

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 866**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 3/02 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2006 E 10196139 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015 EP 2335719**

54 Título: **Uso de proteínas de fusión de hemojuvelina para regular el metabolismo del hierro mediado por hepcidina**

30 Prioridad:

16.02.2005 US 653479 P

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

09.10.2015

73 Titular/es:

**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(100.0%)**

**55 Fruit Street
Boston, MA 02114, US**

72 Inventor/es:

**LIN, HERBERT Y;
BABITT, JODIE;
CHUNG, RAYMOND T;
SAMAD, TAREK A.;
SCHNEYER, ALAN L. y
WOOLF, CLIFFORD**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 547 866 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de proteínas de fusión de hemojuvelina para regular el metabolismo del hierro mediado por hepcidina

Antecedentes de la Invención

- El hierro es un elemento esencial para el crecimiento y la supervivencia de casi todos los organismos vivos (P. Aisen *et al.*, J. Biochem. Cell Biol., 2001, 33: 940-959) excepto para unas pocas especies bacterianas poco habituales. Juega un papel importante en el transporte y almacenamiento del oxígeno (en combinación con las moléculas que unen oxígeno tales como hemoglobina y mioglobulina) y es un componente clave de muchas enzimas que catalizan las reacciones redox requeridas para la generación de energía (por ejemplo, citocromos), la producción de varios intermediarios metabólicos y para la defensa del huésped (por ejemplo, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato [NADPH] oxidasa). El hierro también puede ser tóxico. Cataliza la generación de especies de radicales reactivos que pueden atacar las membranas, proteínas y ADN celulares (J.M.C. Gutteridge *et al.*, Biochem. J., 1982, 296: 605-609) y activa NF-KB, el factor de transcripción prototipo para los genes implicados en la inflamación (S. Xiong *et al.*, J. Biol. Chem., 2003, 278: 17646-17654). A niveles altos, la acumulación de hierro en los tejidos es dañina.
- Para prevenir la deficiencia de hierro o la sobrecarga de hierro, virtualmente todos los organismos han desarrollado mecanismos elaborados para regular la captación y flujo de salida del hierro (C. Finch, Blood, 1994, 84: 1697-1702). En los mamíferos adultos, la homeostasis del hierro depende de la absorción regulada del hierro por el enterocito, una célula altamente especializada del duodeno que coordina la captación del hierro de la dieta y el transporte en el cuerpo. En el feto, los mecanismos implicados en el transporte de hierro placentario materno-fetal también están regulados firmemente. El hierro se almacena en el cuerpo en la forma de complejos de proteína, ferritina y hemosiderina, y se transporta en el plasma mediante el complejo de proteínas, transferrina. En circunstancias normales, sólo existen cantidades traza de hierro fuera de estos depósitos fisiológicos, aunque el hierro almacenado puede movilizarse por reuso. Las perturbaciones en estos mecanismos altamente regulados pueden dar lugar a sobrecarga de hierro o deficiencia de hierro en el cuerpo.
- La deficiencia de hierro es el trastorno nutricional más común en el mundo. Tantas como 4-5 mil millones de personas (es decir, 65-80% de la población mundial) puede ser deficiente en hierro; y 2 mil millones de personas (más del 30% de la población mundial, fundamentalmente niños y mujeres con edad de tener niños) son anémicos, debido principalmente a deficiencia de hierro. En los países en desarrollo, la enfermedad se exacerba por la malaria y las infecciones por lombrices. La deficiencia de hierro afecta a más gente que cualquier otra afección, constituyendo una afección de salud pública de proporciones epidémicas. Los trastornos de sobrecarga de hierro son menos frecuentes; sin embargo, pueden dar lugar a afecciones graves potencialmente mortales. En el mundo, aproximadamente 24 millones de personas con ascendencia en el norte de Europa padecen un trastorno genético denominado hemocromatosis. Otros 600 millones portan uno de los genes responsables del trastorno, y absorben hasta 50% más hierro que los no portadores. La enfermedad da lugar a la acumulación de hierro, particularmente en el hígado y otros órganos de almacenamiento, lo que puede causar fallo orgánico (como cirrosis del hígado), ataque cardíaco, cáncer y daño pancreático.
- Las disfunciones en el metabolismo del hierro plantean un problema importante en el mundo debido no sólo a su frecuencia sino también a la ausencia de opciones terapéuticas (N.C. Andrews, N. Engl. J. Med., 1999, 341: 1986-1995). Las afecciones de sobrecarga de hierro se tratan generalmente por la administración de agentes quelantes de hierro, que ejercen sus efectos removilizando el hierro acumulado y permitiendo su excreción. En la práctica, sin embargo, ninguno de los agentes quelantes que se han evaluado hasta la fecha se ha mostrado enteramente satisfactorio, presentando baja absorción gastrointestinal, y bien baja eficacia, baja selectividad o efectos secundarios indeseables. El tratamiento preferido para reducir los niveles de hierro en la mayor parte de los pacientes con hemocromatosis se denomina flebotomía terapéutica, un procedimiento que simplemente consiste en eliminar sangre del cuerpo. Los pacientes con hemocromatosis necesitan habitualmente un gran número de flebotomías en un periodo de tiempo relativamente corto (hasta una o dos veces por semana). Así, además de presentar los mismos riesgos que con cualquier donación de sangre (por ejemplo, náusea, vómito, mareo, desmayo, hematoma, convulsiones o infección local), la flebotomía también puede ser altamente restrictiva para el paciente.
- Para tratar las afecciones de deficiencia de hierro se usan varias formas de sal de hierro. Habitualmente, se necesitan varios meses de terapia de reemplazo para reponer las reservas de hierro del cuerpo. Algunos pacientes tienen dificultad para tolerar las sales de hierro porque estas sustancias tienden a causar distrés gastrointestinal. Los estudios también han indicado que las preparaciones líquidas de sal de hierro, proporcionadas a niños pequeños, pueden causar una tinción permanente de los dientes. Sin embargo, es más problemático el descubrimiento de que dosis altas de suplementos de hierro, tomadas oralmente o por inyección, pueden incrementar la susceptibilidad a infección bacteriana.
- Claramente, permanece altamente deseable el desarrollo de nuevos agentes y métodos para la prevención y tratamiento de los trastornos del metabolismo del hierro.

Compendio de la Invención

La invención proporciona una proteína de fusión HJV.Fc para uso en un método para inhibir la expresión o actividad de hepcidina para la prevención o tratamiento de una afección asociada con deficiencia de hierro en un sujeto, en el que la proteína de fusión HJV.Fc es un antagonista de BMP.

- 5 La invención proporciona además una proteína de fusión HJV.Fc para uso en la regulación del metabolismo del hierro o un proceso metabólico del hierro para la prevención o tratamiento de una afección asociada con deficiencia de hierro en un sujeto, en el que la proteína de fusión HJV.Fc es un antagonista de BMP.

Se proporciona además según la invención una proteína de fusión HJV.Fc para uso en el tratamiento o prevención de perturbaciones en el metabolismo del hierro o un proceso metabólico del hierro para la prevención o tratamiento de una afección asociada con deficiencia de hierro en un sujeto, en el que la proteína de fusión HJV.Fc es un antagonista de BMP.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método *in vitro* para identificar un compuesto que regula la expresión o actividad de hepcidina en un sistema, en el que el sistema expresa TGF- β o BMP, comprendiendo el método las etapas de: incubar el sistema con un compuesto candidato en condiciones y durante un tiempo suficiente para que el compuesto candidato module la actividad de señalización del TGF- β o BMP, para obtener un sistema de ensayo; medir, en el sistema de ensayo, al menos un factor que sea representativo de la actividad de señalización del TGF- β o BMP; incubar el sistema en las mismas condiciones y durante el mismo tiempo sin el compuesto candidato, para obtener un sistema control; medir el factor en el sistema control; comparar el factor medido en los sistemas de ensayo y control; y determinar que el compuesto candidato regula la expresión o actividad de hepcidina en el sistema, si el factor medido en el sistema de ensayo es menor que o mayor que el factor medido en el sistema control.

La presente descripción proporciona sistemas y estrategias mejoradas para regular el metabolismo del hierro en mamíferos, incluyendo seres humanos. En particular, engloba reactivos y procesos para el tratamiento de afecciones asociadas con deficiencia de hierro o sobrecarga de hierro. La descripción también proporciona herramientas y métodos de cribado para la identificación de compuestos útiles para el tratamiento de trastornos del metabolismo del hierro. Comparados con las terapias existentes tales como suplemento de hierro, quelación de hierro y flebotomía, los métodos y composiciones inventivos tienen menos probabilidades de inducir efectos secundarios indeseables.

En general, la presente descripción implica el uso de moduladores de la actividad de señalización de los miembros de la superfamilia TGF- β para controlar y/o regular la expresión o actividad de hepcidina, un regulador clave del metabolismo del hierro en los mamíferos.

Más específicamente, en un aspecto, la presente descripción proporciona métodos para regular la expresión o actividad de la hepcidina en un sujeto por la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un compuesto que modula la actividad de señalización de al menos un miembro de la superfamilia TGF- β . La presente descripción también proporciona métodos para regular la expresión o actividad de la hepcidina en un sistema biológico poniendo en contacto el sistema biológico con una cantidad eficaz de un compuesto que modula la actividad de señalización de al menos un miembro de la superfamilia TGF- β . En determinadas realizaciones, el miembro de la superfamilia TGF- β es TGF- β o BMP. El compuesto administrado al sujeto o que se pone en contacto con el sistema biológico puede comprender un agente seleccionado del grupo que consiste en un agonista de TGF- β , un antagonista de TGF- β , un agonista de BMP, un antagonista de BMP, o combinaciones de éstos. El sistema biológico puede ser una célula, un fluido biológico, un tejido biológico o un animal.

En determinadas realizaciones, el agente se selecciona del grupo que consiste en una proteína de fusión HJV.Fc, una proteína de fusión Dragon.Fc, una proteína de fusión DLN.Fc, una proteína de fusión sT β RII.Fc, una proteína de fusión sT β RII-B.Fc y una proteína de fusión sT β RIII Δ .Fc. En algunas realizaciones, el agente comprende una proteína de fusión seleccionada del grupo que consiste en una proteína de fusión HJV.Fc mutante, una proteína de fusión Dragon.Fc mutante y una proteína de fusión DLN.Fc mutante, en el que la proteína de fusión mutante no es escindible proteolíticamente.

En los métodos para inhibir la expresión o actividad de la hepcidina en un sujeto o un sistema biológico, el compuesto administrado al sujeto o que se pone en contacto con el sistema biológico es preferiblemente un agonista de TGF- β , un antagonista de BMP o combinaciones de éstos. En los métodos para aumentar la expresión o actividad de la hepcidina en un sujeto o un sistema biológico, el compuesto administrado al sujeto o que se pone en contacto con el sistema biológico es preferiblemente un antagonista de TGF- β , un agonista de BMP o combinaciones de éstos.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para regular el metabolismo del hierro o un proceso metabólico del hierro en un sujeto o un sistema biológico, administrando al sujeto o poniendo en contacto el sistema biológico con una cantidad eficaz de un compuesto que modula la actividad de señalización de al menos un miembro de la superfamilia TGF- β . El proceso metabólico del hierro puede ser captación de hierro, absorción de hierro,

transporte de hierro, almacenamiento de hierro, procesamiento de hierro, movilización de hierro, utilización de hierro o combinaciones de éstos.

5 Cuando el sujeto o el sistema biológico presentan o tienen riesgo de presentar deficiencia de hierro, el compuesto usado en estos métodos es preferiblemente un agonista de TGF- β , un antagonista de BMP o combinaciones de éstos. Cuando el sujeto o el sistema biológico presentan o tienen riesgo de presentar sobrecarga de hierro, el compuesto es, preferiblemente, un antagonista de TGF- β , un agonista de BMP o combinaciones de éstos.

10 En otro aspecto más, la presente descripción proporciona métodos para tratar o prevenir las afecciones asociadas con perturbaciones en el metabolismo del hierro en un sujeto. Los métodos comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto que modula la actividad de señalización de al menos un miembro de la superfamilia TGF- β . En determinadas realizaciones, el miembro de la superfamilia TGF- β es TGF- β o BMP. En algunas realizaciones, la administración del compuesto al sujeto resulta en la regulación de la expresión o actividad de la hepcidina en el sujeto.

15 Los compuestos administrados en los métodos pueden comprender un agente seleccionado del grupo que consiste en un agonista de TGF- β , un antagonista de TGF- β , un agonista de BMP, un antagonista de BMP o combinaciones de éstos. En determinadas realizaciones, el agente se selecciona del grupo que consiste en una proteína de fusión HJV.Fc, una proteína de fusión Dragon.Fc, una proteína de fusión DLN.Fc, una proteína de fusión sT β R11.Fc, una proteína de fusión sT β R11-B.Fc y una proteína de fusión sT β R11 Δ .Fc. En algunas realizaciones, el agente comprende una proteína de fusión seleccionada del grupo que consiste en una proteína de fusión HJV.Fc mutante, una proteína de fusión Dragon.Fc mutante y una proteína de fusión DLN.Fc mutante, en el que la proteína de fusión mutante no es escindible proteolíticamente.

20 Cuando el sujeto tiene o tiene riesgo de tener una afección asociada con deficiencia de hierro, el compuesto usado en estos métodos es, preferiblemente, un antagonista de BMP, un agonista de TGF- β , o combinaciones de éstos. Las afecciones asociadas con deficiencia de hierro que pueden tratarse y/o prevenirse por los métodos de la presente invención incluyen, pero no están limitadas a, anemia de enfermedad crónica, anemia de deficiencia de hierro, deficiencia de hierro funcional y anemia microcítica. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden además administrar un tratamiento de suplemento de hierro al sujeto.

25 Cuando el sujeto tiene o tiene riesgo de tener una afección asociada con sobrecarga de hierro, el compuesto usado en los métodos de tratamiento es, preferiblemente, un agonista de BMP, un antagonista de TGF- β o combinaciones de éstos. Las afecciones asociadas con sobrecarga de hierro que pueden tratarse y/o prevenirse por los métodos de la presente invención incluyen, pero no están limitadas a, hemocromatosis del adulto y hemocromatosis juvenil. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden además administrar un tratamiento de quelación de hierro al sujeto. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además realizar flebotomía al sujeto.

30 En otro aspecto más, la presente descripción proporciona métodos para identificar compuestos que regulan la expresión o actividad de la hepcidina en un sistema biológico, y métodos para identificar compuestos que regulan el metabolismo del hierro o un proceso metabólico del hierro en un sistema biológico. En estos métodos, el sistema biológico expresa preferiblemente al menos un miembro de la superfamilia TGF- β .

35 Estos métodos comprenden incubar el sistema biológico con un compuesto candidato en condiciones y durante un tiempo suficiente para que el compuesto candidato module la actividad de señalización del miembro de la superfamilia TGF- β , obteniendo de esta manera un sistema de ensayo; medir, en el sistema de ensayo, al menos un factor que sea representativo de la actividad de señalización del miembro de la superfamilia TGF- β ; incubar el sistema en las mismas condiciones y durante el mismo tiempo sin el compuesto candidato, obteniendo de esta manera un sistema control; medir el factor en el sistema control; comparar el factor medido en los sistemas de ensayo y control; y determinar que el compuesto candidato regula la expresión de hepcidina o el metabolismo del hierro en el sistema, si el factor medido en el sistema de ensayo es menor que o mayor que el factor medido en el sistema control.

40 En determinadas realizaciones, el miembro de la superfamilia TGF- β es TGF- β o BMP, y el compuesto identificado como regulador se selecciona del grupo que consiste en un agonista de TGF- β , un antagonista de TGF- β , un agonista de BMP y un antagonista de BMP. En algunas realizaciones, el agente comprende una proteína de fusión seleccionada del grupo que consiste en una proteína de fusión HJV.Fc mutante, una proteína de fusión Dragon.Fc mutante y una proteína de fusión DLN.Fc mutante, en el que la proteína de fusión mutante no es escindible proteolíticamente.

45 La presente descripción también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable, y una cantidad eficaz de al menos un regulador del metabolismo del hierro o al menos un regulador de la expresión o actividad de la hepcidina identificado por los métodos de cribado inventivos. También se proporcionan métodos para usar estos reguladores identificados en el tratamiento o prevención de afecciones asociadas con perturbaciones en el metabolismo del hierro.

Descripción Breve del Dibujo

La **Figura 1** es un gráfico que muestra los efectos de BMP-2, Noggin.Fc (que se sabe que inhibe la señalización endógena de BMP) y Fe-NTA (hierro no unido a transferrina) en la proporción hepcidina/actina en células HepG2 comparado con la proporción hepcidina/actina en las células control, C (es decir, células HepG2 incubadas en ausencia de estos agentes).

La **Figura 2** es un gráfico que muestra los efectos de BMP-2, Noggin.Fc y TGF- β 1 en la proporción hepcidina/actina en células HepG2 comparado con la proporción hepcidina/actina en las células control, C (es decir, células HepG2 incubadas en ausencia de estos agentes).

La **Figura 3** muestra un conjunto de análisis de transferencia Western de la proteína HJV en el hígado (**A**) y células CHO transfectadas (**B**) y de la proteína de fusión soluble HJV.Fc (**C**).

La **Figura 4** es un conjunto de tres gráficos que muestra las medidas de actividad luciferasa en células HepG2 transfectadas con un informador de luciferasa que responde a BMP (**A**, **C**) o un informador de luciferasa que responde a TGF- β (**B**) incubadas con o sin BMP-2, BMP-4 o TGF- β 1.

La **Figura 5** es un gráfico que muestra las medidas de actividad luciferasa en células HepG2 transfectadas con ADNc de informador de luciferasa que responde a BMP y HJV o vector vacío e incubadas con o sin BMP-2 exógeno en presencia o ausencia de Noggin.

