 10 dosis de 3, 10 o 30 mg/kg una vez por semana durante 4 semanas (un total de 5 dosis). Los parámetros evaluados incluyeron pruebas analíticas generales (hematología, bioquímica clínica, coagulación y análisis de orina). ActRIIb-hFc causó una media absoluta elevada, estadísticamente significativa, de los valores de reticulocitos hacia el día 15 en los animales tratados. Hacia el día 36, ActRIIb-hFc causó varios cambios hematológicos, como una media absoluta elevada de los valores de reticulocitos y los valores de ancho de distribución de los glóbulos rojos, y una 15 media de la concentración de hemoglobina corpuscular menor. Todos los grupos tratados y ambos sexos fueron afectados.

Esos efectos son compatibles con un efecto positivo de ActRIIb-hFc en la liberación de reticulocitos inmaduros de la médula ósea. Este efecto se revirtió luego del período de reposo farmacológico de los animales tratados (hacia el día 56 del estudio). En consecuencia, concluimos que ActRIIb-hFc estimula la eritropoyesis.

20 Si bien se han discutido realizaciones específicas del tema, la especificación anterior es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variaciones se tornarán evidentes para los expertos en el área después de revisar esta especificación y las reivindicaciones siguientes. El alcance total de la invención se debe determinar por referencia a las reivindicaciones y la especificación.

25

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista de activina-ActRII para usar en el tratamiento o la prevención de la anemia en un paciente humano que lo necesita, donde el antagonista de activina-ActRII es un polipéptido compuesto por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- a) la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 o una secuencia de aminoácidos al menos 90% o 95% idéntica a SEC ID N°: 2;
 - b) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 3 o una secuencia de aminoácidos al menos 90% o 95% idéntica a SEC. ID N°:3;
 - c) un polipéptido que contiene al menos 50 aminoácidos consecutivos seleccionados de SEC. ID N°: 2;
 - d) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 16 o una secuencia de aminoácidos al menos 90% o 95% idéntica a SEC. ID N°: 16;
 - e) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 17 o una secuencia de aminoácidos al menos 90% o 95% idéntica a SEC. ID N°: 17;
 - f) un polipéptido que contiene al menos 50 aminoácidos consecutivos seleccionados de SEC. ID N°: 16;
 - g) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 7 o una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a SEC. ID N°: 7;
 - h) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 12 o una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a SEC. ID N°: 12;
 - i) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 20 o una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a SEC. ID N°: 20; y
 - j) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 21 o secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a SEC. ID N°: 21.
2. El antagonista para usar de conformidad con la reivindicación 1, donde dicho polipéptido antagonista de activina-ActRII es una proteína de fusión que incluye, además del dicho polipéptido antagonista de activina-ActRII, una o más porciones de polipéptido que mejoran una o más de las siguientes: la estabilidad in vivo, la vida media in vivo, la absorción/administración, la localización o distribución tisular, la formación de complejos proteínicos, y/o la purificación.
3. El antagonista para usar de conformidad con la reivindicación 2, donde dicha proteína de fusión incluye una porción de polipéptido seleccionada del grupo que consiste en: un dominio Fc de inmunoglobulina y una albúmina sérica.
4. El antagonista para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho polipéptido antagonista de activina o ActRII incluye uno o más de residuos de aminoácidos modificados seleccionados entre: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a una porción lipídica, tiene aminoácido conjugado a un agente de derivatización orgánico.
5. El antagonista para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la anemia está asociada a mieloma múltiple.
6. El antagonista para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la anemia está asociada a enfermedad renal crónica en el paciente.
7. El antagonista para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la anemia está asociada a quimioterapia antineoplásica del paciente.
8. El antagonista para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la anemia está asociada a síndrome mielodisplásico.
9. El antagonista para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la anemia está asociada a una talasemia.
10. Un método para identificar un fármaco que aumente los niveles de glóbulos rojos, donde el método comprende:
- a) poner en contacto un fármaco de interés con un polipéptido ActRII aislado que es normalmente capaz de unirse a activina;
 - b) agregar una composición que contenga activina;
 - c) cuantificar la eficacia del fármaco para inhibir la formación de complejos entre el polipéptido ActRII y activina; y
 - d) evaluar el efecto del fármaco sobre los niveles de glóbulos rojos en un animal.
11. Una proteína de fusión ActRII-Fc para usar en el tratamiento o la prevención de la anemia en un paciente

humano que lo necesita, donde la proteína de fusión ActRII-Fc contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- 5 a) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 3 o una secuencia que es al menos 90% o 95% idéntica a SEC. ID N°: 3,
 - b) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°:2 o una secuencia que es al menos 90% o 95% idéntica a SEC. ID N°: 2,
 - 10 c) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°:7 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% o 95% idéntica a SEC. ID N°: 7,
 - d) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 12 o una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a SEC. ID N°: 12;
 - e) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 17 o una secuencia que es al menos 90% o 95% idéntica a SEC. ID N°: 17,
 - e) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 16 o una secuencia que es al menos 90% o 95% idéntica a SEC. ID N°: 16,
 - 15 f) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°:20 o una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a SEC. ID N°: 20, y
 - g) la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°:21 o una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a SEC. ID N°: 21.
- 20 12. La proteína para usar de conformidad con la reivindicación 11, que causa menos de 15% de aumento en la masa del músculo esquelético del paciente.
- 25 13. La proteína para usar de conformidad con la reivindicación 11 o la reivindicación 12, que es administrada con el fin de alcanzar una concentración sérica en el paciente de al menos 100 ng/ml durante un período de aproximadamente 20 a 30 días.
14. La proteína para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que es administrada con el fin de alcanzar una concentración sérica en el paciente en el rango de 100 ng/ml a 1000 ng/ml.
- 30 15. La proteína para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, que tiene una vida media sérica entre 15 y 30 días.
- 35 16. La proteína para para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, destinada a ser administrada al paciente con una frecuencia no mayor de una vez por semana.
17. La proteína para usar de conformidad con la reivindicación 16, destinada a ser administrada al paciente con una frecuencia no mayor de una vez por mes.

Figuras

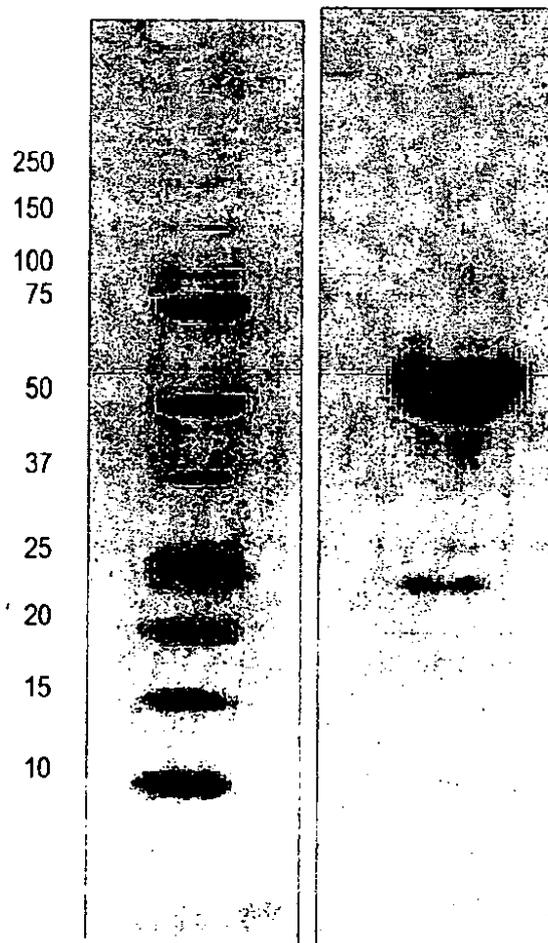
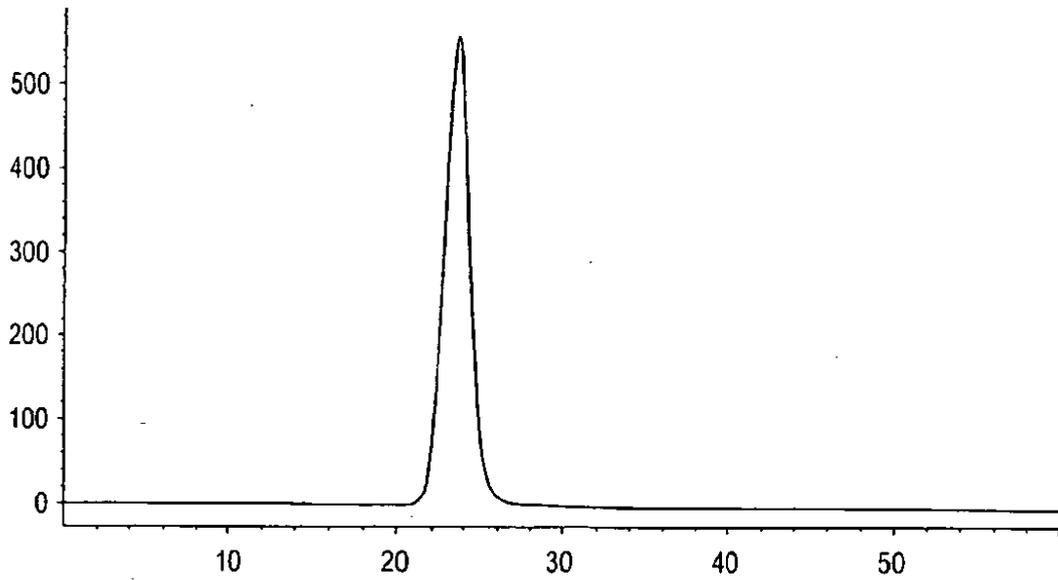


Figura 1

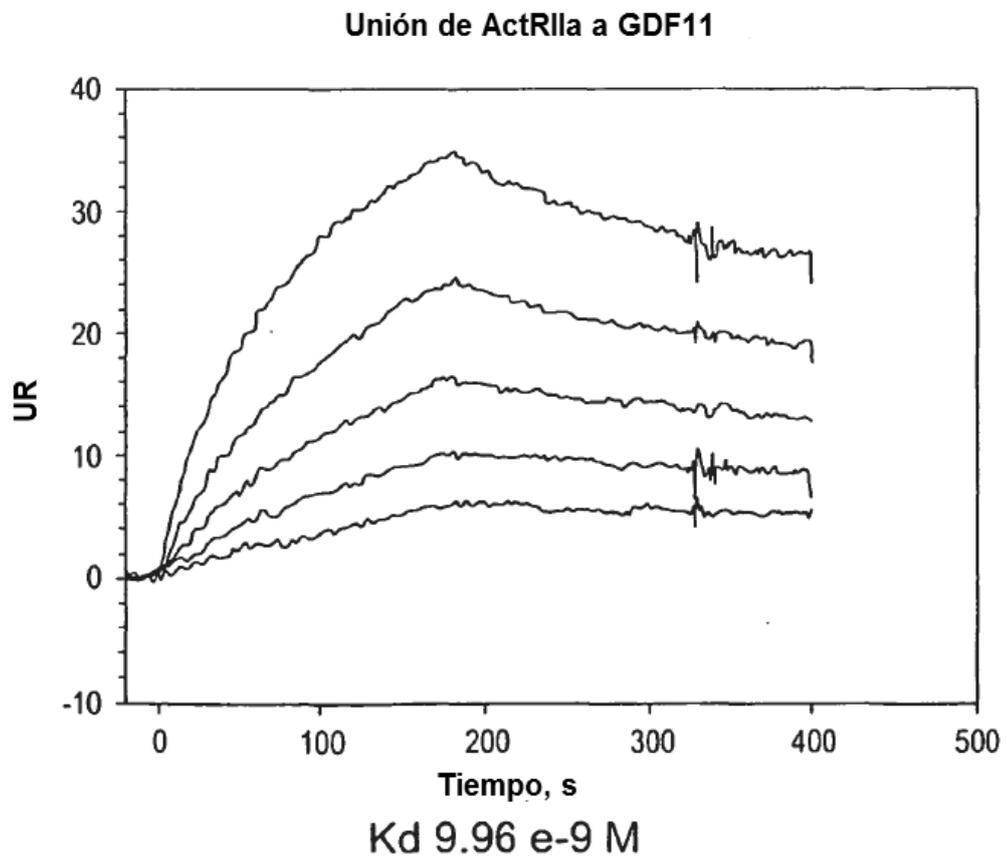
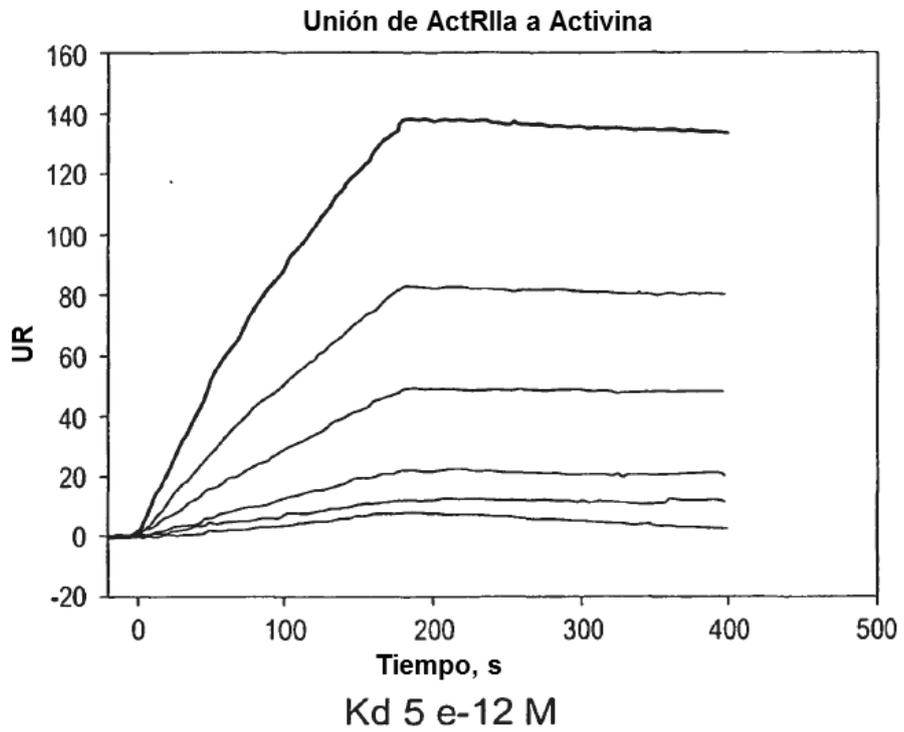