La **Figura 6(A)** es un gráfico que muestra los resultados de las medidas de radiactividad de HJV.Fc incubada con BMP-2 marcado con ^{125}I . La **Figura 6(B)** es un gel que muestra que ^{125}I -BMP-2 puede entrecruzarse químicamente con HJV.Fc en presencia de DSS (barra 4) y que este entrecruzamiento puede inhibirse por un exceso de BMP-2 frío (barra 5).

La **Figura 7** es un gráfico que indica las medidas de radiactividad de HJV.Fc incubada con BMP-2 marcado con ^{125}I con o sin exceso de BMP-2, -4, -7 o TGF- β 1 frío.

La **Figura 8** es un conjunto de dos gráficos que muestra las medidas de actividad luciferasa en células HepG2 co-transfectadas con informador de luciferasa que responde a BMP y HJV bien solo o en combinación con el receptor de BMP de tipo I dominante negativo ALK3 (ALK3 DN) o ALK 6 (ALK6 DN) (**Fig. 8(A)**) o con el tipo salvaje (WT) frente a R-Smad 1 dominante negativo (DN) (**Fig. 8(B)**).

La **Figura 9** muestra dos análisis de transferencia Western de ADNc HJVG313V mutante (**Fig. 9(A)**) y HJVG313V.Fc soluble (**Fig. 9(B)**) preparados usando técnicas de PCR y subclonación y transfectados en células CHO.

La **Figura 10** muestra imágenes de microscopía de inmunofluorescencia de células no permeabilizadas transfectadas con HJV de tipo salvaje y HJVG313V mutante.

La **Figura 11** es un gráfico que indica las medidas de actividad luciferasa en células HepG2 transfectadas con informador de luciferasa que responde a BMP solo o en combinación con concentraciones crecientes de ADNc de HJV de tipo salvaje o HJVG313V mutante.

La **Figura 12** es una tabla que indica las medidas de hierro sérico y de la capacidad total de unión de hierro en ratones después de tratamiento intraorbital con ligando BMP-2.

La **Figura 13** es un gel que muestra que la proteína de fusión RMGa-D169A.Fc de ratón no se escinde proteolíticamente comparada con la proteína de fusión RMGa.Fc de ratón.

La **Figura 14** es un gel que muestra que la proteína de fusión Dragon-D171A.Fc de ratón no se escinde proteolíticamente comparada con la proteína de fusión Dragon.Fc de ratón.

La **Figura 15** es un gel que muestra que HJV-D172A humana no se escinde proteolíticamente comparada con HJV humana.

Definiciones

A lo largo de la especificación, se emplean varios términos que se definen en los párrafos siguientes.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "**un miembro de la superfamilia TGF- β** " se refiere a cualquier miembro de la superfamilia TGF- β , que incluye, entre otros, activinas, inhibinas, Factores de Crecimiento Transformantes beta (TGF- β), Factores de Crecimiento y Diferenciación (GDF), Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMP) y Sustancia Inhibidora Mülleriana (MIS). En el contexto de la presente descripción, determinados miembros preferidos de la superfamilia TGF- β incluyen los TGF- β y las BMP.

El término "**perturbaciones**" cuando se aplica al metabolismo del hierro o a un proceso metabólico del hierro, se refiere a cualquier alteración, desregulación y/o desviación del estado, función y/o nivel de actividad normales. Los

procesos metabólicos del hierro incluyen captación de hierro, absorción de hierro, transporte de hierro, almacenamiento de hierro, procesamiento de hierro, movilización de hierro y utilización de hierro. Generalmente, las perturbaciones en el metabolismo del hierro resultan en sobrecarga de hierro o deficiencia de hierro. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "**sobrecarga de hierro**" se refiere a una cantidad de hierro presente en el tejido de un sujeto o en un sistema biológico que es significativamente superior al nivel normal en ese tejido particular o ese sistema biológico particular. El término "**deficiencia de hierro**" se refiere a una cantidad de hierro presente en el tejido de un sujeto o en un sistema biológico que es significativamente inferior al nivel normal en ese tejido particular o ese sistema biológico particular. Una cantidad de hierro significativamente inferior o significativamente superior al nivel normal corresponde a cualquier cantidad de hierro que es fisiológicamente indeseable y/o que es o puede volverse dañina para el sujeto o el sistema biológico. Los métodos para la determinación de los niveles de hierro son conocidos en la técnica (véase más adelante).

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "**afección asociada con perturbaciones del metabolismo del hierro o un proceso metabólico del hierro**" se refiere a cualquier enfermedad, trastorno, síndrome o afección que se caracteriza por una sobrecarga de hierro o una deficiencia de hierro.

El término "**prevención**" se usa en la presente memoria para caracterizar un método que tiene como objetivo retrasar o prevenir el inicio de una afección patofisiológica asociada con perturbaciones en el metabolismo del hierro (por ejemplo en un sujeto que puede estar predispuesto a la afección pero que todavía no se ha diagnosticado que la tiene).

El término "**tratamiento**" se usa en la presente memoria para caracterizar un método que tiene como objetivo (1) retrasar o prevenir el inicio de una afección asociada con perturbaciones en el metabolismo del hierro; o (2) ralentizar o parar la progresión, agravamiento o deterioro de los síntomas de la afección; o (3) proporcionar mejoras de los síntomas de la afección; o (4) curar la afección. Un tratamiento puede administrarse antes del inicio de la enfermedad, para una acción profiláctica o preventiva. También puede administrarse después del inicio de la enfermedad, para una acción terapéutica.

Los términos "**compuesto**" y "**agente**" se usan en la presente memoria indistintamente. Se refieren a cualquier molécula natural o no natural (es decir, sintética o recombinante), tal como una macromolécula biológica (por ejemplo, ácido nucleico, polipéptido o proteína), molécula orgánica o inorgánica o un extracto preparado a partir de materiales biológicos tales como células o tejidos bacterianos, de plantas, de hongos o de animales (particularmente mamíferos, incluyendo el ser humano). El compuesto puede ser una única molécula, una mezcla de dos o más moléculas o un complejo de al menos dos moléculas.

El término "**compuesto candidato**" se refiere a un compuesto o agente (como se ha definido anteriormente) que se va a ensayar para una actividad de interés. En determinados métodos de cribado, los compuestos candidatos se evalúan para su capacidad de regular la expresión de la hepcidina y/o para regular el metabolismo del hierro mediante la modulación de la actividad de señalización de un miembro de la superfamilia TGF- β .

El término "**regulación**" cuando se aplica a un fenómeno biológico (tal como metabolismo del hierro y expresión o actividad de la hepcidina) se refiere a un proceso que permite el control del fenómeno biológico. El término "regulación" también se refiere a la capacidad de un compuesto para controlar el fenómeno biológico. Por ejemplo, un proceso o un compuesto que regula el metabolismo del hierro tiene la capacidad de disminuir los niveles de hierro en un sujeto o sistema biológico que presenta sobrecarga de hierro; y/o la capacidad de incrementar los niveles de hierro en un sujeto o sistema biológico que presenta deficiencia de hierro. En el contexto de la presente invención y descripción, el mecanismo por el cual tiene lugar la regulación del fenómeno biológico es preferiblemente mediante la modulación de la actividad de señalización de un miembro de la superfamilia TGF- β . En los métodos de cribado, cuando se encuentra que un compuesto candidato regula la expresión o actividad de la hepcidina, se identifica como un "**regulador**" de la expresión o actividad de la hepcidina.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "**modulación de la actividad de señalización de un miembro de la superfamilia TGF- β** " se refiere a la capacidad de un compuesto para incrementar o prolongar, o para disminuir o reducir, la duración del efecto de un miembro de la superfamilia TGF- β . En los métodos de cribado, cuando se encuentra que un compuesto candidato induce dicho aumento o inhibición, se identifica como un "**modulador**" de la actividad de señalización del miembro de la superfamilia TGF- β .

El término "**agonista**" pretende usarse como es admitido en la técnica. En general, el término se refiere a un compuesto que incrementa o prolonga la duración del efecto de un polipéptido o un ácido nucleico. Un agonista puede ser un agonista directo, en cuyo caso es una molécula que ejerce su efecto interaccionando con (por ejemplo uniéndose a) el polipéptido o ácido nucleico, o un agonista indirecto, en cuyo caso ejerce su efecto mediante un mecanismo distinto de la interacción con el polipéptido o ácido nucleico (por ejemplo, alterando la expresión o estabilidad del polipéptido o ácido nucleico, alterando la expresión o actividad de una diana del polipéptido o ácido nucleico, interaccionado con un intermedio en una ruta que implica al polipéptido o ácido nucleico, etc.).

El término "**antagonista**" pretende usarse como es admitido en la técnica. En general, el término se refiere a un compuesto que disminuye o reduce la duración del efecto de un polipéptido o un ácido nucleico. Un antagonista

puede ser un antagonista directo, en cuyo caso es una molécula que ejerce su efecto interaccionando con (por ejemplo uniéndose a) el polipéptido o ácido nucleico, o un antagonista indirecto, en cuyo caso ejerce su efecto mediante un mecanismo distinto de la interacción con el polipéptido o ácido nucleico (por ejemplo, alterando la expresión o estabilidad del polipéptido o ácido nucleico, alterando la expresión o actividad de una diana del polipéptido o ácido nucleico, interaccionado con un intermedio en una ruta que implica al polipéptido o ácido nucleico, etc.).

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "**cantidad eficaz**" se refiere a cualquier cantidad de un compuesto o agente que es suficiente para cumplir con su propósito o propósitos pretendidos. En el contexto de la presente invención y descripción, el o los propósitos pueden ser, por ejemplo: modular la actividad de señalización de un miembro de la superfamilia TGF- β ; y/o regular la expresión o actividad de la hepcidina; y/o regular el metabolismo del hierro o un proceso metabólico del hierro; y/o retrasar o prevenir el inicio de una afección asociada con perturbaciones en el metabolismo del hierro; y/o ralentizar o parar la progresión, agravamiento o deterioro de los síntomas de la afección; y/o proporcionar mejoras de los síntomas de la afección; y/o curar la afección.

El término "**sujeto**" se refiere a un ser humano u otro mamífero, que puede padecer una afección patofisiológica asociada con perturbaciones en el metabolismo del hierro pero puede tener o no dicha afección.

Los términos "**sistema**" y "**sistema biológico**" se usan en la presente memoria indistintamente. Un sistema puede ser cualquier entidad biológica que puede presentar sobrecarga de hierro o deficiencia de hierro. El sistema biológico es preferiblemente uno que expresa al menos un miembro de la superfamilia TGF- β . Algunos sistemas preferidos expresan TGF- β y/o BMP. El sistema biológico también puede expresar preferiblemente hepcidina o comprender hepcidina. En el contexto de esta invención y descripción, se consideran los sistemas *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*; y el sistema puede ser una célula, un fluido biológico, un tejido biológico o un animal. Un sistema puede originarse, por ejemplo, de un sujeto vivo (por ejemplo, puede obtenerse extrayendo sangre o por biopsia) o de un sujeto muerto (por ejemplo puede obtenerse en la autopsia).

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "**fluido biológico**" se refiere a un fluido producido por y obtenido de un sujeto. Los ejemplos de fluidos biológicos incluyen, pero no están limitados a, orina, suero sanguíneo y plasma. Los fluidos biológicos incluyen fluidos completos o cualquier fracción de dichos fluidos obtenida por purificación, por ejemplo por ultra-filtración o cromatografía. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "**tejido biológico**" se refiere a un tejido obtenido de un sujeto. El tejido biológico puede ser un órgano completo o parte de cualquier órgano o sistema en el cuerpo (por ejemplo, hígado, tracto gastrointestinal, riñón, páncreas y semejantes).

Una "**composición farmacéutica**" se define en la presente memoria como que comprende al menos un compuesto de la invención o descripción (es decir, un compuesto candidato identificado por un método de cribado como un regulador del metabolismo del hierro y/o un regulador de la expresión o actividad de la hepcidina) y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "**vehículo farmacéuticamente aceptable**" se refiere a un medio vehicular que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes activos y que no es excesivamente tóxico para los huéspedes a las concentraciones a las que se administra. El término incluye disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes que retrasan la absorción y semejantes. El uso de dichos medios y agentes para la formulación de sustancias farmacéuticamente activas es muy conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, E.W. Martin, 18ª Ed., 1990, Mack Publishing Co., Easton, PA).

Descripción Detallada de Determinadas Realizaciones Preferidas

Como se ha mencionado anteriormente, la presente descripción proporciona sistemas y estrategias mejoradas para regular el metabolismo del hierro en mamíferos. En particular, los compuestos y métodos presentan menos probabilidad que las terapias existentes de inducir efectos secundarios indeseables.

I. Agonistas y Antagonistas de los Miembros de la Superfamilia TGF- β como Reguladores del Metabolismo del Hierro

La presente descripción engloba el descubrimiento de que determinados miembros de la superfamilia TGF- β pueden regular la expresión de hepcidina, un regulador clave en el metabolismo del hierro en los mamíferos. Como se describe en el Ejemplo 1, los presentes Solicitantes han admitido que la señalización de BMP (proteína morfogenética ósea) induce la expresión de la hepcidina en células de hepatoma de hígado HepG2, mientras que la señalización de TGF- β (Factor de Crecimiento Transformante-beta) inhibe la expresión de la hepcidina. Además, usando Noggin, un antagonista muy conocido de BMP, los Solicitantes han mostrado que la inhibición de la señalización de BMP resultaba en la reducción de la expresión de la hepcidina.

De acuerdo con esto, la presente descripción proporciona métodos para usar agonistas y/o antagonistas de miembros de la superfamilia TGF- β para regular la expresión o actividad de la hepcidina, lo que a su vez, regula el metabolismo del hierro.

A- Hecpidina

5 La hepcidina es un péptido catiónico pequeño, rico en cisteínas con propiedades antimicrobianas que se ha purificado muy recientemente a partir de ultra-filtrado de orina y de plasma humano (C.H. Park *et al.*, J. Biol. Chem., 2001, 276: 7806-7810; A. Krause *et al.*, FEBS Lett., 2000, 480: 147-150). Este péptido de 20, 22 ó 25 aminoácidos, que se diferencia por truncamiento terminal de aminoácidos, forma una horquilla corta con dos brazos unidos por
10 cuatro puentes disulfuro de una manera semejante a una escalera. La hepcidina contiene ocho residuos de cisteína que están conservados entre las especies (G. Nicolas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98: 878-885; C. Pigeon *et al.*, J. Biol. Chem., 2001, 276: 7811-7819). Aunque el péptido se aisló en primer lugar de orina y sangre, la hepcidina se expresa principalmente en el hígado tanto en ratones como en los seres humanos. La expresión también es detectable en el corazón y el cerebro, pero en mucha menor medida (C.H. Park *et al.*, 2001; C. Pigeon *et al.*, 2001). Recientemente, se ha encontrado que la hepcidina también se expresa en el riñón (H. Kulaksiz *et al.*, J. Endocrinol., 2005, 184: 361-370).

En los seres humanos sólo existe una copia del gen, mientras que se han indicado dos genes de hepcidina (Hepc 1 y Hpec 2) en ratones (G. Nicolas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98: 878-885; C. Pigeon *et al.*, J. Biol. Chem., 2001, 276: 7811-7819). Tanto los genes de hepcidina humanos como de ratón consisten en tres exones y dos intrones, codificando el tercer exón el péptido maduro encontrado en orina. En los seres humanos y las ratas,
20 los exones codifican un precursor de 84 (83 en ratones) aminoácidos, incluyendo un péptido señal potencial de 24 aminoácidos.

La conexión entre la hepcidina y el metabolismo del hierro la hicieron en primer lugar Pigeon *et al.* (J. Biol. Chem., 2001, 276: 7811-7819) cuando investigaban las respuestas hepáticas a la sobrecarga de hierro. Otros estudios han mostrado que los ratones que carecen de ARNm de hepcidina desarrollaban sobrecarga de hierro que afectaba al
25 hígado y al páncreas, con déficit en el bazo rico en macrófagos (G. Nicolas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98: 8780-8785). Se observó que los ratones transgénicos que sobreexpresan hepcidina morían al nacer de deficiencia grave de hierro (G. Nicolas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99: 4596-4601). Estos estudios sugirieron que la hepcidina inhibe la absorción de hierro en el intestino delgado, la liberación de hierro reciclado de los macrófagos (R.E. Fleming y W.S. Sly, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98: 8160-8162) y el transporte de hierro
30 a través de la placenta (G. Nicolas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99: 4596-4601). De acuerdo con los estudios en animales, los pacientes con adenomas hepáticos grandes y anemia refractaria a hierro inexplicada presentan ARNm de hepcidina sobreexpresado en el hígado (D.A. Weinstein *et al.*, Blood, 2002, 100: 3776-3781). Estudios recientes han encontrado una expresión anormal de hepcidina y regulación interrumpida de hepcidina (K.R. Bridle *et al.*, Lancet, 2003, 361: 669-673; H. Kulaksiz *et al.*, Gut, 2004, 53: 735-743) en hemocromatosis asociada
35 con el gen de hemocromatosis (HFE) y asociación de mutaciones de hepcidina con hemocromatosis juvenil grave (A. Roetto *et al.*, Nature Genetics, 2003, 33: 21-22). Tomando como base éstas y otras observaciones, se ha sugerido que la hepcidina es un componente clave de la homeostasis del hierro que actúa como un regulador negativo del metabolismo del hierro.

B- Miembros de la Superfamilia TGF- β

40 La superfamilia TGF- β de ligandos comprende actualmente más de 30 miembros, incluyendo, entre otros, activinas, inhibinas, Factores de Crecimiento Transformantes-beta (TGF- β), Factores de Crecimiento y Diferenciación (GDF), Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMP) y Sustancia Inhibidora Mülleriana (MIS). Todas estas moléculas son factores de crecimiento peptídicos que están relacionados estructuralmente con TGF- β . Todas comparten un resto común denominado un nudo de cisteína, que está constituido por siete residuos de cisteína espacialmente conservados
45 organizados en una estructura rígida (J. Massague, Annu. Rev. Biochem., 1998, 67: 753-791). A diferencia de las hormonas clásicas, los miembros de la superfamilia TGF- β son proteínas multifuncionales cuyos efectos dependen del tipo y estadio de las células diana tanto como de los factores de crecimiento en sí mismos.