Figura 2

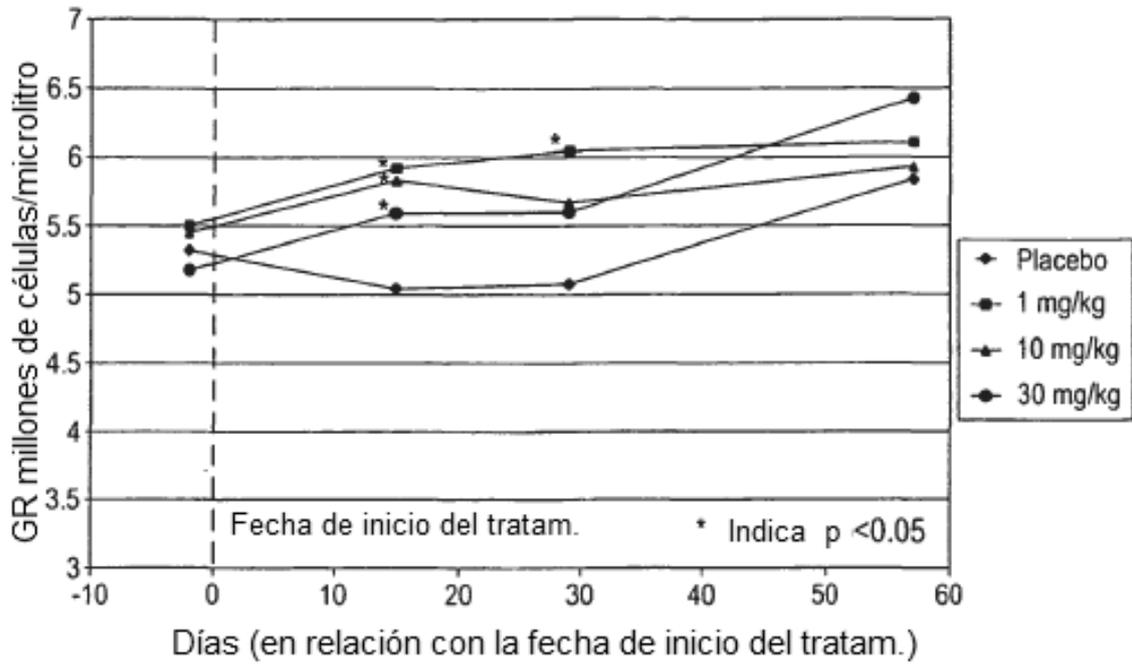


Figura 3 A

Efecto de ActRIIA-Fc sobre la hemoglobina en PNH hembra

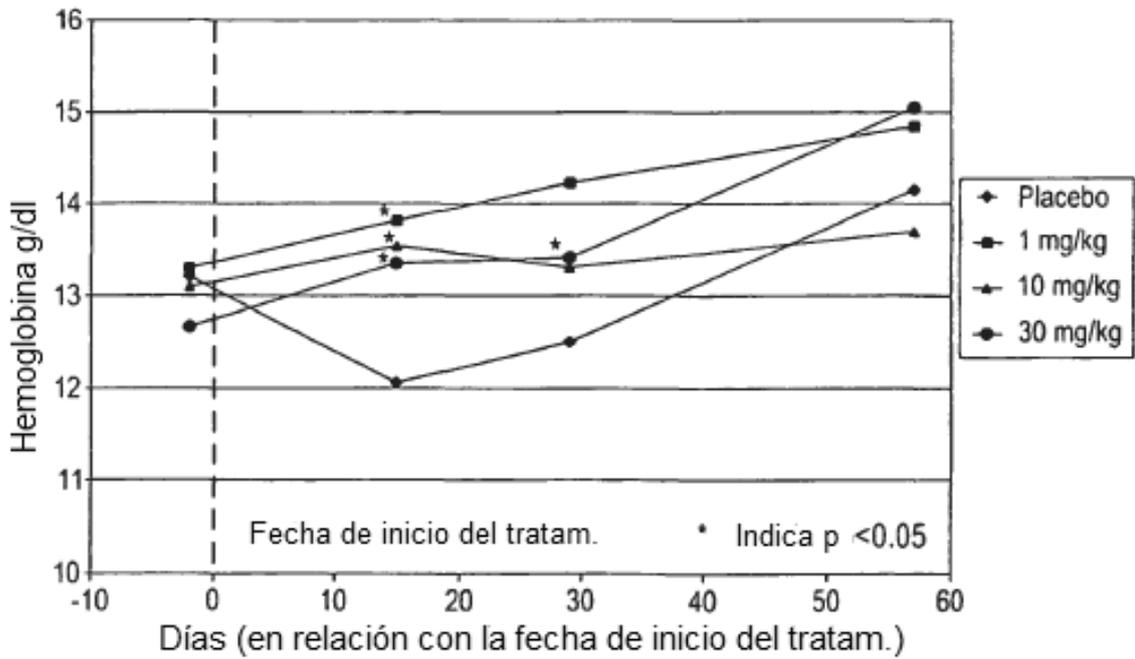


Figura 3 B

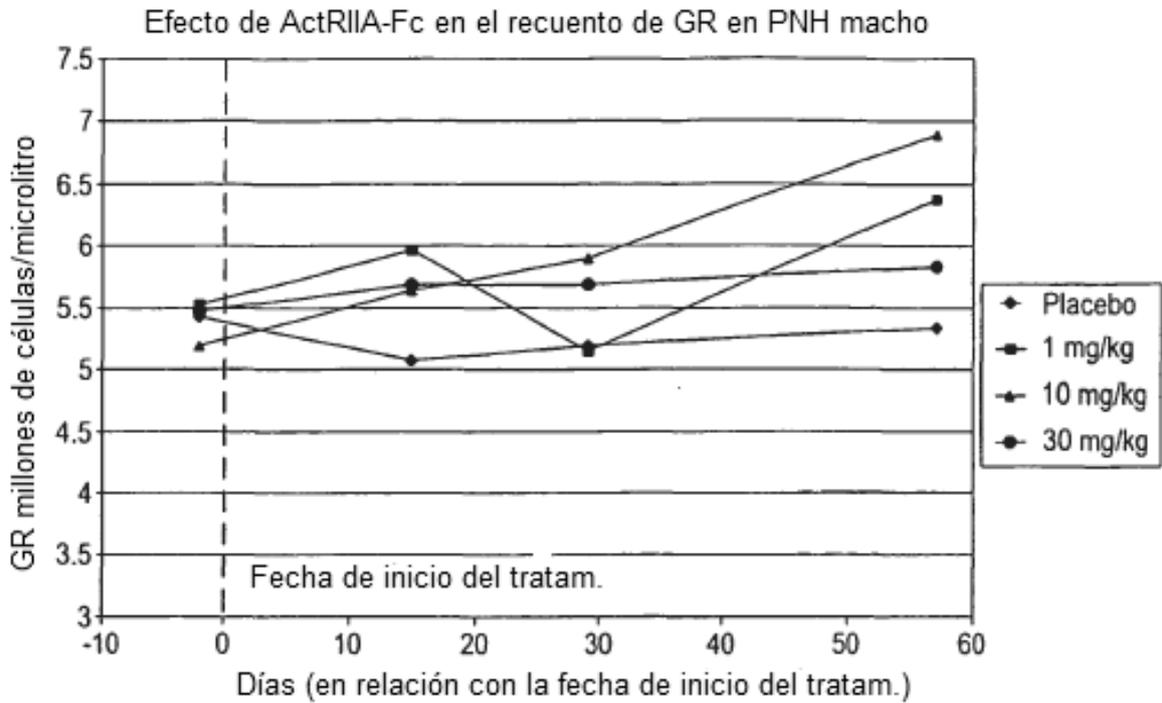


Figura 4 A

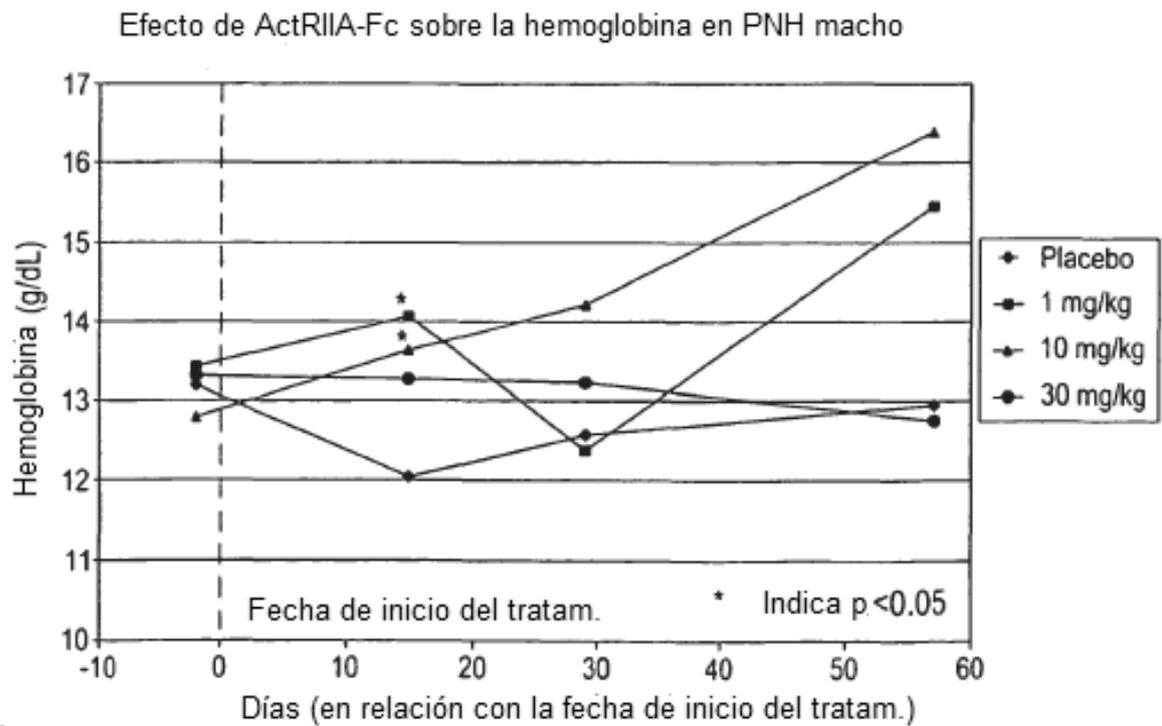


Figura 4 B

Efecto de ActRIIA-Fc sobre el recuento de reticulocitos en PNH hembra

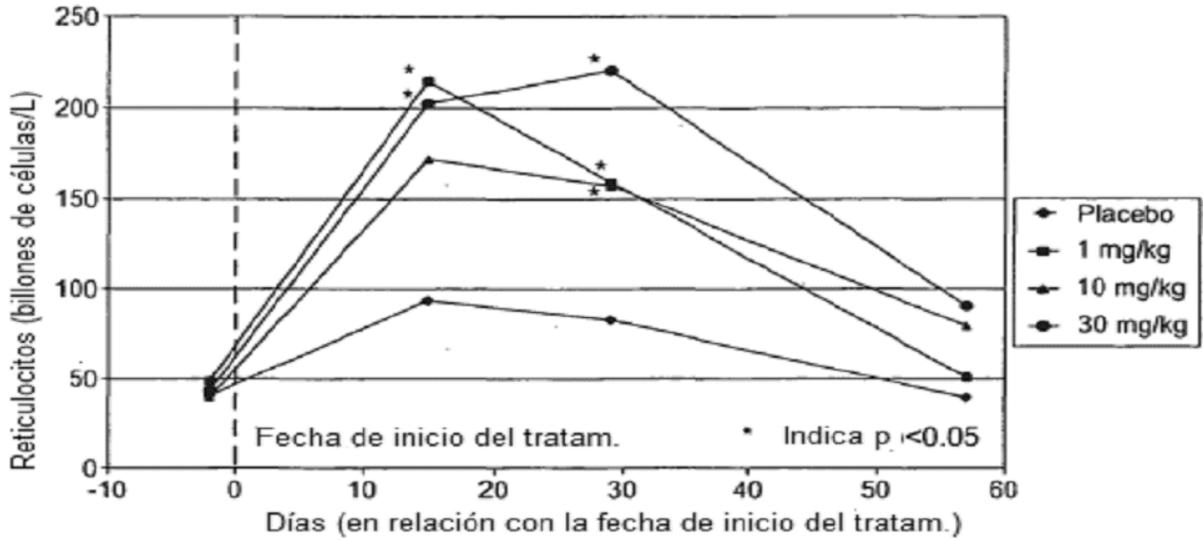