Los miembros de la superfamilia TGF- β adecuados para usarse en la práctica de los métodos de la presente descripción incluyen cualquier miembro de la superfamilia TGF- β cuya actividad de señalización pueda regular la
50 expresión o actividad de la hepcidina. Los miembros de la superfamilia TGF- β preferidos incluyen, pero no están limitados a, los TGF- β y las BMP.

Factores de Crecimiento Transformantes beta (TGF- β)

En determinadas realizaciones de la descripción, el miembro de la superfamilia TGF- β es TGF- β . Los TGF- β son polipéptidos extracelulares que están implicados en un amplio rango de procesos biológicos (J. Massague, Annu. Rev. Cell. Biol., 1990, 6: 597-641) y juegan un papel central en eventos clave durante la embriogénesis, reparación
55 de tejidos en el adulto e inmunosupresión (M.B. Sporn y A.B. Roberts, J. Cell. Biol. 1992, 119: 1017-1021; S.W. Wahl, J. Clin. Immunol. 1992, 12: 61-74; D.M. Kingsley, Genes Dev. 1994, 8: 133-146). En los mamíferos, el TGF- β es producido por casi todas las células del organismo y casi todas las células pueden servir como dianas para sus

efectos. TGF- β es un regulador potente de la proliferación celular, diferenciación celular, apoptosis y producción de la matriz extracelular.

Las células de mamíferos pueden producir tres isoformas diferentes de TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. Estas isoformas presentan la misma estructura básica (son homodímeros de 112 aminoácidos que están estabilizados por puentes disulfuro intra e inter cadena) y sus secuencias de aminoácidos presentan un alto grado de homología (>70%). Sin embargo, cada isoforma está codificada por un gen distinto, y cada una se expresa de manera específica de tejido y regulada por el desarrollo (J. Massague, Annu. Rev. Biochem. 1998, 67: 753-791). De acuerdo con los conceptos modernos, TGF- β ejerce sus efectos uniéndose en primer lugar a receptores de membrana en la célula diana, iniciando de esta manera eventos de señalización aguas abajo. Los estudios de entrecruzamiento han mostrado que TGF- β se une principalmente a tres proteínas de alta afinidad de la superficie celular, denominadas receptores de TGF- β de tipo I, tipo II y tipo III (J. Massague y B. Like, J. Biol. Chem. 1985, 260: 2636-2645; S. Cheifetz *et al.*, J. Biol. Chem. 1986, 261: 9972-9978).

La regulación del metabolismo del hierro según los métodos de la presente descripción puede conseguirse por la inhibición o aumento de la actividad de señalización de una cualquiera de las isoformas de TGF- β (es decir, TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3) siempre que esta inhibición o aumento resulte en la regulación de la expresión o actividad de la hepcidina.

Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMP)

En otras realizaciones de la presente descripción, el miembro de la superfamilia TGF- β es BMP. Las BMP se identificaron originalmente como proteínas que inducen la formación ósea en sitios ectópicos (es decir, no esqueléticos) (A.H. Reddi, Curr. Opin. Genet. Dev., 1994, 4: 737-744). Sin embargo, ahora está claro que además de sus papeles en la morfogénesis ósea y del cartílago, las BMP también están implicadas en el desarrollo prenatal y en el crecimiento postnatal y/o reparación del ojo, corazón, sangre, pulmón, riñón, músculo, piel y otros tejidos (K.A. Waite y C. Eng, Nat. Rev. Genet., 2003, 4: 763-773). Los estudios han mostrado que las BMP juegan un papel importante en la regulación de la proliferación, apoptosis, diferenciación y quimiotaxis de varios tipos celulares, incluyendo células mesenquimáticas, células epiteliales, células hematopoyéticas y células neuronales. (J. Massague y Y.G. Chen, Genes Dev., 2000, 14: 627-644; K. Miyazono *et al.*, J. Cell Physiol., 2001, 187: 265-276; N. Morrell *et al.*, Circulation, 2001, 104: 790-795; A. von Budnoff y K.W.Y. Cho, Dev. Biol., 2001, 239: 1-14).

De una manera similar a otros miembros de la superfamilia TGF- β , las BMP median sus efectos formando un complejo de dos tipos diferentes de receptores transmembrana serina/treonina quinasa: tipo I y tipo II (C.H. Heldin *et al.*, Nature, 1997, 390: 465-471; J. Newman *et al.*, N. Engl. J. Med., 2001, 345: 319-324; B.L. Rosenzweig *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92: 7632-7636). Se han identificado tres receptores diferentes de BMP de tipo I (quinasa semejante al receptor de activina ALK2, ALK3 y ALK6) y tres receptores de BMP de tipo II (receptor de BMP de tipo II (BMPRII); Receptor de activina de tipo IIA (ActRIIA); y Receptor de activina de tipo IIB (ActRIIB)) (L. Attisano y J.L. Wrana, Science, 2002, 296: 1646-1647). La unión de BMP induce la fosforilación del receptor de tipo I por el receptor de tipo II, lo que da lugar a la fosforilación de Smads citoplásmicos activados por receptor (C.H. Heldin *et al.*, Nature, 1997, 390: 465-471).

Hasta la fecha, se han identificado y caracterizado casi 20 isoformas de BMP en mamíferos y se están descubriendo nuevas (M. Kawabata *et al.*, Cytokine Growth Factor Rev., 1998, 9: 49-61). Los miembros de la familia BMP se han clasificado en subgrupos según el grado de relación estructural entre ellos (T. Sakou, Bone, 1998, 22: 591-603; R.G. Schaub y J. Wozney, Curr. Opin. Biotechnol., 1991, 2: 868-871; J.M. Schmitt *et al.*, J. Orthop. Res., 1999, 17: 269-278). *In vivo*, las isoformas de BMP tienen diferentes perfiles de expresión, diferentes afinidades para receptores y por lo tanto actividades biológicas únicas.

La regulación del metabolismo del hierro según los métodos de la presente descripción puede conseguirse por la inhibición o aumento de la actividad de señalización de una cualquiera de las isoformas de BMP siempre que esta inhibición o aumento resulte en la regulación de la expresión o actividad de la hepcidina.

C- Agonistas y Antagonistas de los Miembros de la Superfamilia TGF- β

Los agonistas y antagonistas de un miembro de la superfamilia TGF- β adecuados para usarse en los métodos de la presente descripción incluyen cualquier compuesto o agente que tiene la capacidad de modular (es decir, aumentar o inhibir) la actividad de señalización del miembro de la superfamilia TGF- β de manera que esta modulación resulta en la regulación de la expresión o actividad de la hepcidina.

Los agonistas y antagonistas adecuados incluyen agonistas y antagonistas naturales del miembro de la superfamilia TGF- β (incluyendo fragmentos y variantes de éstos que retienen las características biológicas de los ligandos agonistas y antagonistas naturales). Los agonistas y antagonistas adecuados también incluyen compuestos sintéticos o humanos recombinantes. Las clases de moléculas que pueden funcionar como agonistas incluyen, pero no están limitadas a, moléculas pequeñas, anticuerpos (incluyendo fragmentos o variantes de éstos, tales como fragmentos Fab, fragmentos Fab'2 y scFv) y peptidomiméticos. Las clases de moléculas que pueden funcionar como antagonistas incluyen, pero no están limitadas a, moléculas pequeñas, anticuerpos (incluyendo fragmentos o

variantes de éstos), proteínas de fusión, polinucleótidos antisentido, ribozimas, ARN de interferencia pequeños (sARNi) y peptidomiméticos.

Como apreciarán los expertos en la técnica, cualquier compuesto o agente que se identifica, por ejemplo, por los ensayos de cribado (descritos más adelante), como un modulador de un miembro de la superfamilia TGF- β es adecuado para usarse en la práctica de los métodos de la presente descripción. En particular, los moduladores que son moléculas pequeñas que presentan alta especificidad pueden ser valiosos en estos métodos.

Agonistas y Antagonistas de BMP

En la técnica se conocen varios antagonistas de BMP (véase, por ejemplo, G.J. Thomsen *et al.*, Trends Genet., 1997, 13: 209-211; E. Canalis *et al.*, Endocr. Rev. 2003, 24: 218-235; V.A. Botchkarev, J. Invest. Dermatol., 2003, 120: 36-47; Pat. U.S. No. 6.432.410). En particular, los efectos de las BMP pueden modularse por un grupo de polipéptidos secretados que evitan la señalización de las BMP uniéndose a las BMP, evitando de esta manera su unión a receptores específicos de la superficie celular. Los antagonistas de las BMP adecuados para usarse en la práctica de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, Noggin, cordina, ventroptina, folistatina, y gen relacionado con la folistatina (FLRG). Otros antagonistas de BMP adecuados incluyen cerberus, gremlin, caronte, DAN, Dante y esclerostina y otras proteínas estructuralmente relacionadas, que se denominan colectivamente la familia DAN (D. Hsu *et al.*, Mol. Cell, 1998, 1: 673-683). Las proteínas de la familia DAN tienen un resto de nudo de cisteína conservado, que también se encuentra en otros factores de crecimiento, incluyendo los factores semejantes a TGF- β (J.J. Pearce *et al.*, Dev. Biol., 1999, 209: 98-110; C.R. Rodriguez Esteban *et al.*, Nature, 1999, 401: 243-251). Sin embargo, otros antagonistas de BMP carecen de similitud de secuencia entre sí. *In vivo*, estos antagonistas de BMP tienen perfiles de expresión diferentes, afinidades diferentes para varias isoformas de BMP y regulan diferentes respuestas biológicas.

La presente memoria también proporciona otros antagonistas de BMP. Como se indica en el Ejemplo 2, la hemojuvelina (HJV) es un miembro de la familia de proteínas de la molécula de direccionamiento repulsivo (RGM). Se sabe que los individuos con mutaciones en HJV presentan niveles deprimidos de hepcidina. Los presentes Solicitantes han mostrado que HJV aumenta la señalización de BMP pero no de TGF- β . Los resultados que obtuvieron demuestran que HJV se une directamente a BMP-2; y que el efecto potenciador de HJV en la señalización de BMP se reduce por la administración de Noggin, lo que indica que la acción de HJV es dependiente de ligando. De acuerdo con esto, en la presente memoria se proporciona una familia de proteínas de fusión HJV.Fc solubles como antagonistas de BMP adecuados para usarse en la práctica de la presente invención.

Los presentes Solicitantes han indicado recientemente (T.A. Samad *et al.*, "DRAGON: a bone morphogenetic protein co-receptor", J. Biol. Chem., 2005, 280: 14122-14129) que DRAGON, un miembro de la familia RGM de 436 aminoácidos anclado por un glicosilfosfatidilinositol (GPI), que se expresa de manera temprana en el desarrollo del sistema nervioso, aumenta la señalización de BMP pero no de TGF- β y actúa como un co-receptor de BMP. De acuerdo con esto, la presente descripción proporciona una familia de proteínas de fusión DRAGON.Fc solubles como antagonistas de BMP adecuados para usarse en los métodos inventivos. Un ejemplo de una proteína de fusión DRAGON.Fc que puede usarse en la práctica de la presente descripción se ha descrito por los presentes Solicitantes (T.A. Samad *et al.*, "DRAGON: A member of the repulsive guidance molecule-related family of neuronal and muscle-expressed membrane proteins is regulated by DRG11 and has neuronal adhesive properties", J. Neuroscience, 2004, 24: 2027-2036). Se ha encontrado que la proteína de fusión DRAGON.Fc soluble se une selectivamente a BMP-2 y BMP-4, pero no a BMP-7 ni a otros miembros de la superfamilia de ligandos TGF- β (T.A. Samad *et al.*, J. Biol. Chem., 2005, 280: 14122-14129).

En la presente memoria también se proporciona una familia de proteínas de fusión RGMa.Fc (o DLN.Fc) como antagonistas de BMP adecuados para usarse en la práctica de la presente descripción. Como DRAGON, RGMa es un miembro de la familia de genes de la molécula de direccionamiento repulsivo (RGM). RGMa y DRAGON se expresan de una manera complementaria en el sistema nervioso central, en el que RGMa media el direccionamiento axonal repulsivo y el cierre del tubo neural, mientras que DRAGON contribuye a la adhesión de células neuronales mediante interacciones homofílicas. Los presentes Solicitantes han mostrado que RGMa aumenta las señales de BMP pero no de TGF- β de una manera dependiente de ligando en cultivo celular y que el dominio extracelular soluble de RGMa fusionado con Fc humano (RGMa.Fc o DLN.Fc) forma un complejo con los receptores de BMP de tipo I y se une directamente y selectivamente a BMP-2 y BMP-4 marcadas radiactivamente (J.L. Babitt *et al.*, "Repulsive guidance molecule (RGMa), a DRAGON homologue, is a bone morphogenetic protein co-receptor", J. Biol. Chem., 2005, 280: 29820-29827).

La presente descripción también proporciona proteínas de fusión mutantes HJV, RGMa y DRAGON. En particular, se proporcionan proteínas de fusión mutantes HJV, RGMa y DRAGON que son más estables a la escisión proteolítica que las versiones de tipo salvaje correspondientes. Se sabe en la técnica que HJV, RGMa y DRAGON comparten un sitio de escisión proteolítica consenso. Para HJV humana, el sitio de escisión está situado después del residuo de ácido aspártico 172 (G. Papanikolaou *et al.*, Nature Genetics, 2004, 36: 77-82); para DRAGON humano, después del residuo de ácido aspártico 168 (T.A. Samad *et al.*, J. Neuroscience, 24: 2027-2036); y para RGMa humana, después del residuo de ácido aspártico 168 (Secuencia GenBank #NM 020211).

Las proteínas de fusión HJV, RGMA y DRAGON mutantes de la presente descripción contienen una mutación o más de una mutación que confiere estabilidad a la proteína de fusión, en particular estabilidad frente a la escisión proteolítica. Por ejemplo, el residuo de ácido aspártico situado cerca del sitio de escisión puede sustituirse por un residuo diferente o delecionarse. Alternativamente o adicionalmente, un residuo en la proximidad del sitio de escisión puede sustituirse por un residuo diferente o delecionarse. Los métodos que permiten mutaciones específicas o mutaciones en partes específicas de una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido aislado para proporcionar variantes se conocen en la técnica. Los presentes Solicitantes han demostrado la viabilidad de producir proteínas HJV, RGMA y DRAGON mutantes que no se escinden proteolíticamente, como se indica en el Ejemplo 4.

Agonistas y Antagonistas de los TGF- β

Se han identificado múltiples moduladores naturales que aumentan o inhiben la señalización de TGF- β . El acceso de los ligandos TGF- β a los receptores está inhibido por las proteínas solubles LAP, decorina y α 2-macroglobulina que se unen a y secuestran los ligandos (W. Balemans y W. Van Hul, *Dev. Biol.*, 2002, 250: 231-250). El acceso del ligando TGF- β a los receptores también está controlado por receptores unidos a la membrana. BAMBI actúa como un receptor señuelo, que compite con el receptor de tipo I (D. Onichtchouk *et al.*, *Nature*, 1999, 401: 480-485); betaglicano (receptor TGF- β de tipo II) aumenta la unión de TGF- β al receptor de tipo II (C.B. Brown *et al.*, *Science*, 1999, 283: 2080-2082; J. Massagué, *Annu. Rev. Biochem.*, 1998, 67: 753-791; E. del Re *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2004, 279: 22765-22772); y endoglin aumenta la unión de TGF- β a ALK1 en las células endoteliales (D.A. Marchuk, *Curr. Opin. Hematol.*, 1998, 5: 332-338; J. Massagué, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2000, 1: 169-178; Y. Shi y J. Massagué, *Cell*, 2003, 113: 685-700), Cripto, una proteína EGF-CFC anclada a membrana por GPI, actúa como un co-receptor, incrementando la unión de los ligandos TGF- β , nodal, Vgl y GDF1 a los receptores de activina (S.K. Cheng *et al.*, *Genes Dev.*, 2003, 17: 31-36; M.M. Shen y A.F. Schier, *Trends Genet.*, 2000, 16: 303-309) a la vez que bloquea la señalización de la activina.

Así, los agonistas y antagonistas de la señalización de TGF- β adecuados para usarse en la práctica de los métodos de la presente descripción incluyen antagonistas de TGF- β naturales (por ejemplo, decorina, véase, por ejemplo, Y. Yamaguchi *et al.*, *Nature*, 1990, 346: 281-284); formas solubles de agonistas de TGF- β naturales (por ejemplo, una forma soluble de endoglin, véanse, por ejemplo, las Pat. U.S. Nos. 5.719.120; 5.830.847; y 6.015.693); así como inhibidores de antagonistas de TGF- β naturales.

Otros antagonistas de TGF- β adecuados incluyen antagonistas que se han desarrollado para suprimir los efectos indeseables de los TGF- β para propósitos terapéuticos. Por ejemplo, se han descrito anticuerpos anti-TGF- β , cuyas constantes de disociación se ha indicado que están en el intervalo nanomolar (Pat. U.S. No. 5.571.714). Estos anticuerpos anti-TGF- β se han administrado con éxito a animales con diversas afecciones patológicas (W.A. Broder *et al.*, *Nature*, 1990, 346: 371-374; S.W. Wahl, *J. Clin. Immunol.*, 1992, 12: 61-74; M. Shah *et al.*, *Lancet*, 1992, 339: 213-214; M.S. Steiner y E.R. Barrack, *Mol. Endocrinol.*, 1992, 6: 15-25; F.N. Ziyadeh *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97: 8015-8020).

Se han desarrollado otros inhibidores de TGF- β basados en un estudio *in vitro*, que mostró que la transferencia mediada por adenovirus de un receptor de TGF- β de tipo II truncado suprime completamente y específicamente la señalización de diversos TGF- β (H. Yamamoto *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1996, 271: 16253-16259). Varios de estos receptores truncados poseen una actividad antagonista potente frente a sus ligandos actuando como mutantes dominantes-negativos (A. Bandyopadhyay *et al.*, *Cancer Res.*, 1999, 59: 5041-5046; Z. Qi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96: 2345-2349; T. Nakamura *et al.*, *Hepatology*, 2000, 32: 247-255).

Las formas solubles del receptor de TGF- β de tipo II (Sakamoto *et al.*, *Gene Ther.*, 2000, 7: 1915-1924; H. Ueno *et al.*, *Gene Ther.*, 2000, 11: 33-42; J. George *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96: 12719-12724) y del receptor de tipo III (solicitud PCT No. PCT/US2004/014175 de los presentes Solicitantes) también se han producido como proteínas de fusión y se han usado con éxito para prevenir o tratar afecciones patofisiológicas relacionadas con TGF- β en modelos animales.

II. Identificación de Reguladores del Metabolismo del Hierro

En otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para la identificación de compuestos que regulan el metabolismo del hierro modulando la actividad de señalización de un miembro de la superfamilia TGF- β . La presente descripción también proporciona métodos para la identificación de compuestos que regulan la expresión o actividad de la hepcidina modulando la actividad de señalización de un miembro de la superfamilia TGF- β .

Preferiblemente, estos métodos comprenden incubar un sistema biológico, que expresa al menos un miembro de la superfamilia TGF- β , con un compuesto candidato en condiciones y durante un tiempo suficiente para que el compuesto candidato module la actividad de señalización del miembro de la superfamilia TGF- β , obteniendo de esta manera un sistema de ensayo; incubar el sistema biológico en las mismas condiciones y durante el mismo tiempo sin el compuesto candidato, obteniendo de esta manera un sistema control; medir, en el sistema de ensayo, al menos un factor que sea representativo de la actividad de señalización del miembro de la superfamilia TGF- β ; medir el factor en el sistema control; comparar el factor medido en los sistemas de ensayo y control; y determinar que el

compuesto candidato regula la expresión de hepcidina (y/o regula el metabolismo del hierro), si el factor medido en el sistema de ensayo es menor que o mayor que el factor medido en el sistema control.

- 5 Los métodos de cribado proporcionados en la presente memoria darán lugar al descubrimiento y desarrollo de reguladores del metabolismo del hierro y reguladores de la expresión o actividad de la hepcidina que ejercen sus efectos modulando la actividad de señalización de uno o más miembros de la superfamilia TGF- β . Estos reguladores pueden ser potencialmente útiles en el tratamiento de afecciones asociadas con perturbaciones en el metabolismo del hierro.

A- Sistemas Biológicos

- 10 El ensayo y los métodos de cribado pueden realizarse usando cualquier tipo de sistemas biológicos, es decir, una célula, un fluido biológico, un tejido biológico o un animal. En determinadas realizaciones, el sistema es una entidad biológica que puede presentar deficiencia de hierro o sobrecarga de hierro (por ejemplo, un modelo animal, una muestra de sangre o todo o parte de un órgano, por ejemplo, el hígado); y/o una entidad biológica que expresa al menos un miembro de la familia TGF- β (por ejemplo, una célula); y/o una entidad biológica que expresa hepcidina (por ejemplo, un hepatocito) o comprende hepcidina (por ejemplo, una muestra de sangre o de orina).

- 15 En determinadas realizaciones, el ensayo y los métodos de cribado de la presente invención se realizan usando células que pueden crecerse en material plástico de cultivo celular estándar. Dichas células incluyen todas las células normales y transformadas obtenidas de cualquier fuente reconocida. Preferiblemente, las células son de origen mamífero (humana o animal, tal como de roedor o de simio). Más preferiblemente, las células son de origen humano. Las células de mamífero pueden ser de cualquier órgano o tejido (por ejemplo, cerebro, hígado, sangre o riñón) y de cualquier tipo celular. El tipo celular adecuado incluye, pero no está limitado a, células epiteliales, plaquetas, linfocitos, monocitos, miocitos, macrófagos, hepatocitos, cardiomiocitos, células endoteliales, células tumorales y semejantes.

- 25 Las células que se van a usar en la práctica de los ensayos y métodos de cribado de la presente invención pueden ser células primarias, célula secundarias o células inmortalizadas (por ejemplo, líneas celulares establecidas). Pueden prepararse por técnicas muy conocidas en la técnica (por ejemplo, las células pueden obtenerse extrayendo sangre de un paciente o un donante sano) o adquirirse de recursos comerciales inmunológicos o microbiológicos (por ejemplo, de la American Type Culture Collection, Manassas, VA). Alternativamente o adicionalmente, las células pueden modificarse por ingeniería genética para contener, por ejemplo, un gen de interés tal como un gen que expresa un factor de crecimiento o un receptor.

- 30 La selección de un tipo celular y/o línea celular particular para realizar un ensayo se regirá por varios factores tales como la naturaleza del miembro de la superfamilia TGF- β cuya actividad de señalización se quiere modular y el propósito pretendido del ensayo. Por ejemplo, un ensayo desarrollado para un cribado primario de fármacos (es decir, primer ciclo(s) de cribado) puede realizarse preferiblemente usando líneas celulares establecidas, que están disponibles comercialmente y habitualmente son relativamente fáciles de crecer, mientras que un ensayo que se va a usar más tarde en el proceso de desarrollo del fármaco puede realizarse preferiblemente usando células primarias o secundarias, que frecuentemente son más difíciles de obtener, mantener y/o crecer que las células inmortalizadas pero que representan mejor los modelos experimentales para las situaciones *in vivo*.

- 40 Los ejemplos de líneas celulares establecidas que pueden usarse en la práctica de los ensayos y métodos de cribado, incluyen células de hepatoma de hígado HepG2, células de hepatoma de hígado Hep3B, hepatocitos primarios y hepatocitos inmortalizados. Las células primarias y secundarias que pueden usarse en los métodos de cribado inventivos incluyen, pero no están limitadas a, células epiteliales, plaquetas, linfocitos, monocitos, miocitos, macrófagos, hepatocitos, cardiomiocitos, células endoteliales y células tumorales.

- 45 Las células que se van a usar en los ensayos pueden cultivarse según técnicas de cultivo celular estándar. Por ejemplo, las células se crecen frecuentemente en un recipiente adecuado en un entorno estéril a 37°C en un incubador que contiene una atmósfera humidificada 95% aire-5% CO₂. Los recipientes pueden contener cultivos agitados o estacionarios. Pueden usarse varios medios de cultivo celular incluyendo medios que contienen fluidos biológicos no definidos tales como suero de ternera fetal. Las técnicas de cultivo celular son muy conocidas en la técnica y los protocolos establecidos están disponibles para el cultivo de diversos tipos celulares (véase, por ejemplo, R.I. Freshney, "*Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*", 2a Edición, 1987, Alan R. Liss, Inc.).

- 50 En determinadas realizaciones, los métodos de cribado se realizan usando células contenidas en una pluralidad de pocillos de una placa de ensayo multi-pocillo. Dichas placas de ensayo están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Stratagene Corp. (La Jolla, CA) y Corning Inc. (Acton, MA) e incluyen, por ejemplo, placas de 48 pocillos, 96 pocillos, 384 pocillos y 1.536 pocillos.

B- Compuestos Candidatos

- 55 Como apreciarán los expertos en la técnica, puede ensayarse cualquier clase de compuestos o agentes usando los métodos. Un compuesto candidato puede ser un compuesto sintético o natural; puede ser una única molécula o una mezcla o complejo de diferentes moléculas. En determinadas realizaciones, los métodos se usan para ensayar uno

o más compuestos. En otras realizaciones, los métodos se usan para cribar colecciones o bibliotecas de compuestos. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "**colección**" se refiere a cualquier conjunto de compuestos, moléculas o agentes, mientras que el término "**biblioteca**" se refiere a cualquier conjunto de compuestos, moléculas o agentes que son análogos estructurales.

- 5 Las estrategias tradicionales para la identificación y caracterización de candidatos de fármacos nuevos y útiles incluyen generalmente la generación de colecciones y/o bibliotecas grandes de compuestos seguido del ensayo frente a dianas conocidas o desconocidas (véanse, por ejemplo, WO 94/24314; WO 95/12608; M.A Gallop *et al.*, J. Med. Chem., 1994, 37: 1233-1251; y E.M. Gordon *et al.*, J. Med. Chem., 1994, 37: 1385-1401). Pueden ensayarse tanto productos naturales como compuestos químicos por los métodos de la descripción. Las colecciones de
10 productos naturales se obtienen generalmente de microorganismos, animales, plantas u organismos marinos; incluyen poliquétidos, péptidos no ribosomales y/o variantes de éstos (para una revisión, véase, por ejemplo, D.E. Cane *et al.*, Science, 1998, 82: 63-68). Las bibliotecas químicas consisten frecuentemente en análogos estructurales de compuestos conocidos o compuestos que se identifican como prototipos o cabezas de serie mediante el cribado de productos naturales. Las bibliotecas químicas son relativamente fáciles de preparar por síntesis automatizada tradicional, PCR, clonación o métodos sintéticos patentados (véanse, por ejemplo, S.H. DeWitt *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1993, 90: 6909-6913; R.N. Zuckermann *et al.*, J. Med. Chem., 1994, 37: 2678-2685; Carell *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1994, 33: 2059-2060; P.L. Myers, Curr. Opin. Biotechnol., 1997, 8: 701-707).

- Las colecciones de compuestos naturales en la forma de extractos bacterianos, fúngicos, de plantas y animales están disponibles, por ejemplo, en Pan Laboratories (Bothell, WA) o MycoSearch (Durham, NC). Las bibliotecas de
20 compuestos candidatos que pueden cribarse usando los métodos de la presente descripción pueden prepararse o adquirirse de varias empresas. Las bibliotecas de compuestos sintéticos están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Comgenex (Princeton, NJ), Brandon Associates (Merrimack, NH), Microsource (New Milford, CT) y Aldrich (Milwaukee, WI). Las bibliotecas de compuestos candidatos también se han desarrollado por y están disponibles comercialmente en grandes empresas químicas, incluyendo, por ejemplo, Merck, Glaxo Wellcome,
25 Bristol-Meyers-Squibb, Novartis, Monsanto/Searle y Pharmacia UpJohn. Además, las colecciones naturales, bibliotecas producidas sintéticamente y compuestos se modifican fácilmente mediante medios convencionales químicos, físicos y bioquímicos.

- Los reguladores útiles del metabolismo del hierro y de la expresión de la hepcidina pueden encontrarse en numerosas clases de compuestos químicos, incluyendo heterociclos, péptidos, sacáridos, esteroides y semejantes.
30 En determinadas realizaciones, los métodos de cribado de la invención se usan para identificar compuestos o agentes que son moléculas pequeñas (es decir, compuestos o agentes con un peso molecular <600-700).

- El cribado de bibliotecas según los métodos proporcionará "prototipos" o "cabezas de serie", es decir, compuestos que poseen una actividad biológica deseada pero no optimizada. La siguiente etapa en el desarrollo de candidatos a fármacos útiles es habitualmente el análisis de la relación entre la estructura química de un compuesto prototipo y su
35 actividad biológica o farmacológica. La estructura molecular y actividad biológica se correlacionan observando los resultados de la modificación estructural sistémica en puntos finales biológicos definidos. La información de la relación estructura-actividad disponible a partir del primer ciclo de cribado puede usarse para generar bibliotecas secundarias pequeñas que se criban posteriormente para compuestos con una mayor afinidad. El proceso de realizar modificaciones sintéticas de un compuesto biológicamente activo para cumplir con los factores estereoelectrónicos, físico-químicos, farmacocinéticos y toxicológicos requeridos para una utilidad clínica se
40 denomina optimización de cabezas de serie.

Los compuestos candidatos identificados por los métodos de cribado de la pueden someterse de manera similar a un análisis de relación estructura-actividad y modificarse químicamente para proporcionar candidatos a fármaco mejorados. La presente descripción también engloba estos candidatos a fármaco mejorados.

45 **C- Identificación de Reguladores del Metabolismo del Hierro y Reguladores de la Expresión de la Hepcidina**

Según los métodos de cribado, la determinación de la capacidad de un compuesto candidato para regular el metabolismo del hierro o para regular la expresión de la hepcidina incluye la comparación de al menos un factor que es representativo de la actividad de señalización de un miembro de la superfamilia TGF- β medida en los sistemas de ensayo y control.

- 50 En los métodos de cribado, un compuesto candidato se identifica como un regulador de la expresión o actividad de la hepcidina y/o como un regulador del metabolismo del hierro, si el factor medido en el sistema de ensayo es menor o mayor que el factor medido en el sistema control. Más específicamente, si se encuentra que un compuesto candidato es un agonista de TGF- β o un antagonista de BMP, se identifica como un inhibidor de la expresión o actividad de la hepcidina y/o como un potenciador del metabolismo del hierro. Alternativamente, si se encuentra que
55 un compuesto candidato es un antagonista de TGF- β o un agonista de BMP, se identifica como un potenciador de la expresión o actividad de la hepcidina y/o como un inhibidor del metabolismo del hierro.

Los factores representativos de la actividad de señalización de un miembro de la superfamilia TGF- β incluyen ensayos de informadores de la señalización y expresión de genes diana (por ejemplo, genes de proteínas de la

matriz extracelular). Otros factores representativos de la actividad de señalización de un miembro de la superfamilia TGF- β incluyen fosforilación de Smad, translocación de proteínas Smad fosforiladas al núcleo y alteraciones en las velocidades de crecimiento celular. En determinadas realizaciones, el factor medido en los métodos de cribado de la invención es la cantidad de hierro presente en el sistema. En otras realizaciones, el factor medido es el nivel de expresión del ARNm de la hepcidina en el sistema. En otras realizaciones más, el factor medido es la proporción hepcidina/actina en el sistema.

La reproducibilidad de los resultados obtenidos en los métodos de cribado puede ensayarse realizando el análisis más de una vez con la misma concentración del mismo compuesto candidato (por ejemplo, incubando las células en más de un pocillo de una placa de ensayo). Además, como los compuestos candidatos pueden ser eficaces a varias concentraciones dependiendo de la naturaleza del compuesto y de la naturaleza de su(s) mecanismo(s) de acción, pueden ensayarse varias concentraciones del compuesto candidato (por ejemplo, pueden añadirse diferentes concentraciones a diferentes pocillos que contienen células). Generalmente, se usan concentraciones del compuesto candidato de 1 fM a aproximadamente 10 mM para el cribado. Las concentraciones de cribado preferidas están generalmente entre aproximadamente 10 pM y aproximadamente 100 μ M.

En determinadas realizaciones, los métodos implican además el uso de uno o más compuestos control negativos y/o positivos. Un compuesto control positivo puede ser cualquier molécula o agente que se sabe que modula la actividad de señalización del miembro de la familia TGF- β estudiado en el ensayo de cribado. Un compuesto control negativo puede ser cualquier molécula o agente que se sabe que no tiene efecto en la actividad de señalización del miembro de la familia TGF- β estudiado en el ensayo de cribado. En estas realizaciones, los métodos pueden comprender además comparar los efectos moduladores del compuesto candidato con los efectos moduladores (o ausencia de éstos) del compuesto control positivo o negativo. Por ejemplo, pueden usarse Noggin y decorina como controles positivos para la inhibición de la señalización de BMP y la señalización de TGF- β , respectivamente.

D- Caracterización de Compuestos Candidatos

Como apreciarán los expertos en la técnica, es deseable generalmente caracterizar adicionalmente los reguladores identificados por los métodos de cribado.

Por ejemplo, si un compuesto candidato se ha identificado como un modulador de la actividad de señalización en un miembro dado de la superfamilia TGF- β en un sistema de cultivo celular dado (por ejemplo, una línea celular establecida), puede ser deseable ensayar esta capacidad en un sistema de cultivo celular diferente (por ejemplo, células primarias o secundarias). Alternativamente o adicionalmente, puede ser deseable evaluar directamente los efectos del compuesto candidato en la expresión de la hepcidina, por ejemplo cuantificando la expresión del ARNm de la hepcidina usando RT-PCR cuantitativa en tiempo real (como se describe en el Ejemplo 1). También puede ser deseable evaluar la especificidad del compuesto candidato ensayando su capacidad para modular la actividad de señalización de otros miembros de la superfamilia TGF- β . También puede ser deseable realizar estudios de farmacocinética y toxicología.

Los compuestos candidatos identificados por los métodos de cribado de la descripción también pueden ensayarse adicionalmente en ensayos que permitan la determinación de las propiedades del compuesto *in vivo*. Los modelos animales adecuados incluyen modelos animales que pueden presentar deficiencia de hierro o sobrecarga de hierro o que se ha determinado que presentan regulación al alza de la expresión de la hepcidina o regulación a la baja de la expresión de la hepcidina.

Los ejemplos de modelos animales para sobrecarga de hierro incluyen, pero no están limitados a, ratones tratados con hierro carbonilo, ratones con β_2 -microglobulina inactivada génicamente (C. Pigeon *et al.*, J. Biol. Chem., 2001, 276: 7811-7819), ratones con USF2 (Factor Estimulador Aguas Arriba 2) inactivado génicamente (G. Nicolas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98: 8780-8785), y ratones con HFE inactivado génicamente (K.A. Ahmad *et al.*, Blood Cells Mol. Dis., 2002, 29: 361-366). Los ejemplos de modelos animales para deficiencia de hierro incluyen, pero no están limitados a, modelos de anemia en ratones con hemolisis aguda, provocada por fenilhidrazina y ratones con hemorragia provocada por flebotomías repetidas (G. Nicolas *et al.*, J. Clin. Invest., 2002, 110: 1037-1044). Los ejemplos de modelos animales que presentan una expresión incrementada del ARNm de la hepcidina incluyen ratones tratados por hepatectomía parcial (N. Kelley-Loughnane *et al.*, Hepatology, 2002, 35: 525-534), por lipopolisacárido (G.R. Lee, Semin. Hematol., 1983, 20: 61-80) y turpentina (G. Nicolas *et al.*, J. Clin. Invest., 2002, 110: 1037-1044).