Figura 5 A

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

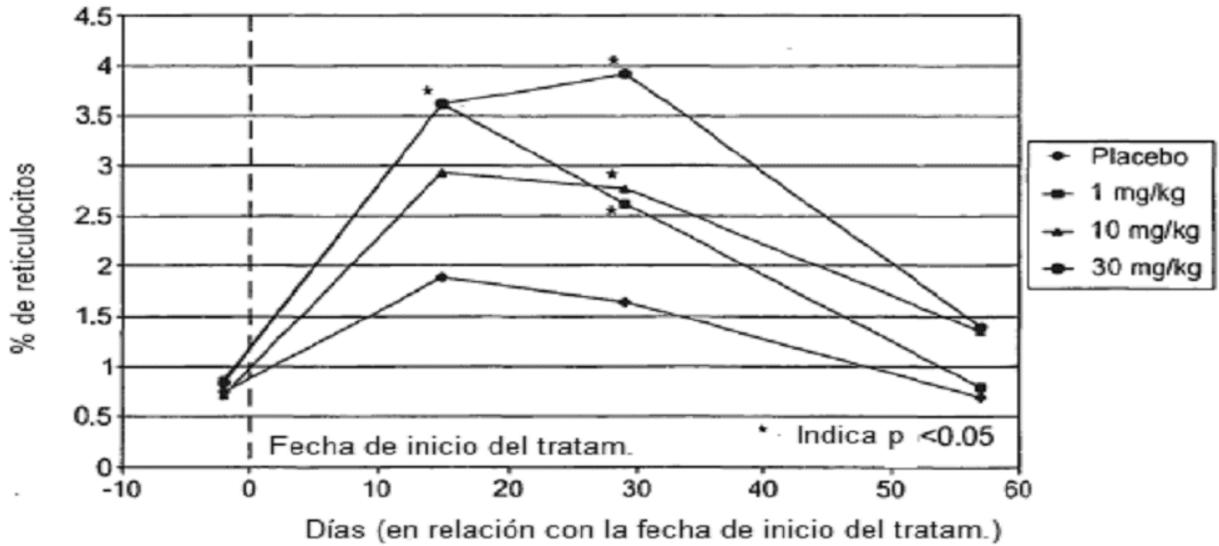


Figura 5 B

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