E- Composiciones Farmacéuticas de Reguladores Identificados

La presente descripción también proporciona composiciones farmacéuticas, que comprenden, como ingrediente activo, una cantidad eficaz de al menos un regulador del metabolismo del hierro o al menos un regulador de la expresión o actividad de la hepcidina identificado por un ensayo de cribado inventivo. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse usando métodos convencionales muy conocidos en la técnica. Dichas composiciones incluyen, además del o de los ingredientes activos, al menos un diluyente líquido, semi-líquido o sólido farmacéuticamente aceptable que actúa como vehículo farmacéutico, excipiente o medio y denominado en la presente memoria "vehículo farmacéuticamente aceptable".

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir uno o más reguladores de la invención como ingredientes activos. Alternativamente, una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de un regulador inventivo puede administrarse a un paciente en combinación con o secuencialmente con una composición farmacéutica que contiene un regulador diferente inventivo. Sin embargo, en ambos casos, los reguladores tienen preferiblemente el mismo efecto regulador en el metabolismo del hierro y/o en la expresión o actividad de la hepcidina. Por ejemplo, un agonista de BMP y un antagonista de TGF- β , que aumentan los dos la expresión de la hepcidina e inhiben el metabolismo del hierro, pueden administrarse a un sujeto en una única composición farmacéutica, o en dos composiciones farmacéuticas diferentes.

Como apreciará un experto en la técnica, un regulador de la expresión de la hepcidina o un regulador del metabolismo del hierro, o una composición farmacéutica de éstos, puede administrarse de forma seriada o en combinación con terapéuticos convencionales usados en el tratamiento de trastornos del metabolismo del hierro. Dichos terapéuticos incluyen suplementos de hierro (en el caso de enfermedades asociadas con deficiencia de hierro) y agentes quelantes de hierro (en el caso de enfermedades asociadas con sobrecarga de hierro). Los suplementos de hierro incluyen, pero no están limitados a, fumarato ferroso, gluconato ferroso, sulfato ferroso, hierro dextrano, hierro polisacárido, hierro sorbitol, gluconato férrico de sodio y hierro sacarosa. Los agentes quelantes de hierro incluyen, por ejemplo, desferrioxamina, batofenantrolina y Clloquinol. Los suplementos de hierro o agentes quelantes de hierro pueden incluirse en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Alternativamente, pueden administrarse en composiciones farmacéuticas separadas.

Alternativamente o adicionalmente, un regulador de la expresión de la hepcidina o un regulador del metabolismo del hierro, o una composición farmacéutica de éstos, puede administrarse de forma seriada o en combinación con regímenes terapéuticos convencionales para el tratamiento de trastornos del metabolismo del hierro. Éstos incluyen, por ejemplo, flebotomía, en el caso de afecciones asociadas con sobrecarga de hierro.

III. Métodos de Tratamiento

En otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para el tratamiento y/o prevención de afecciones asociadas con perturbaciones en el metabolismo del hierro, incluyendo afecciones asociadas con sobrecarga de hierro y afecciones asociadas con deficiencia de hierro. Estos métodos comprenden administrar a un sujeto que tiene o tiene riesgo de tener dicha afección, una cantidad eficaz de un compuesto que modula la actividad de señalización de al menos un miembro de la superfamilia TGF- β , en el que la modulación de la actividad de señalización del miembro de la superfamilia TGF- β resulta en la regulación de la expresión o actividad de la hepcidina en el sujeto.

El compuesto puede ser un agonista o antagonista conocido del miembro de la superfamilia TGF- β . Alternativamente, el compuesto puede ser un regulador del metabolismo del hierro o un regulador de la expresión de la hepcidina identificado, por ejemplo, por un método de cribado proporcionado en la presente memoria.

A- Enfermedades del Metabolismo del Hierro

Las afecciones que pueden tratarse y/o prevenirse usando los métodos de la presente descripción incluyen cualquier enfermedad, trastorno o síndrome asociado con perturbaciones en el metabolismo del hierro. Las perturbaciones en el metabolismo del hierro pueden estar asociadas con alteraciones en uno o más de captación de hierro, absorción de hierro, transporte de hierro, almacenamiento de hierro, procesamiento de hierro, movilización de hierro y utilización de hierro. Generalmente, las perturbaciones en el metabolismo del hierro resultan en sobrecarga de hierro o deficiencia de hierro.

Las afecciones asociadas con sobrecarga de hierro incluyen enfermedades, síndromes o trastornos de sobrecarga de hierro tanto primarias como secundarias, incluyendo, pero no limitadas a, hemocromatosis hereditaria, porfiria cutánea tarda, esferocitosis hereditaria, anemia hipocrómica, anemia diseritropoyética (CDAI), displasia faciogenital (FGDY), síndrome de Aarskog, atranferrinemia, anemia sideroblástica (SA), anemia sideroblástica que responde a piridoxina y hemoglobinopatías tales como talasemia y célula falciforme. Algunos estudios han sugerido una asociación entre los trastornos del metabolismo del hierro, tales como talasemia y hemocromatosis, y varios estados patológicos, tales como diabetes mellitus tipo II (no dependiente de insulina) y aterosclerosis (A.J. Matthews *et al.*, Surg. Res., 1997, 73: 35-40; T.P. Tuomainen *et al.*, Diabetes Care, 1997, 20: 426-428).

Las enfermedades asociadas con deficiencia de hierro incluyen, pero no están limitadas a, anemia de enfermedad crónica, anemias con deficiencia de hierro, deficiencia de hierro funcional y anemia microcítica. El término "**anemia de enfermedad crónica**" se refiere a cualquier anemia que se desarrolla como resultado, por ejemplo, de infección extendida, inflamación, trastornos neoplásicos, etc. La anemia que se desarrolla se caracteriza frecuentemente por una vida media más corta de las células sanguíneas rojas y el secuestro de hierro en los macrófagos, lo que resulta en una disminución en la cantidad de hierro disponible para producir nuevas células sanguíneas rojas. Las afecciones asociadas con anemia de enfermedad crónica incluyen, pero no están limitadas a, endocarditis bacteriana crónica, osteomielitis, fiebre reumática, colitis ulcerosa y trastornos neoplásicos. Las afecciones adicionales incluyen otras enfermedades y trastornos asociados con infección, inflamación y neoplasmas, incluyendo, por ejemplo, infecciones inflamatorias (por ejemplo, absceso pulmonar, tuberculosis, etc), trastornos

inflamatorios no infecciosos (por ejemplo, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, hepatitis, enfermedad inflamatoria del intestino, etc.) y varios cánceres, tumores y malignidades (por ejemplo, carcinoma, sarcoma, linfoma, etc.). La anemia por deficiencia de hierro puede resultar de condiciones tales como embarazo, menstruación, infancia y niñez, pérdida de sangre debido a lesión, etc.

- 5 También se ha sugerido que el metabolismo del hierro juega un papel en varios estados patológicos adicionales, incluyendo enfermedad cardiovascular, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y determinados tipos de cánceres colorrectales (véanse, por ejemplo, P. Tuomainen *et al.*, *Circulation*, 1997, 97: 1461-1466; J.M. McCord, *Circulation*, 1991, 83: 1112-1114; J.L. Sullivan, *J. Clin. Epidemiol.*, 1996, 49: 1345-1352; M.A. Smith *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, 94: 9866-9868; P. Riederer *et al.*, *J. Neurochem.*, 1989, 512: 515-520; P. Knekt *et al.*, *Int. J. Cancer*, 1994, 56: 379-382).

B- Selección de los Sujetos

- 15 Los sujetos adecuados para recibir un tratamiento según los métodos descritos incluyen individuos a los que se ha diagnosticado una afección asociada con perturbaciones en el metabolismo del hierro, incluyendo, pero no limitado a, las enfermedades y trastornos listados anteriormente, e individuos que son susceptibles a las afecciones asociadas con perturbaciones en el metabolismo del hierro. Los sujetos adecuados pueden haber recibido o no previamente tratamiento tradicional para la afección.

- 20 Otros sujetos adecuados son individuos que presentan deficiencia de hierro o sobrecarga de hierro. La sobrecarga de hierro y la deficiencia de hierro pueden detectarse usando varios de los ensayos de laboratorio disponibles en la técnica que permiten la determinación de la capacidad total de unión de hierro (TIBC), niveles de hierro sérico, ferritina, hemoglobina, hematocrito y creatinina urinaria.

C- Administración

- 25 Un tratamiento según los métodos de la presente descripción puede consistir en una dosis única o una pluralidad de dosis durante un periodo de tiempo. Un regulador de la expresión de la hepcidina o un modulador del metabolismo del hierro, o una composición farmacéutica de éstos, también puede ser liberado desde una preparación de liberación lenta para tratamiento. La administración puede realizarse de cualquier manera conveniente tal como por inyección (subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o semejantes), administración oral o administración sublingual.

- 30 Las dosificaciones y regímenes de administración eficaces pueden determinarse fácilmente por la buena práctica médica y la afección clínica del paciente individual. La frecuencia de la administración dependerá de los parámetros farmacocinéticos del compuesto y de la ruta de administración. La formulación farmacéutica óptima puede determinarse dependiendo de la ruta de administración y de la dosificación deseada. Dichas formulaciones pueden influir en el estado físico, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo* y velocidad de aclaramiento *in vivo* de los compuestos administrados.

- 35 Dependiendo de la ruta de administración, puede calcularse una dosis adecuada según el peso corporal, área superficial corporal o tamaño del órgano. La optimización de la dosificación apropiada puede hacerla fácilmente los expertos en la técnica a la vista de los datos farmacocinéticos observados en ensayos clínicos humanos. El régimen de dosificación final será determinado por el médico responsable, considerando varios factores que modifican la acción de los fármacos, por ejemplo, la actividad específica del fármaco, la gravedad del daño y la capacidad de respuesta del paciente, la edad, afección, peso corporal, sexo y dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección actual, tiempo de administración y otros factores clínicos. Al realizarse los estudios, emergerá información adicional respecto a los niveles de dosificación apropiados y duración del tratamiento para varias afecciones asociadas con la sobrecarga de hierro y la deficiencia de hierro.

Ejemplos

- 45 Los ejemplos siguientes describen algunos de los modos preferidos para realizar y llevar a la práctica la presente invención y descripción. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos son sólo para propósitos ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la invención. Además, a no ser que la descripción en un Ejemplo se presente en pasado, el texto, como el resto de la especificación, no pretende sugerir que los experimentos se realizaron realmente o que los datos se obtuvieron realmente.

- 50 Algunos de los resultados presentados en esta sección se han descrito por los Solicitantes en un manuscrito científico reciente (J.L. Babitt *et al.*, "Bone Morphogenetic Protein Signaling by Hemojuvelin Regulates Heparin Expression", enviado a *Nature Genetics* el 3 de febrero, 2006).

EJEMPLO 1: Efectos de BMP y TGF- β en la Transcripción de la Heparidina en Células de Hígado

- 55 **Protocolo del Estudio.** Los efectos de BMP-2, Noggin (un inhibidor muy conocido de BMP) y TGF- β 1 en la expresión del ARNm de la hepcidina en células de hepatoma de hígado HepG2 se estudiaron y cuantificaron usando RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

Las células HepG2 (número de ATCC HB-8065) se crecieron en α -MEM (Medio Mínimo Esencial Alfa con L-Glutamina suplementado con 10% suero bovino fetal, 100 U/mL penicilina y 100 μ g/mL estreptomycin) hasta el 60% de confluencia en placas de cultivo tisular de 6 cm. Las células se incubaron en condiciones de bajo suero (α -MEM con 1% FBS) con 1 μ g/mL Noggin.Fc (R & D Systems, Minneapolis, MN) a 37°C durante 48 horas, o se privaron de suero durante 6 horas seguido de incubación con 50 ng/mL BMP-2 (R & D Systems) a 37°C durante 16 horas, o con 1 ng/mL TGF- β 1 (R & D Systems) a 37°C durante 16 horas. Alternativamente, las células se incubaron a 37°C durante 72 horas con hierro no unido a transferrina (65 pM Fe-NTA). Fe-NTA se generó combinando una proporción molar 1:1 de FeCl₃ hexahidrato (Sigma) en 0,1 molar HCl con ácido nitrilotriacético (NTA, Sigma) en medio α -MEM suplementado con 20 mM Hepes pH 7,5, como se ha descrito previamente (E.W. Randell *et al.*, J. Biol. Chem., 1994, 269: 16046-16053; S.G. Gehrke *et al.*, Blood, 2003, 102: 371-376).

El ARN total se aisló de las células HepG2 tratadas como se ha descrito anteriormente usando el Mini Kit RNAeasy (Qiagen, Valencia, CA) incluyendo digestión con ADNasa con el Kit ADNasa sin ARNasa (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. Se realizó la cuantificación en tiempo real de los transcritos de ARNm usando una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) en 2 etapas usando el Sistema de Detección de Secuencia ABI Prism 7900HT y el software SDS versión 2.0. La síntesis de la primera cadena de ADNc se realizó usando el Kit de Síntesis de ADNc iScript (Biorad Laboratories, Hercules, CA) según las instrucciones del fabricante usado 2 μ g de molde de ARN total por muestra. En una segunda etapa, los transcritos de hepcidina se amplificaron con el cebador con sentido HepcF (5'-CTGCAACCCAGGACAGAG-3') (SEQ ID NO: 1) y el cebador antisentido HepcR (5'-GGAATAAATAAGGAAGGGAGGGG-3') (SEQ ID NO: 2) y se detectaron usando iTaq SYBR Green Supermix con ROX (Biorad). En paralelo, se amplificaron los transcritos de β -actina con el cebador con sentido BactF (5'-AGGATGCAGAAGGAGATCACTG-3') (SEQ ID NO: 3) y el cebador antisentido BactR (5'-GGGTGTAACGCAACTAAGTCATAG-3') (SEQ ID NO: 4) y se detectaron de manera similar para servir como un control interno.

Las curvas estándar para hepcidina y β -actina se generaron a partir de diluciones determinadas de manera exacta de clones de ADNc de hepcidina (clones IMAGE 4715540) y β -actina (clon IMAGE 3451917) como moldes (los clones IMAGE se adquirieron en Open Biosystems y el ADN se secuenció para verificar sus insertos). Las muestras se analizaron en triplicado y los resultados se indican como la proporción de los valores medios para hepcidina respecto a β -actina:

Resultados. Como se muestra en la Figura 1, la incubación de las células HepG2 con Fe-NTA disminuyó la expresión de la proporción hepcidina/actina aproximadamente 6 veces (barra 4), un resultado que se correlaciona bien con una disminución indicada previamente en la expresión de la hepcidina causada por Fe-NTA en células HepG2 (S.G. Gehrke *et al.*, Blood, 2003, 102: 371-376). De manera significativa, la incubación con 50 ng/mL BMP-2 incrementó la expresión de la proporción hepcidina/actina 10 veces ($\pm$ 8%) por encima de la línea base (comparar la barra 2 con la barra 1). Por el contrario, la incubación con 1 μ g/mL Noggin.Fc (que inhibe la señalización endógena de BMP) disminuyó la expresión de la proporción hepcidina/actina 50 veces ($\pm$ 19%) por debajo de la línea base (comparar la barra 3 con la barra 1).

Como se muestra en la Figura 2, la incubación de las células HepG2 con 50 ng/mL BMP-2 incrementó la expresión de la proporción hepcidina/actina 15 veces ($\pm$ 8%) por encima de la línea base (comparar la barra 2 con la barra 1). Por el contrario, la incubación con 1 μ g/mL Noggin.Fc (que inhibe la señalización endógena de BMP) disminuyó la expresión de la proporción hepcidina/actina 6 veces ($\pm$ 23%) por debajo de la línea base (comparar la barra 3 con la barra 1). Además, la incubación con 1 ng/mL TGF- β 1 disminuyó la expresión de la proporción hepcidina/actina 6 veces ($\pm$ 6%) por debajo de la línea base (comparar la barra 4 con la barra 1).

EJEMPLO 2: Proteína HJV.Fc como Modulador de la Expresión de la Hepcidina

La hemocromatosis juvenil es un variante grave de la hemocromatosis causada por mutaciones en dos genes que proporcionan fenotipos indistinguibles. Un gen codifica la hepcidina (HAMP, 19q13.1). El segundo gen se ha identificado recientemente como hemojuvelina (HJV, 1q21). Aunque la función de HJV no se conoce, los niveles de hepcidina están deprimidos en personas con mutaciones en HJV, lo que indica que HJV puede ser un modulador de la expresión de la hepcidina. Como ya se ha mencionado en la presente memoria, HJV también es un miembro de la familia de proteínas de la molécula de direccionamiento repulsivo (RGM), que incluye RGMa y DRAGON, moléculas de adhesión neuronal que se ha mostrado recientemente por los presentes Solicitantes que funcionan como un co-receptor de BMP (J.L. Babitt *et al.*, J. Biol. Chem., 2005, 280: 29820-29827; T.A. Samad *et al.*, J. Biol. Chem., 2005, 280: 14122-14129). El estudio presentado más adelante se emprendió para investigar si HJV podría mediar de manera similar la señalización de BMP.

Materiales y Métodos

Subclonación de ADNc. El ADNc que codifica HJV murina mutante con una sustitución de glicina a valina en el aminoácido 313 (mHJV313V) se generó por una estrategia de PCR superpuesta. Se usaron dos cebadores 5'-ACCGAATTCGGGGGACCTGGCTGGATAG-3' (SEQ ID NO: 5) y 5'-CGGAGGGCATAACCCCAACACACAG-3' (SEQ ID NO: 6) para generar un fragmento N-terminal de mHJV que incorpora una sustitución de valina por glicina en el

aminoácido 313. Se usaron los cebadores 5'-CTGTGTG'TTGGGGtATGCCCTCCG-3' (SEQ ID NO: 7) y 5'-CCCTCTAGATGGTGCCAGTCTCCAAAGC-3' (SEQ ID NO: 8) para generar un fragmento C-terminal de HJV con la misma sustitución. Se realizó un ciclo final de PCR usando los cebadores exteriores para generar el mutante mHJV313V, que se subclonó en el vector de expresión pCDNA 3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

- 5 El ADNc que codifica la proteína de fusión soluble mHJV.Fc se generó por PCR de los dominios extracelulares de HJV murina de tipo salvaje usando los cebadores: 5'-GGAAGCTTATGGGCCAGTCCCCTAGT-3' (SEQ ID NO: 9) y 5'-CCGGATCCGCTAAGTTCTCTAAATCCGTC-3' (SEQ ID NO: 10) seguido de subclonación en el vector de expresión de mamíferos pglplus (R & D Systems, Minneapolis, MN) en marco con la parte Fc de IgG humana.

- 10 El ADNc que codifica HJV humana (hHJV) etiquetado con flag se generó a partir de la variante B del transcrito de HJV humano (clon IMAGE 6198223), que no contiene el exón 2, adquirido en ATCC (# 10642497). El exón 2 que codifica el péptido señal de la isoforma de HJV de longitud completa (variante A, REGISTRO # NM213653) se amplificó por PCR a partir de ADN genómico humano usando el cebador directo: 5'-CGAGAATTCACCTTACAGGGCTTCCGGTCA-3' (SEQ ID NO: 11) y el cebador inverso: 5'-GCATTGAGAATGAGCATGTCCACAGAGGAGCAGCAG-3' (SEQ ID NO: 12). Se amplificó un fragmento de ADNc en 3' correspondiente al resto de la secuencia codificadora (incluyendo el codón de parada) por PCR a partir del clon IMAGE usando el cebador directo 5'-CCTCTGTGGACATGCTCATTCTCAATGCAAGATCCTCCGCTG-3' (SEQ ID NO: 13) y 5'-CGTCTCGAGTTACTGAATGCCAAGCCACAGAACAAGAGC-3' (SEQ ID NO: 14), como cebador inverso. Los dos fragmentos que se superponen se fusionaron entre sí por PCR y el producto de ADNc de longitud completa se cortó con EcoR I y Xho I y se clonó en pCDNA3.1 (Invitrogen) para generar pCDNA3.1-hHJV. Para generar hHJV etiquetado en N-terminal con Flag, se generó un fragmento en 5' correspondiente al comienzo del exón 3 por PCR usando el cebador directo: 5'-GACAGATCTGCGGCCGCTCATTCTCAATGCAAGATCCTCCG-3' (SEQ ID NO: 15) y el cebador inverso: 5'-GAGCAGTTGTGCTGGATCATCAGG-3' (SEQ ID NO: 16). Después de una digestión con Not I/Sac II, el fragmento se ligó junto con un fragmento hHJV en 3' Sac II/Xba I, extraído de pCDNA3.1-hHJV, en los sitios Not I/Xba I de p3XFLAGCMV9 (Sigma).

- 25 El ADNc que codifica hHJV G99V etiquetado con Flag mutante (hG99V), con una sustitución valina a glicina en el aminoácido 99, se generó a partir de hHJV por mutagénesis dirigida a sitio usando el kit QuikChange (Stratagene, La Jolla, CA). El ADNc que codifica la construcción de promotor de hepcidina luciferasa se generó subclonando la región -2649 a +45 del promotor de hepcidina humano 46 en el vector pGL2-Bsic (Promega, Madison, WI) en 5' del gen informador luciferasa de luciérnaga. Todos los ADNc se secuenciaron para verificar la fidelidad de las construcciones (MGH, Molecular Biology DNA Sequencing Core Facility).

- 30 **Cultivo celular y transfección.** Las células CHO (American Type Culture Collection ATCC #CCL-61) se cultivaron en Mezcla de Nutrientes F-12K, Modificación de Kaighn (Invitrogen) suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS) (Atlanta Biologicals, Lawrenceville, GA). Las células HepG2 y las células Hep3B (ATCC #HB-8065 y #HB-8064) se cultivaron en Medio Mínimo Esencial Alfa con L-glutamina (α -MEM, Invitrogen) que contiene 10% FBS. Las células HEK 293 (ATCC #CRL-1573) se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Cellgro Mediatech, Herndon, VA) suplementado con 10% FBS. Todas las transfecciones de plásmidos se realizaron con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) o reactivo de transfección Effectene (QIAGEN Inc, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas de manera estable se seleccionaron y se cultivaron en 1 mg/ml de Geneticina (Cellgro Mediatech, Herndon, VA).

- 40 **Ensayo de la Luciferasa.** Las células HepG2 o Hep3B se transfectaron transitoriamente con 2,5 μ g de informador de luciferasa que responde a BMP (BRE-Luc), 2,5 μ g de informador de luciferasa que responde a TGF- β , (CAGA)₁₂MPL-Luc (CAGA-Luc) (ambos proporcionados amablemente por Peter ten Dijke, Leiden University Medical Center, Holanda) ó 2,5 μ g de construcción del promotor de la hepcidina informador de luciferasa, en combinación con 0,25 μ g de vector de luciferasa de Renilla pRL-TK (Promega) para controlar la eficacia de la transfección, con o sin co-transfección con ADNc de HJV de tipo salvaje o mutante. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se privaron de suero en α -MEM suplementado con 1% FBS durante 6 horas y se trataron con varias cantidades de ligandos TGF- β 1 o BMP (R & D Systems) durante 16 horas, en ausencia o presencia de 1 μ g/ml de noggin (R & D Systems) ó 20 μ g/ml de anticuerpo neutralizante anti-BMP-2/4 (R & D Systems). Las células se lisaron y la actividad luciferasa se determinó con el Ensayo Informador Dual según las instrucciones del fabricante (Promega). Los experimentos se realizaron en pocillos en duplicado o triplicado. La actividad luciferasa relativa se calculó como la proporción de los valores luciferasa de luciérnaga (informador) y Renilla (control de transfección) y se expresa como las veces de incremento por encima de células no estimuladas transfectadas con informador solo.

- 55 **Purificación de mHJV.Fc.** Las células CHO que expresan de manera estable mHJV.Fc se cultivaron en Mezcla de Nutrientes F-12K, Modificación de Kaighn, suplementado con 5% FBS con muy poca IgG (Invitrogen) usando frascos multifloor de 175 cm² (Denville Scientific, Southplainfield, NJ). mHJV.Fc se purificó a partir del medio de las células transfectadas de manera estable mediante cromatografía de afinidad en Proteína A de una etapa usando columnas HiTrap rProtein A FF (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) como se ha descrito previamente (E. del Re *et al.*, J. Biol. Chem., 2004, 279: 22765-22772). La proteína purificada se eluyó con 100 mM glicina-HCl, pH 3,2 y se neutralizó con 0,3 M Tris-HCl pH 9 como se ha descrito previamente (E. del Re *et al.*, J. Biol. Chem., 2004, 279: 22765-22772). mHJV.Fc se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-

PAGE) reductora y los geles se tiñeron con azul de Coomassie Bio-safe (Bio-Rad, Hercules, CA) para determinar la pureza y cuantificar la concentración de proteínas.

Generación de anticuerpo HJV y análisis por inmunotransferencia. Se generó un anticuerpo policlonal de conejo anti-HJV (aHJV) murino purificado por afinidad frente al péptido RVAEDVARAFSAEQDLQLC (SEQ ID NO: 17), aminoácidos 292-310 en el extremo C-terminal de HJV murino en 5' de su cola hidrofóbica (G. Papamokolaou *et al.*, Nat. Genet., 2004, 36: 77-82). Los hígados de ratones 129S6/SvEvTac de tipo salvaje o *Hjv-1* (F.W. Huang *et al.*, J. Clin. Invest., 2005, 115: 2187-2191) o células transfectadas con HJV de tipo salvaje o mutante, se homogeneizaron/sonicaron en tampón de lisis (200 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% NP-40 y 10% glicerol) que contiene una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche, Mannheim, Alemania) como se ha descrito previamente (J.L. Babitt *et al.*, J. Biol. Chem., 2005, 280: 29820-29827). Para los ensayos que examinan la expresión de Smad fosforilada, se añadieron al tampón de lisis 1 mM ortovanadato de sodio (Sigma, St. Louis, MO) y 1 mM fluoruro de sodio (Sigma) como inhibidores de fosfatasa. mHJV.Fc purificado, lisados de células transfectadas o lisados de hígado se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) reductora y transferencia Western como se ha descrito previamente (J.L. Babitt *et al.*, J. Biol. Chem., 2005, 280: 29820-29827) usando anticuerpo HJV (1:1.000, 4 mg/mL) a 4°C toda la noche, anticuerpo de cabra anti-Fc humano (1:1.000) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) a temperatura ambiente durante 1 hora o anticuerpo policlonal de conejo anti-fosfosamd1/5/8 (1:1.000) (Cell Signaling, Beverly, MA) a 4°C toda la noche. Las transferencias se desmontaron y se volvieron a ensayar con anticuerpo monoclonal de ratón anti-β-actina (1:5.000) (clon AC 15, Sigma), anticuerpo policlonal de conejo anti-Samd1 (1:250) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) a 4°C toda la noche o anticuerpo policlonal de conejo anti-actina (1:50) (Biomedical Technologies, Inc., Stoughton, MA) a temperatura ambiente 1 hora como controles de carga.

El anticuerpo HJV reconoce bandas principales a ~49 kDa y ~30 kDa en el hígado (carril 2, Fig. 3(A)), correspondientes al tamaño predicho de HJV de longitud completa y HJV que se ha escindido en un sitio de escisión proteolítica previamente descrito. La banda de ~62 kDa representa probablemente una forma de orden superior. No se observaron bandas después de la preincubación del anticuerpo con el péptido competidor (carril 1). Se observaron resultados similares en células CHO transfectadas debiéndose probablemente la diferencia de tamaño a la glicosilación diferencial o a un procesamiento alterado (Fig. 3(B)). El ADNc de HJV.Fc, generado fusionando el dominio extracelular de HJV con Fc humano, se transfectó de manera estable en células CHO, y la proteína HJV-Fc se purificó del medio por cromatografía en proteína A en una etapa. La Transferencia Western de la proteína purificada con anticuerpo anti-HJV (carriles 1-2) o anticuerpo anti-Fc (carriles 3-4) confirmó la presencia de ambos dominios en la proteína purificada y proporcionó una validación adicional del anticuerpo anti-HJV. Ambos anticuerpos reconocieron las bandas ~70-75 kDa y ~60 kDa, correspondientes a los tamaños predichos de las proteínas de longitud completa y escindida proteolíticamente. Una banda menor a ~40-45 kDa sugiere otro sitio posible de escisión proteolítica.

Yodación del ligando y entrecruzamiento. Dos (2) µg de ligando BMP-2 o BMP-4 humano sin vehículo (R & D Systems) por reacción se yodaron con [¹²⁵I] por el método de la cloramina-T modificado como se ha descrito previamente (C.A. Frolick *et al.*, J. Biol. Chem., 1984, 259: 10995-11000, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad). Se incubó [¹²⁵I]-BMP-2 con 60 ng de mHJV.Fc o ALK5.Fc (R & D Systems) en 20 mM HEPES (pH 7,8) con 0,1% BSA y una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics) o con tampón solo. Esta mezcla se incubó en ausencia o presencia de 2,5 M suberato de disuccinimidilo (DSS, Sigma, St. Louis, MO) seguido de incubación con lechos de Proteína A Sefarosa (Amersham) como se ha descrito previamente (J.L. Babitt *et al.*, J. Biol. Chem., 2005, 280: 29820-29827). Los lechos se lavaron con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y la proteína se eluyó con tampón de muestra Laemmli no reductor (Bio-Rad). La proteína eluida se separó por SDS-PAGE y se analizó por autorradiografía.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) cuantitativa. Las células HepG2 o Hep3B se crecieron hasta 60% de confluencia en placas de cultivo tisular de 6 cm. Cuando se indica, las células se transfectaron con varias cantidades de ADNc de hHJV o hG99V. Veinticuatro (24) horas después de la transfección, las células se privaron de suero en α-MEM con 1% FBS seguido de incubación con 50 ng/mL de BMP-2 a 37°C durante varios tiempos o con 1 µg/mL de noggin a 37°C durante 48 horas. Para los experimentos con cicloheximida, se añadieron 10 µg/mL de cicloheximida durante 30 minutos antes de la adición de BMP-2. Se aisló el ARN total usando el Mini Kit RNeasy (QIAGEN Inc., Valencia, CA), incluyendo digestión con ADNasa con el Kit ADNasa sin ARNasa (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante. La cuantificación en tiempo real de los transcritos de ARNm se realizó usando una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) en 2 etapas usando el Sistema de Detección de Secuencia ABI Prism 7900HT y el software SDS versión 2.0. La síntesis de la primera cadena de ADNc se realizó usando el Kit de Síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante usando 2 µg de molde de ARN total por muestra.

En una segunda etapa, los transcritos de hepcidina se amplificaron con el cebador con sentido HepcF 5'-CTGCAACCCCAGGACAGAG-3' (SEQ ID NO: 1) y el cebador antisentido HepcR 5'-GGAATAAATAAGGAAGGGAGGGG-3' (SEQ ID NO: 2) y se detectaron usando iTaq SYBR Green Supermix con ROX (Biorad) según las instrucciones del fabricante. En paralelo, se amplificaron los transcritos de β-actina con el cebador con sentido BactF 5'-AGGATGCAGAAGGAGATCACTG-3' (SEQ ID NO: 3) y el cebador antisentido 5'-

GGGTGTAACGCAACTAAGTCATAG-3' (SEQ ID NO: 4) y se detectaron de manera similar para servir como un control interno. Las curvas estándar para hepcidina y β -actina se generaron a partir de diluciones determinadas de manera exacta de plásmidos que contienen las secuencias de ADNc de hepcidina y β -actina como moldes (clones IMAGE 4715540 y 3451917 de Open Biosystems seguido de análisis de secuencia para verificar el inserto propuesto). Las muestras se analizaron en triplicado y los resultados se indican como la proporción de los valores medios para hepcidina respecto a β -actina. Los transcritos para BMP-2 y BMP-4 se amplificaron a partir de ADNc de HepG2 generado anteriormente usando el cebador directo 5'-CGTGACCAGACTTTTGGACAC-3' (SEQ ID NO: 18) y el cebador inverso 5'-GGCATGATTAGTGGAGTTCAG-3' (SEQ ID NO: 19) (para BMP-2) y el cebador directo: 5'-AGCAGCCAACTATGGGCTA-3' (SEQ ID NO: 20) y el cebador inverso 5'-TGGTTGAGTTGAGGTGGTCA-3' (SEQ ID NO: 21) (para BMP-4).

Aislamiento y Cultivo de Hepatocitos Primarios. Los hepatocitos primarios se aislaron por digestión con colagenasa de hígados de ratones de 8 a 10 semanas de edad 129S6/SvEvTac de tipo salvaje o *Hjv*^{-/-} (F.W. Huang *et al.*, J. Clin. Invest., 2005, 115: 2187-2191) usando los métodos descritos previamente (J. Lin *et al.*, Cell, 2004, 119: 121-135). Brevemente, los ratones se perfundieron a través de la vena cava inferior con Disolución de Sales Equilibrada de Hank (HBSS) sin calcio (Mediatech Inc.) suplementada con 0,5 mM EDTA y 16,7 mM bicarbonato de sodio durante 4 minutos a una velocidad de ~ 1,5 mL/min. Los ratones se perfundieron posteriormente con HBSS que contiene calcio que contiene 0,05% colagenasa (Sigma), 1% albúmina de suero bovino y 16,7 mM bicarbonato de sodio durante 8 min. Después de la digestión enzimática, los hepatocitos se liberaron en el medio de cultivo [1:1 medio de Eagle modificado por Dulbecco/medio F12 de Ham (Gibco™, Gran Island, NY) suplementado con 100 UI/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin, 18 mM HEPES, 1 mM piruvato de sodio, 10 μ g/ml de insulina, 5,5 μ g/ml de transferrina y 5 ng/ml de selenio (ITS; Sigma), 2 mM L-glutamina, 0,1 mM aminoácidos no esenciales (Gibco™), 10% FBS (HyClone, Logan UT)], se pasaron a través de un filtro celular de malla de 100 μ m BD Falcon™ (BD Biosciences, San Jose, CA), se centrifugaron, se lavaron cuidadosamente con medio de cultivo y se contaron.

Las células (>90% hepatocitos por microscopía) se sembraron en placas recubiertas con colágeno (Sigma) a 5×10^5 células/placa de 60 mm. Después de 2 a 3 horas, las células se lavaron con PBS, se privaron de suero con medio de cultivo que contiene 1% FBS durante 6 horas y se estimularon con BMP-2 humana recombinante a varias concentraciones durante 12 horas. Se aisló el ARN usando el kit RNeasy según las direcciones del fabricante (QIAGEN).

Análisis por Transferencia Northern. El ARN total (2,5 μ g) de los hepatocitos primarios se separó en un gel de agarosa formaldehído 1% y se transfirió a membranas Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotech). Las membranas se cocieron durante dos horas a 80°C en vacío y se hibridaron con sondas marcadas radiactivamente específicas para hepcidina 1 de ratón amplificadas del ADNc del clon Mus Musculus p3NMF19.5 Soares de ratón IMAGE: 317863 con los cebadores 5'-TCCTTAGACTGCACAGCAGAA-3' (SEQ ID NO: 22) y 5'-ATAAATAAGGACGGGAGGGG-3' (SEQ ID NO: 23) y β -actina (S. Alonso *et al.*, J. Mol. Evol., 1986, 23: 11-22). La expresión se cuantificó usando un fosforimager (Molecular Dynamics, ahora Amersham Biosciences) y se normalizó respecto a β -actina o ARN 28S como controles de carga.

Análisis estadístico. Se usó un ensayo de la *t* de Student de dos colas con un valor P de <0,05 para determinar la significancia estadística.