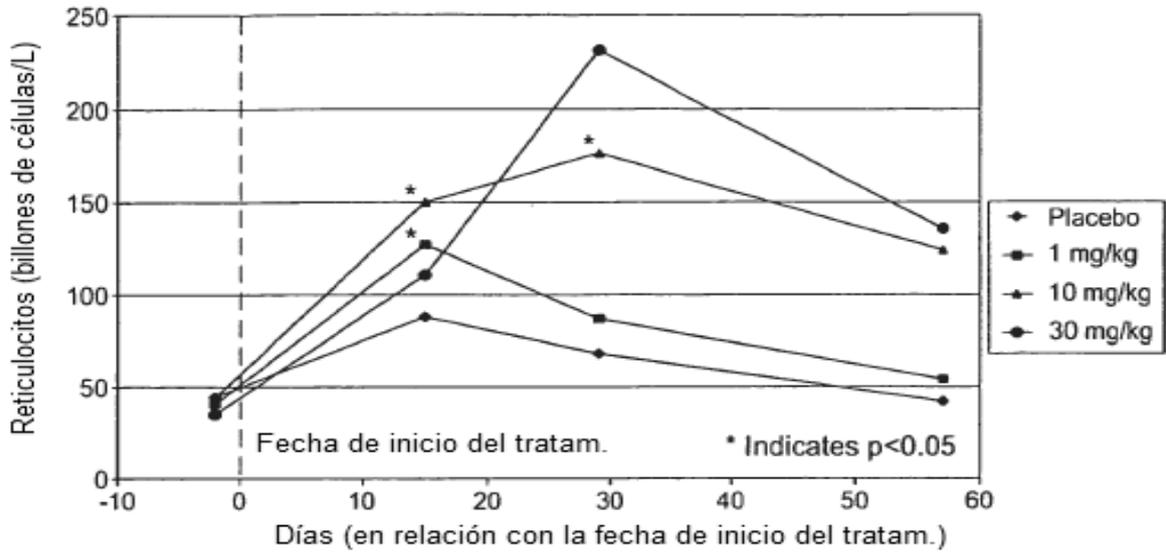


Figura 6 A

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

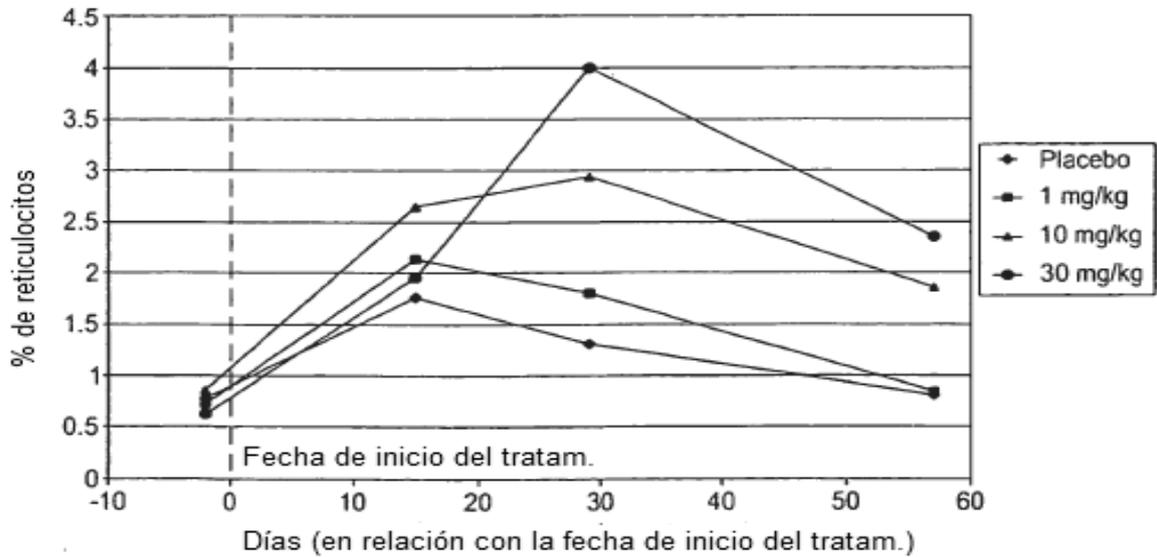


Figura 6 B

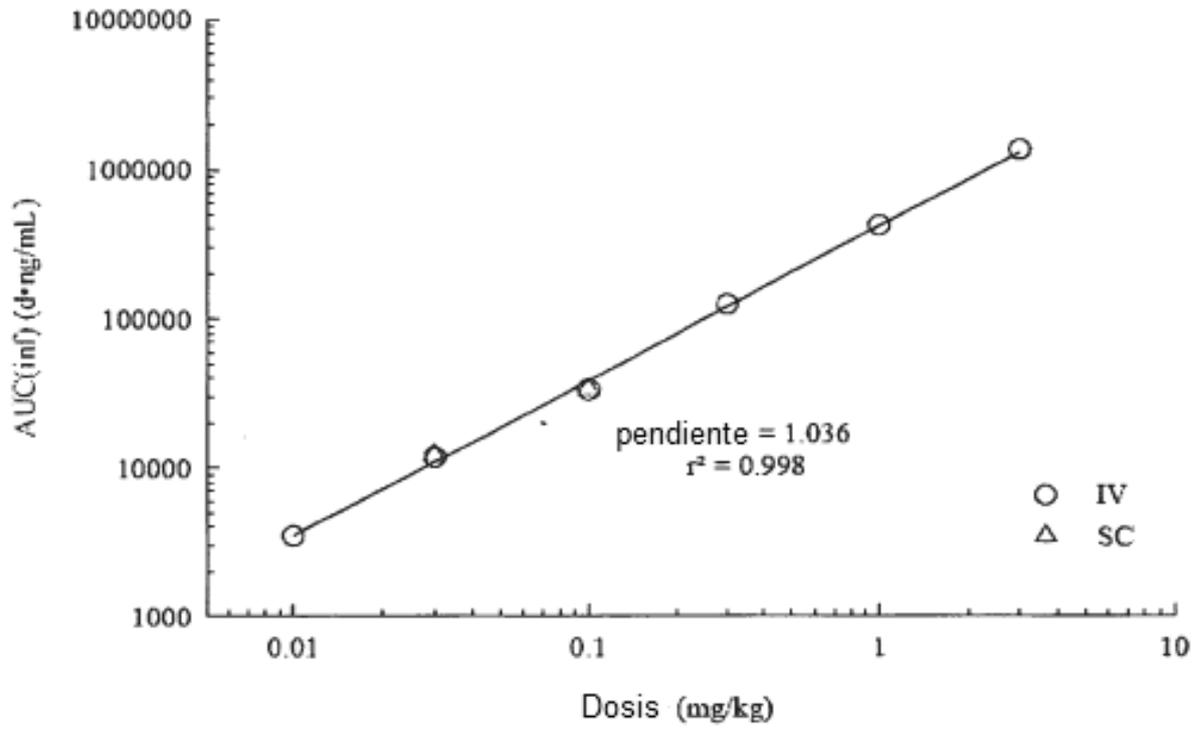


Figura 7

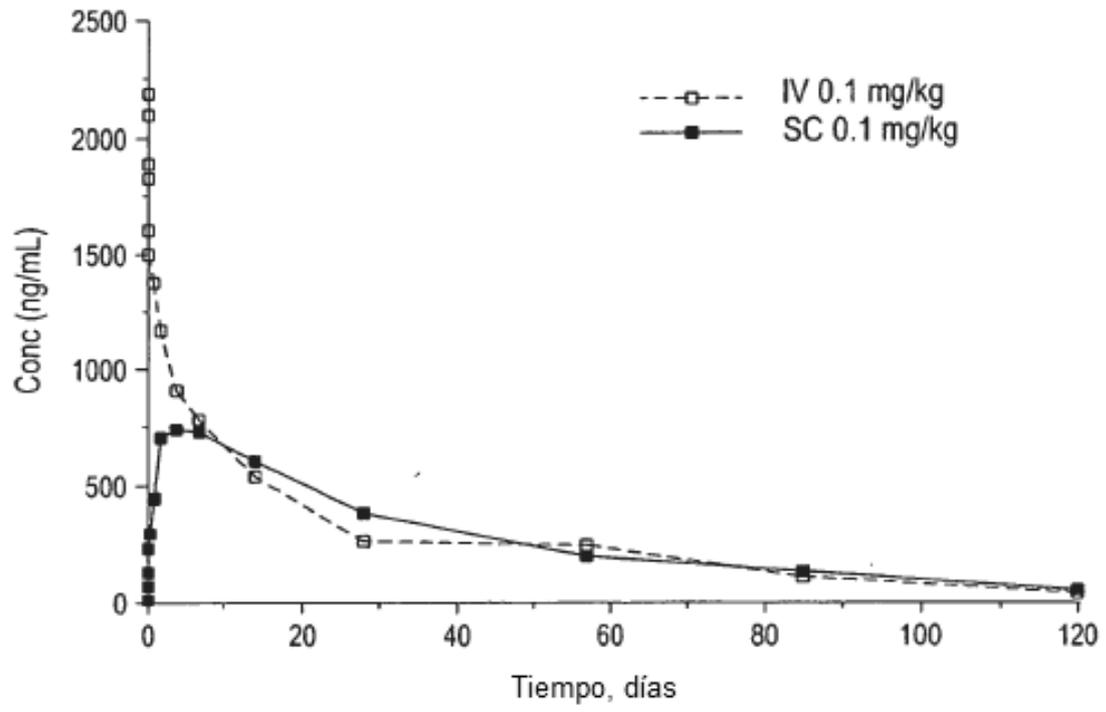


Figura 8

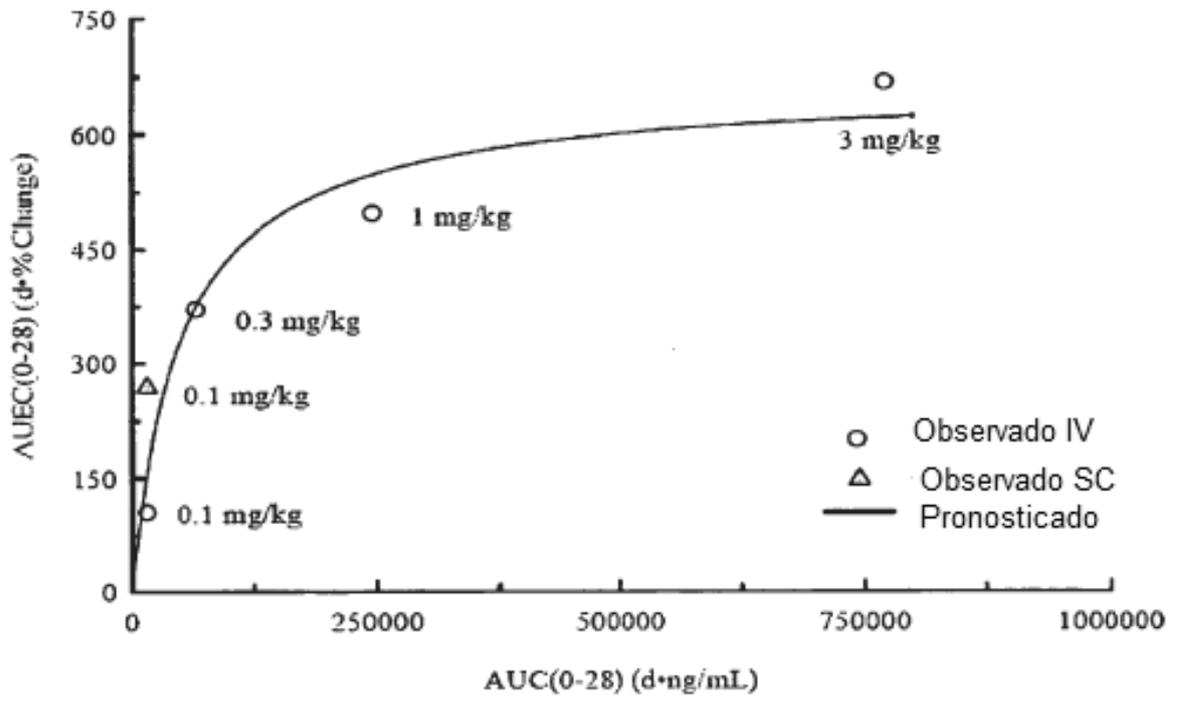


Figura 9

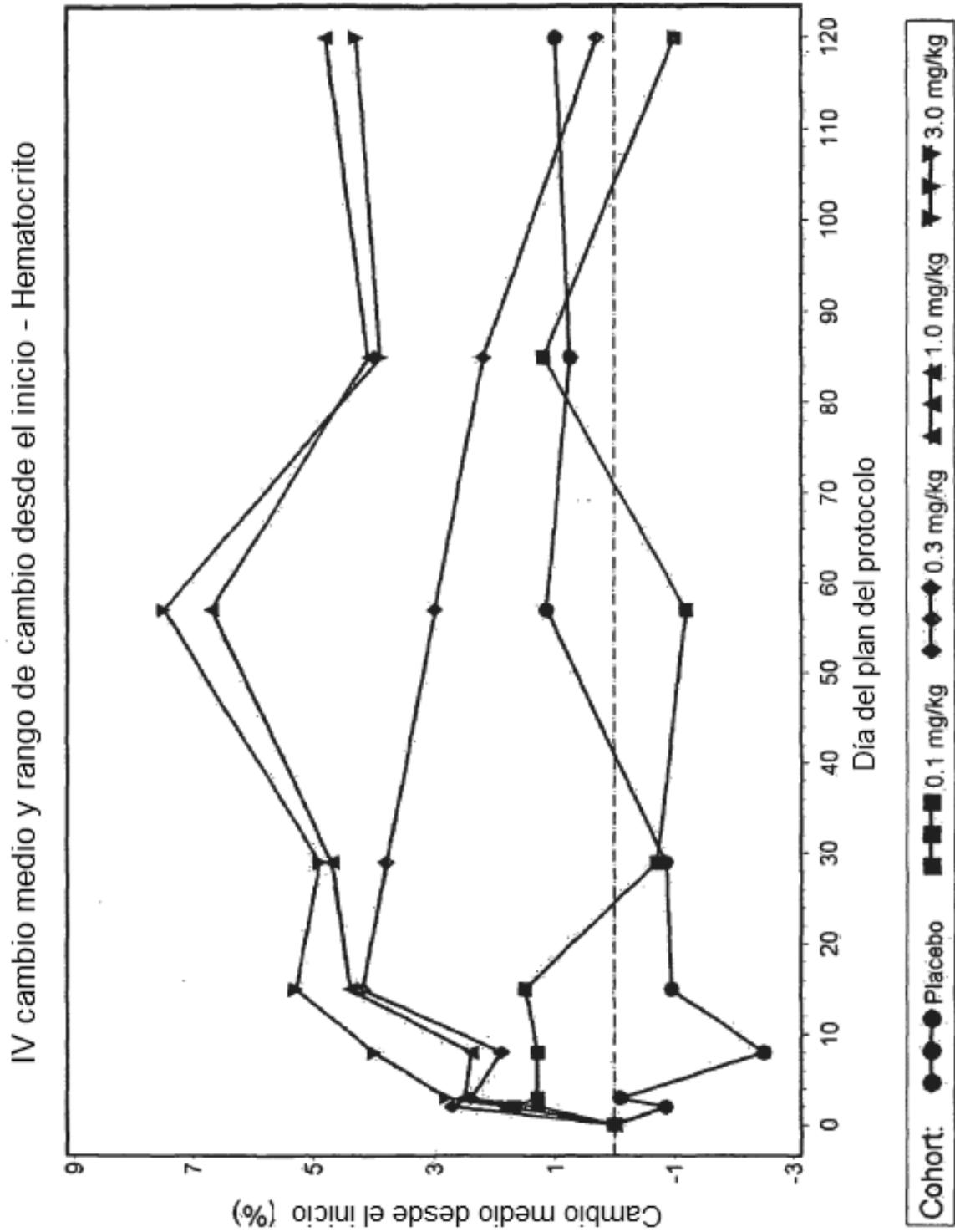


Figura 10