Resultado 1: HJV induce Señales de BMP pero no de TGF- β

Las células HepG2 se transfectaron con un informador de luciferasa que responde a BMP (BRE-Luc, Figura 4, paneles A y C) o informador de luciferasa que responde a TGF- β (CAGA-Luc, Figura 4, panel B) bien solo o en combinación con ADNc que codifica HJV. Las células transfectadas se incubaron con o sin 0,5 nM de BMP-2, BMP-4 o 40 pM de TGF- β 1 durante 16 horas seguido de la medida de la actividad luciferasa. La estimulación con BMP o TGF- β incrementó la actividad luciferasa relativa para sus informadores respectivos comparado con las células no estimuladas (A y B, comparar las barras 2 con 1). La co-transfección con HJV incrementó de manera similar la actividad luciferasa de BRE incluso en ausencia de estimulación exógena con BMP (A, barra 3). La señalización de BMP mediada por HJV fue dependiente de la dosis (C, barras grises) y la presencia de HJV aumentó la señalización producida por BMP exógena (C, barras negras). Por el contrario, la co-transfección con HJV (hasta 1 μ g) no incrementó la actividad luciferasa de CAGA por encima de la línea base (B, barra 3). Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que HJV puede mediar la señalización de BMP pero no la señalización de TGF- β y que HJV se comporta de una manera consistente con un posible receptor auxiliar para BMP-2.

Resultado 2: La Señalización de BMP Mediada por HJV se Inhibe por Noggin

La capacidad de HJV de mediar la señalización de BMP incluso en ausencia de ligando BMP exógeno plantea la cuestión de si HJV está actuando de una manera dependiente de ligando o si está aumentando la señalización por ligandos BMP endógenos. Por lo tanto, se emprendieron estudios para determinar si la señalización mediada por HJV podría ser inhibida por Noggin, un inhibidor soluble de la señalización de BMP que funciona uniéndose a los ligandos BMP y bloqueando los epítomos de unión para los receptores de BMP.

Las células HepG2 se co-transfectaron con ADNc de BRE-Luc y HJV o vector vacío. Las células transfectadas se incubaron con o sin 0,5 nM BMP-2 exógeno en presencia o ausencia de 1 µg de proteína Noggin durante 16 horas seguido de la medida de la actividad luciferasa. Los resultados obtenidos se indican en la Figura 5.

En ausencia de Noggin, la co-transfección con ADNc de HJV incrementó la actividad luciferasa de BRE 10 veces por encima de la línea base (comparar la barra 2 con la barra 1). De manera similar, la incubación con BMP-2 exógeno incrementó la actividad luciferasa de BRE 12 veces por encima de la línea base (comparar la barra 4 con la barra 1). Esta estimulación por HJV o BMP exógeno pudo bloquearse por la presencia de proteína Noggin (barras 3,5). Por el contrario, Noggin no afectó la actividad luciferasa de CAGA inducida por TGF-β1 (barras 6-8). Estos datos sugieren que HJV genera señales de BMP de una manera dependiente de ligando, presumiblemente a través de ligandos BMP expresados endógenamente.

Resultado 3: HJV.Fc se Une a BMP-2 Selectivamente

HJV.Fc se incubó toda la noche con BMP-2 marcado con ¹²⁵I con o sin exceso de BMP-2, -4, -7 frío o TGF-β1, seguido de incubación en placas recubiertas con proteína A y determinación de radiactividad (Fig. 6(A) y Fig. 7). Alternativamente, se realizó el entrecruzamiento químico de HJV.Fc con BMP-2 marcado con ¹²⁵I usando DSS en un sistema sin células (Fig. 6(B)).

Como se muestra en la Fig. 6(A), HJV.Fc fue capaz de unirse a ¹²⁵I-BMP-2 de una manera dependiente de la dosis. La unión de HJV.Fc a ¹²⁵I-BMP-2 se inhibió de manera competitiva por exceso de BMP-2 frío pero no por BMP-4, BMP-7 o TGF-β1 (véase la Fig. 7). ¹²⁵I-BMP-2 puede entrecruzarse químicamente con HJV.Fc en presencia de DSS (Fig. 6(B), carril 4) y esto puede inhibirse por exceso de BMP-2 frío (carril 5). Como controles negativos, no se observó ninguna banda en ausencia de DSS (carriles 1 y 2) o cuando se usó tampón solo (carril 3) o ALK5.Fc (un receptor de TGF-β de tipo I, carril 6) en lugar de HJV.Fc.

Resultado 4: La Señalización de BMP Mediada por HJV es Inhibida por los Receptores Dominantes Negativos de Tipo I ALK3 y ALK6 y por Smad1 Dominante Negativo

Las células HepG2 se co-transfectaron con BRE-Luc y HJV bien solos o en combinación con receptor ALK3 de BMP tipo I dominante negativo (ALK3 DN) o ALK6 (ALK6 DN) (Fig. 8(A)) o con el de tipo salvaje (WT) frente a R-Smad I dominante negativo (DN) (Fig. 8(B)). Las células transfectadas se incubaron en presencia o ausencia de 0,5 nM BMP-2 durante 16 horas seguido de la medida de la actividad luciferasa.

Como se muestra en la Fig. 8(A), la transfección con HJV o incubación de las células con BMP-2 exógeno incrementó la actividad luciferasa de BRE por encima de la línea base ~ 15-20 veces (comparar las barras 2 y 5 con la barra 1). Esta estimulación por HJV o BMP-2 exógeno pudo bloquearse por la co-transfección con ALK3 dominante negativo (barras 3, 6) o ALK6 dominante negativo (barras 4, 7).

Como se muestra en la Fig. 8(B), la transfección con Smad 1 WT solo incrementó la actividad luciferasa de BRE ~12 veces por encima de la línea base (comparar las barras 2 con 1). Por el contrario, la transfección con Smad 1 DN solo disminuyó la actividad luciferasa de BRE por debajo de la línea base (comparar la barra 3 con la barra 1). Esto proporciona un apoyo adicional a la idea de que hay una transducción de la señal basal a través de la ruta BMP en estas células en ausencia de ligando añadido exógenamente y que esta señalización puede aumentarse por la presencia de Smad 1 WT adicional e inhibirse por Smad 1 DN. La transfección con HJV incrementó la actividad luciferasa de BRE ~ 12 veces por encima de la línea base (barra 4). La co-transfección de Smad 1 WT con HJV aumentó más la señalización inducida por Smad 1 WT o HJV solo (comparar la barra 5 con 2, 4). La co-transfección de Smad 1 DN con HJV bloqueó el incremento de la señal observado con HJV solo (comparar la barra 6 con la barra 4). Se observaron resultados similares para el efecto de Smad 1 WT y Smad 1 DN en la estimulación con BMP-2 exógeno (barras 7-9). Así, la señalización de BMP mediada por HJV ocurre a través de la ruta de señalización clásica de BMP a través de los receptores de BMP de tipo I ALK3 y ALK6 así como R-Smad1.

Resultado 5: Producción y Caracterización de HJVG313V Mutante y la Proteína de Fusión HJVG313V.Fc

La mutación más común de HJV que resulta en hemocromatosis juvenil es una mutación puntual que sustituye valina por glicina en el aminoácido 320 (correspondiente al aminoácido 313 en HJV murina). Se prepararon los ADNc del HJVG313V mutante y HJVG313V.Fc soluble usando técnicas de PCR y de subclonación como se ha descrito anteriormente, se transfectaron en células CHO y se analizaron por SDS PAGE reductora seguido de transferencia Western con anticuerpo anti-HJV (Fig. 9(A) y (B) panel de la izquierda) o anticuerpo anti-Fc (Fig. 9(B), panel de la derecha). Alternativamente, se analizaron células transfectadas no permeabilizadas por microscopía de inmunofluorescencia usando anticuerpo anti-HJV (Fig. 10).

Como se muestra en la Fig. 9(A), HJVG313V mutante se expresa en las células CHO, pero migra con un patrón diferente que HJV de tipo salvaje lo que sugiere que se procesa de manera diferente, al menos en este tipo celular. HJVG313V.Fc mutante también parece procesarse de manera diferente que HJV.Fc de tipo salvaje con una pérdida de la banda de ~ 60 kDa (véase la Fig. 9(B)).

Como se muestra en la Fig. 10, tanto HJV de tipo salvaje como HJVG313V mutante se expresan en la superficie celular con una distribución punteada.

Resultado 6: HJVG313V Mutante disminuye la Capacidad de Señalización de BMP Comparado con HJV de Tipo Salvaje

- 5 Las células HepG2 se transfectaron con BRE-Luc solo o en combinación con concentraciones crecientes de ADNc de HJV de tipo salvaje o HJVG313V mutante. Las células transfectadas se incubaron en presencia o ausencia de 0,5 nM BMP-2 durante 16 horas seguido de la medida de la actividad luciferasa. Como se muestra en la Figura 11, en ausencia de ligando exógeno, HJV de tipo salvaje incrementó la actividad luciferasa de BRE hasta 23 veces por encima de la línea base. Esta estimulación fue del mismo orden que la observada con 0,5 nM BMP-2 exógeno. Por el contrario, HJVG313V mutante incrementó la actividad luciferasa de BRE sólo hasta un máximo de 9 veces. Esto sugiere que HJVG313V mutante, que en los seres humanos puede resultar en hemocromatosis juvenil, tienen una capacidad de señalización de BMP disminuida en células de hígado, planteando la cuestión de si la señalización de BMP podría jugar un papel en el metabolismo del hierro.

Conclusiones

- 15 Como se ha indicado anteriormente, los Solicitantes han mostrado que (1) HJV induce la señalización de BMP pero no de TGF- β ; (2) la señalización de HJV se bloquea por Noggin, un inhibidor muy conocido de BMP; (3) HJV se une directamente al ligando BMP-2 marcado radiactivamente; (4) HJV produce la señal a través de los receptores de BMP de tipo I, ALK3 y ALK6; (5) HJV produce la señal a través de R-Smad, Smad1 de BMP; (6) un mutante de HJV que se sabe que causa hemocromatosis juvenil disminuye la capacidad de señalización de BMP; y (7) BMP incrementa, mientras que Noggin disminuye, la expresión de la hepcidina en células de hígado.

Estos resultados sugieren que HJV es un nuevo co-receptor de BMP cuya capacidad de señalización de BMP es importante en la regulación del metabolismo del hierro. Las mutaciones en HJV podrían dar lugar a una señalización de BMP disminuida en células del hígado, que podría entonces disminuir la expresión de la hepcidina, explicando de esta manera por qué las personas con mutaciones en HJV tienen niveles disminuidos de hepcidina y así sobrecarga de hierro. Los presentes descubrimientos respecto al nuevo mecanismo de acción de HJV revelan un vínculo hasta ahora no descubierto entre la señalización de BMP y el metabolismo del hierro, y podrían dar lugar a nuevas estrategias de tratamiento de los trastornos del metabolismo del hierro tales como hemocromatosis y anemia de enfermedad crónica.

EJEMPLO 3: Efectos de BMP-2 en la Capacidad de Unión de Hierro *in vivo*

- 30 **Protocolo del Estudio.** Se inyectaron intraorbitalmente a ratones normales 18 μ g de BMP-2 (equivalente a 1 mg por kg de peso corporal) o disolución vehicular como control. Después de 4 horas, se extrajo sangre y se midieron los niveles de hierro sérico y la capacidad total de unión de hierro usando ensayos colorimétricos.

Como se muestra en la Figura 12, la inyección de BMP-2 dio lugar a disminuciones significativas tanto del hierro sérico como de la capacidad total de unión de hierro. Este resultado indica que los ligandos BMP y los inhibidores de BMP serán útiles como agentes terapéuticos para regular los niveles de hierro en animales completos incluyendo los seres humanos.

EJEMPLO 4: Mutantes de HJV, RGMa y Dragon Proteolíticamente Estables

Se emprendieron experimentos para demostrar la viabilidad de producir proteínas HJV, RGMa y Dragon mutantes que, a diferencia de sus proteínas de tipo salvaje correspondientes, no experimentan escisión proteolítica.

- 40 Se generó ADNc del mutante RGMa-D169A.Fc de ratón y se expresó en sobrenadantes de células HEK. La Figura 13 muestra que la proteína purificada obtenida no se escinde proteolíticamente comparada con la proteína RGMa.Fc de tipo salvaje de ratón.

De manera similar, se generó ADNc del mutante Dragon-D171A.Fc de ratón y se expresó en sobrenadantes de células HEK. Se mostró que la proteína mutante purificada era estable a escisión proteolítica comparada con la proteína Dragon.Fc de tipo salvaje de ratón (véase la Figura 14).

En un tercer experimento, se generó ADNc del mutante HJV-D172A humano y se expresó en sobrenadantes de células HEK. Como se muestra en la Figura 15, a diferencia de la proteína HJV humana de tipo salvaje, la proteína HJV mutante no experimentó escisión proteolítica.

- 50 Las proteínas de fusión mutantes HJV, RGMa y Dragon que son más estables a la escisión proteolítica que las versiones de tipo salvaje podrían usarse ventajosamente en los métodos de la presente invención y descripción

Otras Realizaciones

Otras realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la especificación o práctica de la invención descrita en la presente memoria. Se pretende que la especificación y los

ejemplos se consideren sólo como ejemplares, indicándose el verdadero alcance de la invención por las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión HJV.Fc para uso en un método para inhibir la expresión o actividad de la hepcidina para la prevención o tratamiento de una afección asociada con deficiencia de hierro en un sujeto, en el que la proteína de fusión HJV.Fc es un antagonista de BMP
- 5 2. La proteína de fusión HJV.Fc para uso según la reivindicación 1, en el que el sujeto tiene o presenta riesgo de tener una afección asociada con deficiencia de hierro.
3. La proteína de fusión HJV.Fc para uso según la reivindicación 1, en el que la regulación de la expresión o actividad de la hepcidina en el sujeto comprende inhibir la expresión o actividad de la hepcidina en el sujeto.
- 10 4. La proteína de fusión HJV.Fc para uso según la reivindicación 1, en el que la afección asociada con deficiencia de hierro se selecciona del grupo que consiste en anemia de enfermedad crónica, anemia por deficiencia de hierro, deficiencia de hierro funcional, y anemia microcítica.
5. Una proteína de fusión HJV.Fc para uso en la regulación del metabolismo del hierro o un proceso metabólico del hierro para la prevención o tratamiento de una afección asociada con deficiencia de hierro en un sujeto, en el que la proteína de fusión HJV.Fc es un antagonista de BMP.
- 15 6. La proteína de fusión HJV.Fc para uso según la reivindicación 5, en el que la administración del compuesto resulta en la regulación de la expresión o actividad de la hepcidina en el sujeto.
7. La proteína de fusión HJV.Fc para uso según la reivindicación 5, en el que el proceso metabólico del hierro se selecciona del grupo que consiste en captación de hierro, absorción de hierro, transporte de hierro, almacenamiento de hierro, procesamiento de hierro, movilización de hierro, y utilización de hierro.
- 20 8. La proteína de fusión HJV.Fc para uso según la reivindicación 5, en el que el sujeto tiene o presenta riesgo de tener una afección asociada con deficiencia de hierro y en que la regulación del metabolismo del hierro o un proceso metabólico del hierro comprende aumentar el metabolismo del hierro o el proceso metabólico del hierro en el sujeto.
9. La proteína de fusión HJV.Fc para uso según la reivindicación 5, en el que la afección asociada con deficiencia de hierro se selecciona del grupo que consiste en anemia de enfermedad crónica, anemia por deficiencia de hierro, deficiencia de hierro funcional, y anemia microcítica.
- 25 10. Una proteína de fusión HJV.Fc para uso en el tratamiento o prevención de perturbaciones en el metabolismo del hierro o un proceso metabólico del hierro para la prevención o tratamiento de una afección asociada con deficiencia de hierro en un sujeto, en el que la proteína de fusión HJV.Fc es un antagonista de BMP.
11. La proteína de fusión HJV.Fc para uso según la reivindicación 10, en el que
- 30 a) el proceso metabólico del hierro se selecciona del grupo que consiste en captación de hierro, absorción de hierro, transporte de hierro, almacenamiento de hierro, procesamiento de hierro, movilización de hierro, y utilización de hierro,
- b) la administración del compuesto resulta en la regulación de la expresión o actividad de la hepcidina en el sujeto,
- o
- 35 c) el sujeto padece una afección asociada con deficiencia de hierro se selecciona del grupo que consiste en anemia de enfermedad crónica, anemia por deficiencia de hierro, deficiencia de hierro funcional, y anemia microcítica.
12. La proteína de fusión HJV.Fc para uso según la reivindicación 11, parte (c), en el que la enfermedad crónica es un trastorno seleccionado del grupo que consiste en una inflamación, una infección, un trastorno de inmunodeficiencia, y una trastorno neoplásico.
- 40 13. La proteína de fusión HJV.Fc para uso según la reivindicación 10, que comprende además administrar un tratamiento de suplemento de hierro al sujeto.
14. La proteína de fusión HJV.Fc para uso según la reivindicación 13, en el que el tratamiento de suplemento de hierro se selecciona del grupo que consiste en fumarato ferroso, gluconato ferroso, sulfato ferroso, hierro dextrano, hierro polisacárido, hierro sorbitol, gluconato férrico de sodio y hierro sacarosa.
- 45 15. Un método *in vitro* para identificar un compuesto que regula la expresión o actividad de hepcidina en un sistema, en el que el sistema expresa TGF- β o BMP, comprendiendo el método las etapas de: incubar el sistema con un compuesto candidato en condiciones y durante un tiempo suficiente para que el compuesto candidato module la actividad de señalización del TGF- β o BMP, para obtener un sistema de ensayo; medir, en el sistema de ensayo, al menos un factor que sea representativo de la actividad de señalización del TGF- β o BMP; incubar el sistema en las
- 50 mismas condiciones y durante el mismo tiempo sin el compuesto candidato, para obtener un sistema control; medir

el factor en el sistema control; comparar el factor medido en los sistemas de ensayo y control; y determinar que el compuesto candidato regula la expresión o actividad de hepcidina en el sistema, si el factor medido en el sistema de ensayo es menor que o mayor que el factor medido en el sistema control

- 5 16. El método de la reivindicación 15, en el que el sistema es una célula, un fluido biológico, un tejido biológico, o un animal.
17. El método de la reivindicación 15, en el que el sistema expresa TGF- β .
18. El método de la reivindicación 17 en el que, el compuesto candidato aumenta la actividad de señalización de TGF- β y se identifica como un compuesto que inhibe la expresión o actividad de la hepcidina en el sistema.
19. El método de la reivindicación 15, en el que el sistema expresa BMP.
- 10 20. El método de la reivindicación 19, en el que el compuesto candidato inhibe la actividad de señalización de BMP y se identifica como un compuesto que inhibe la expresión o actividad de la hepcidina en el sistema.