IV cambio medio y rango de cambio desde el inicio - Hemoglobina

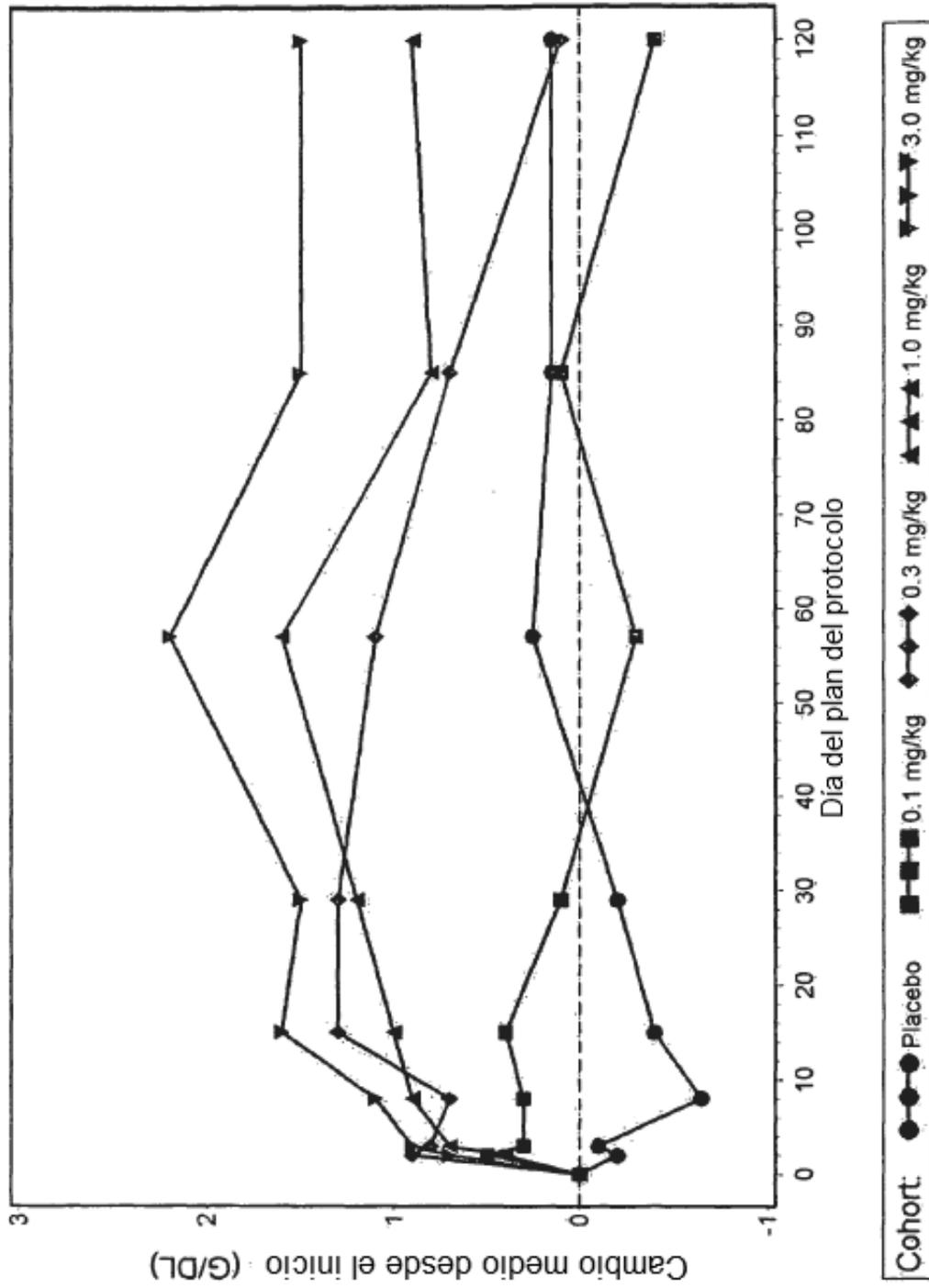


Figura 11

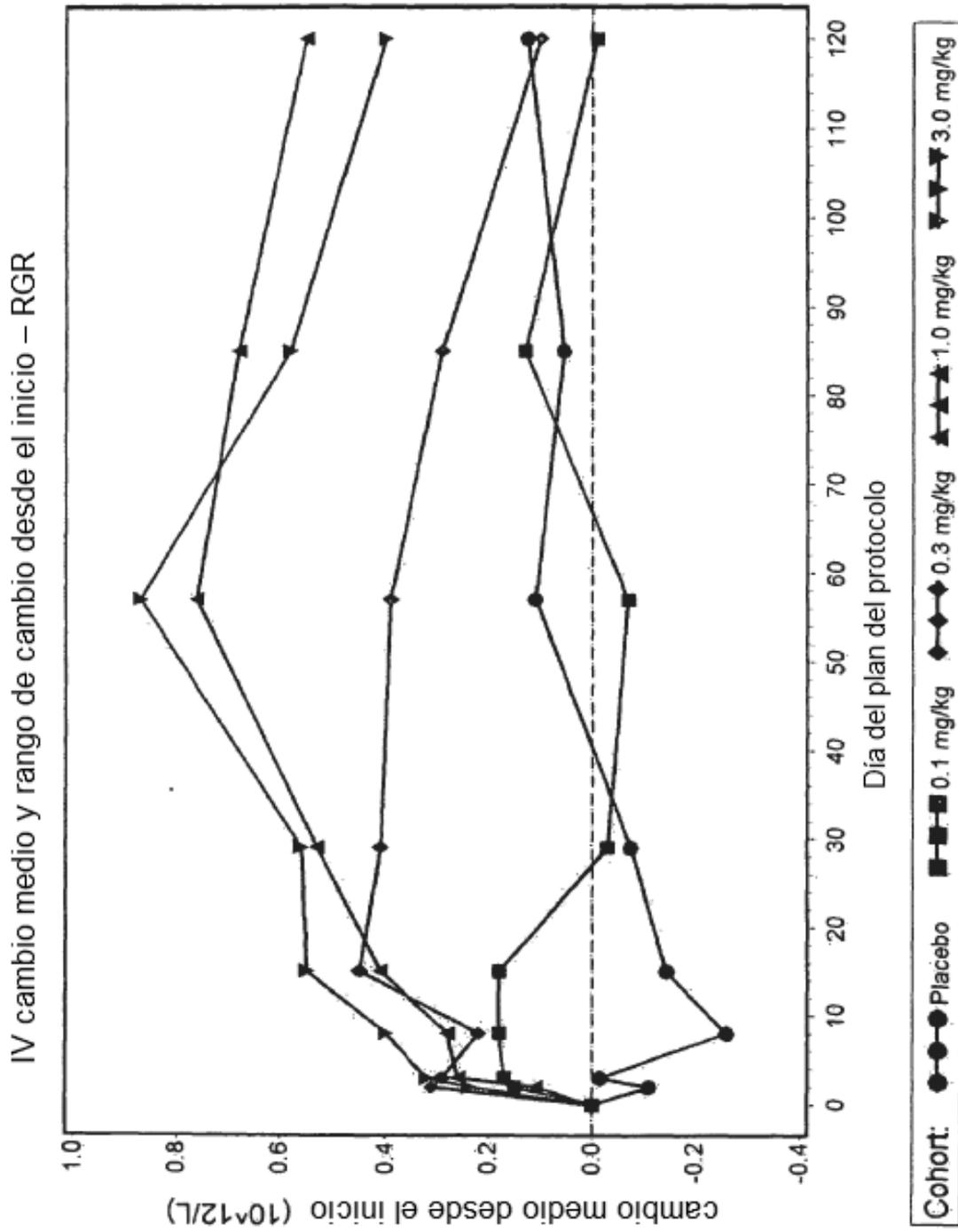


Figura 12

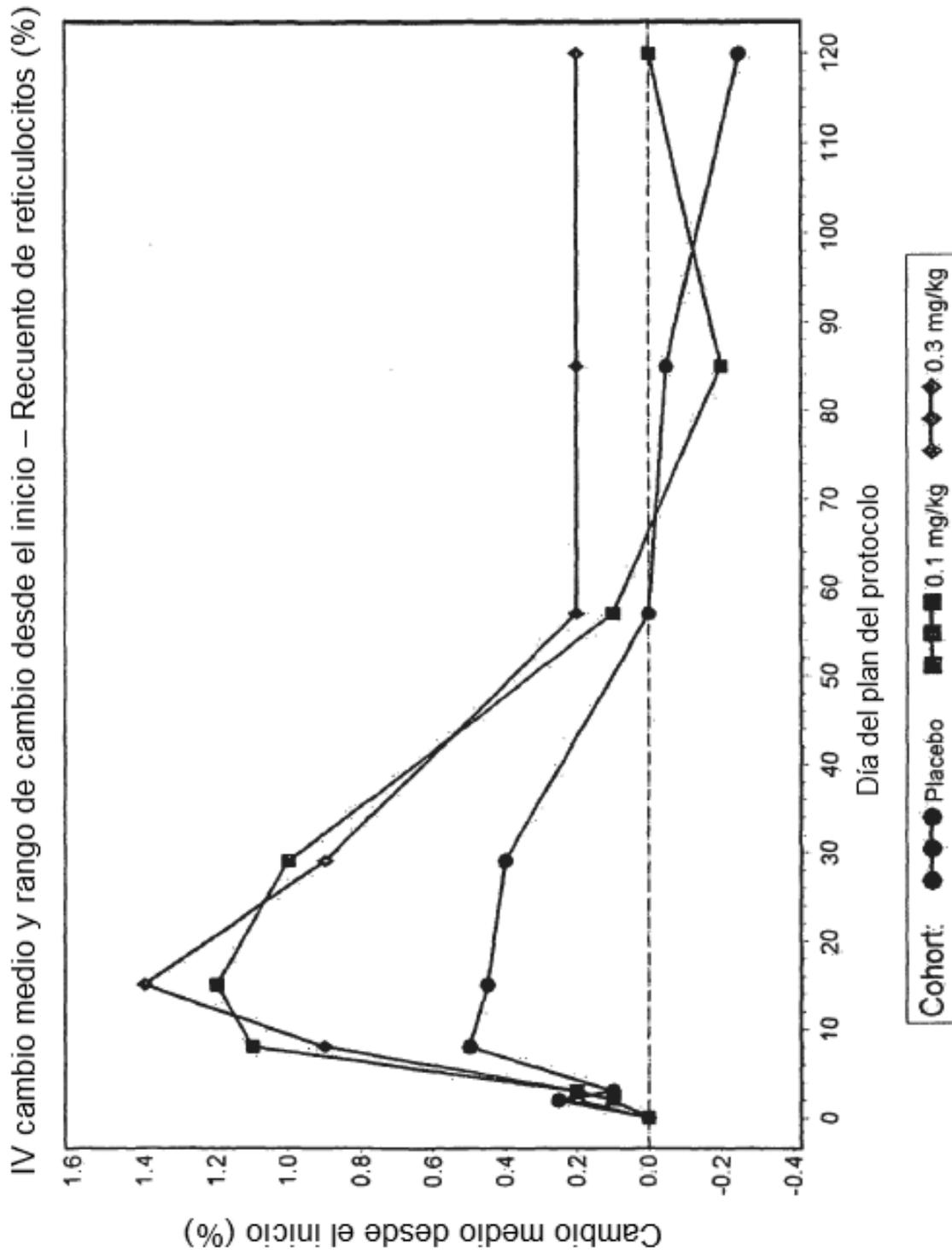


Figura 13