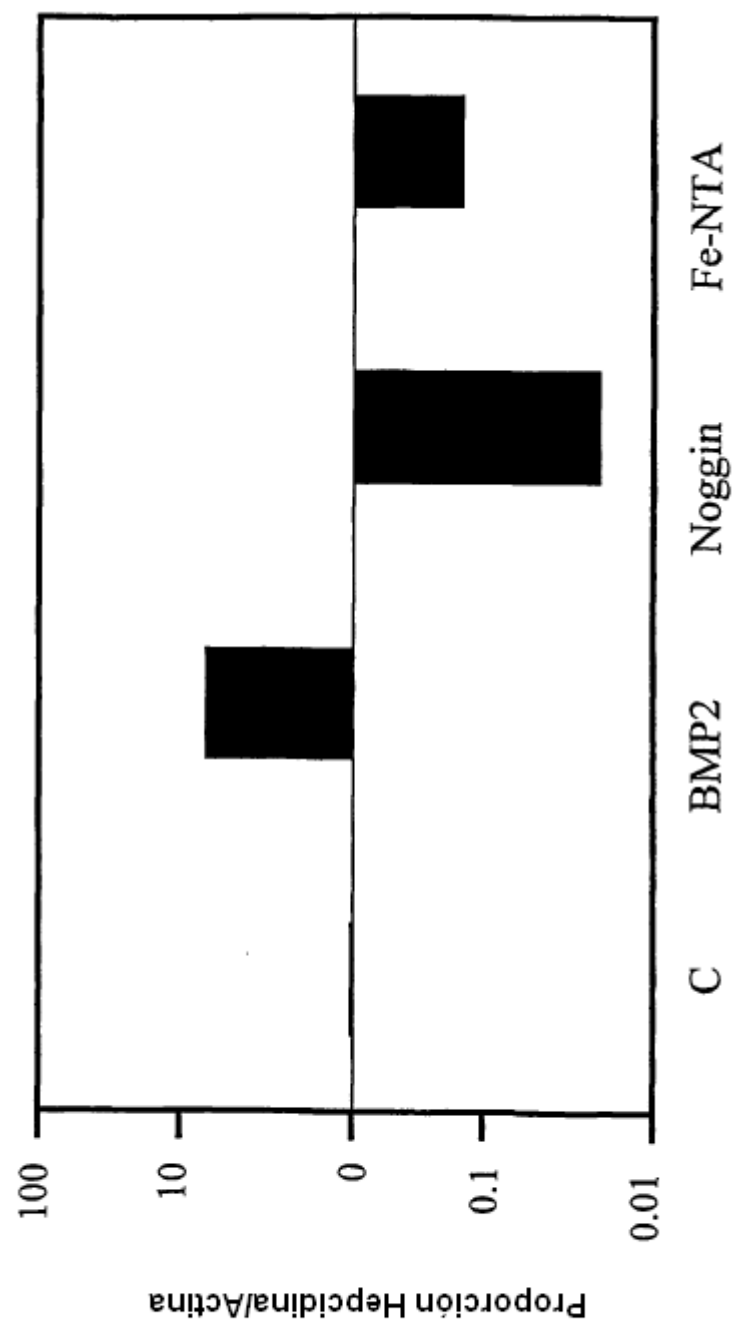


Figura 1

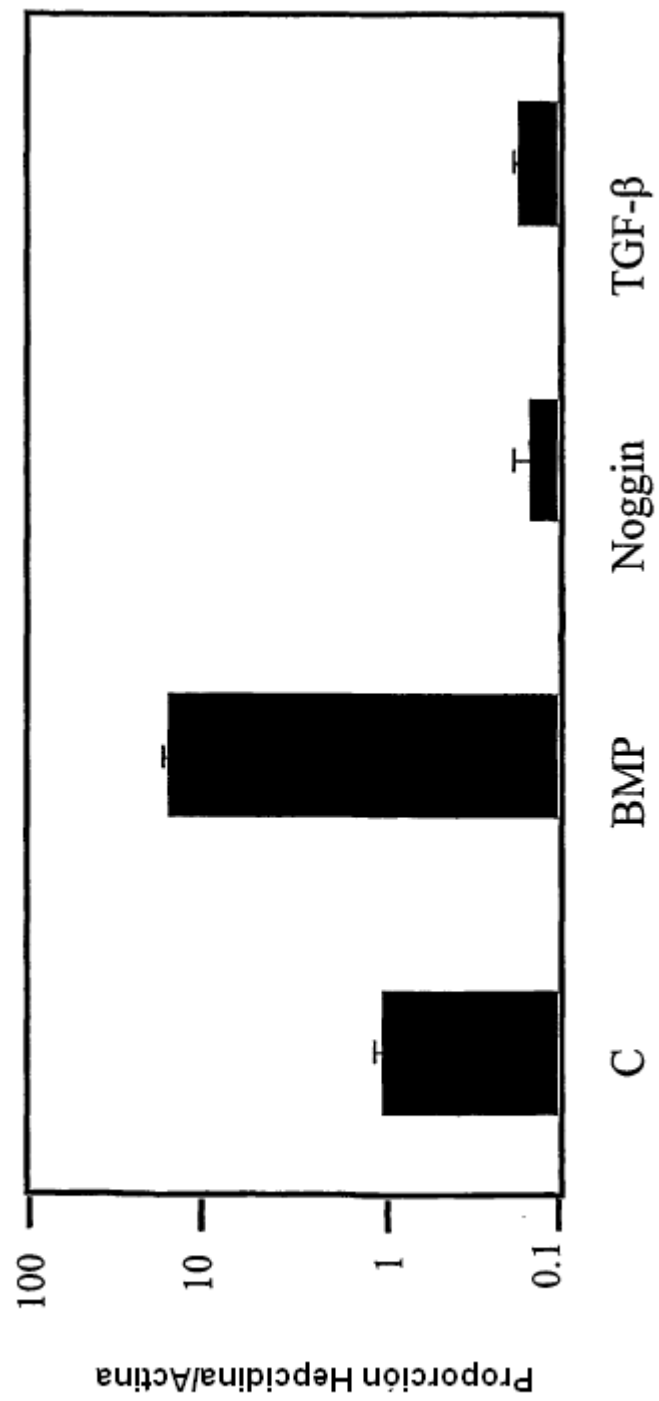


Figura 2

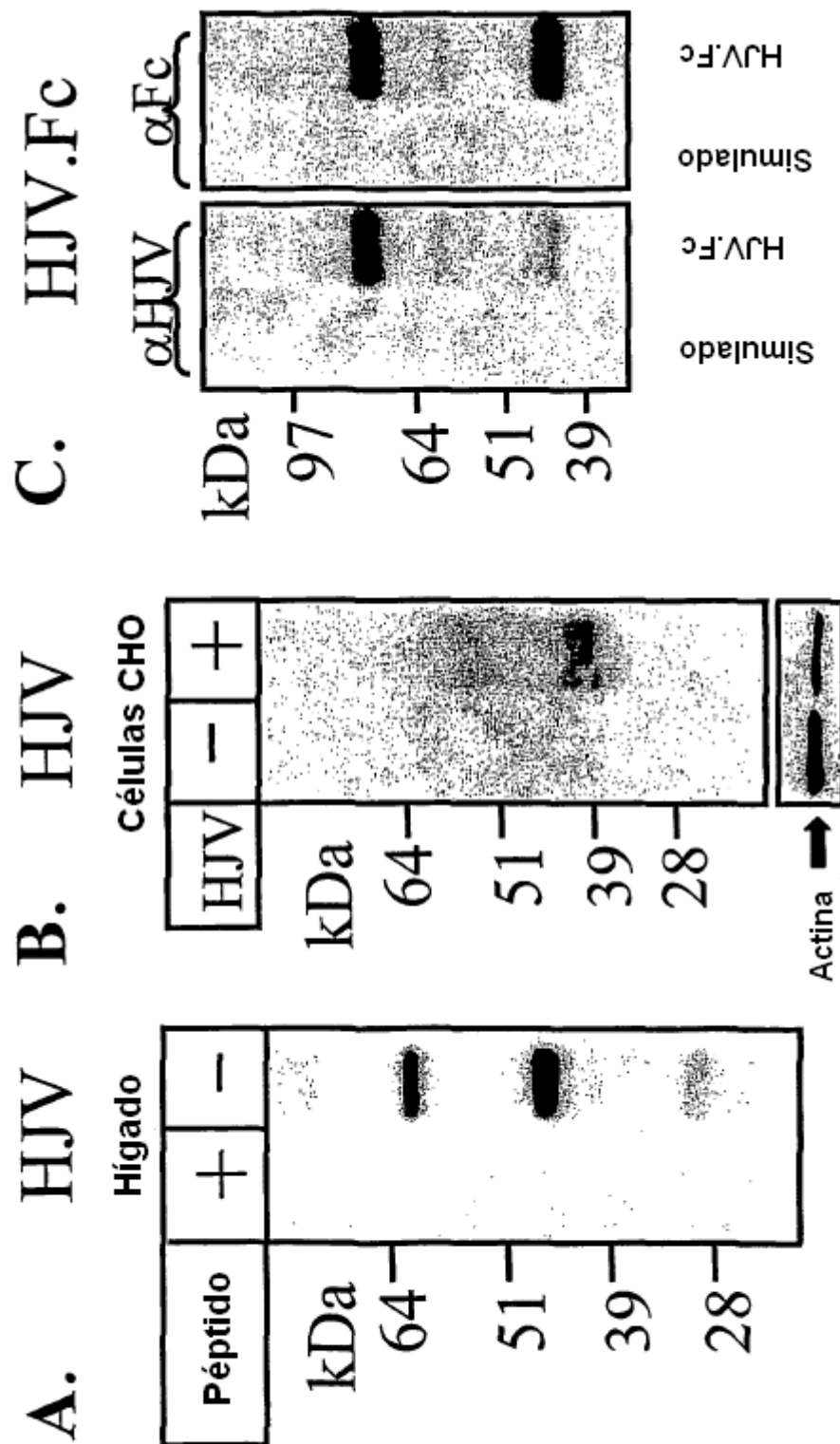


Figura 3

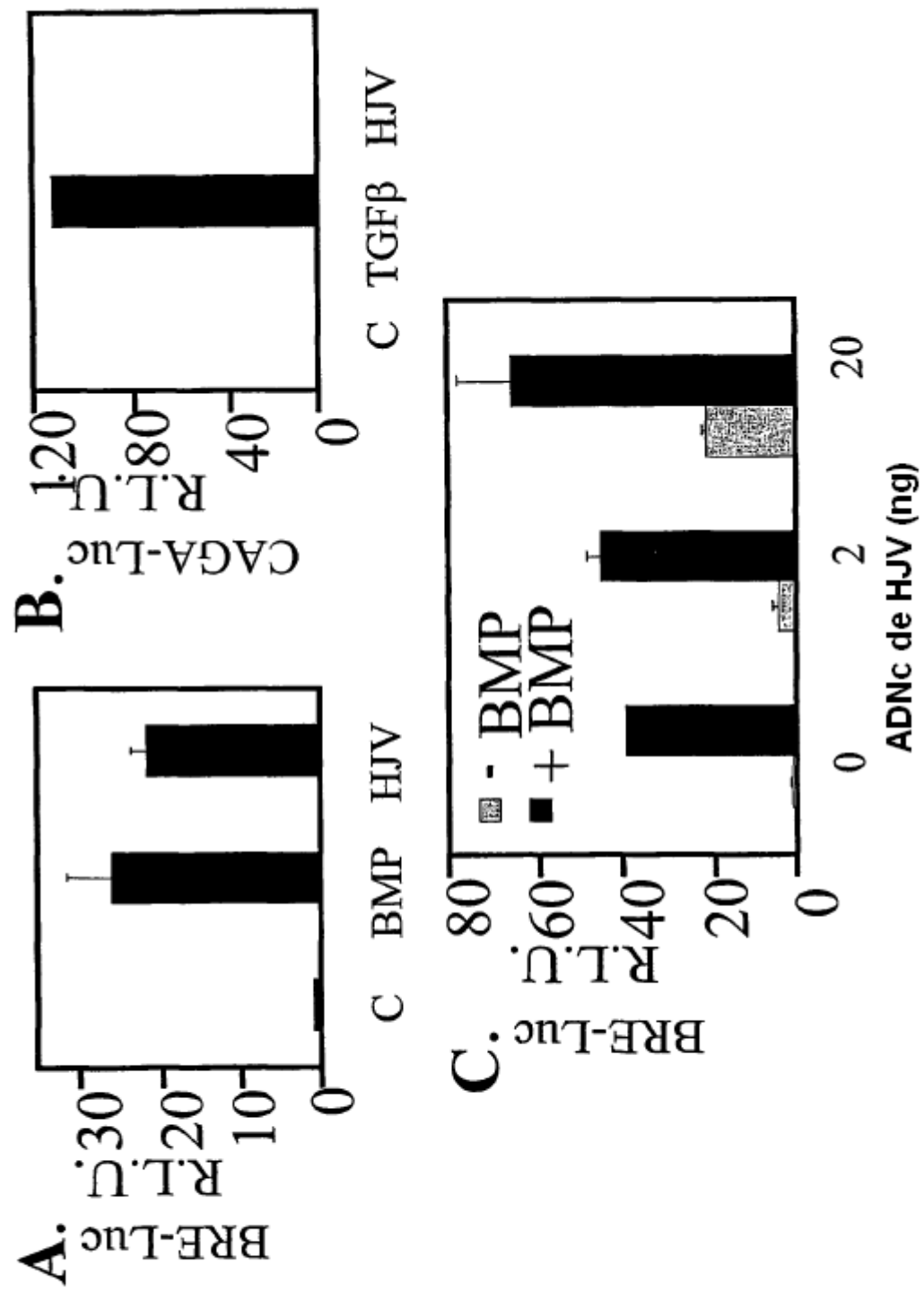


Figura 4

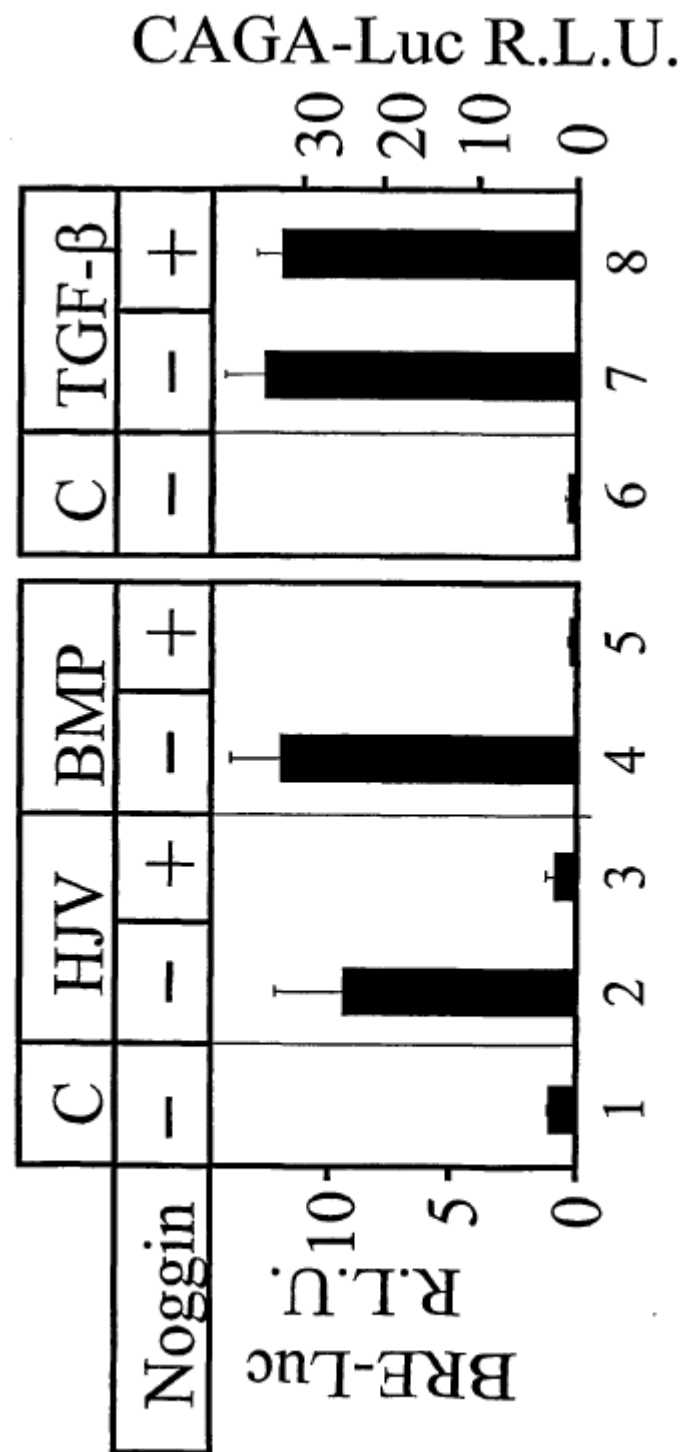


Figura 5

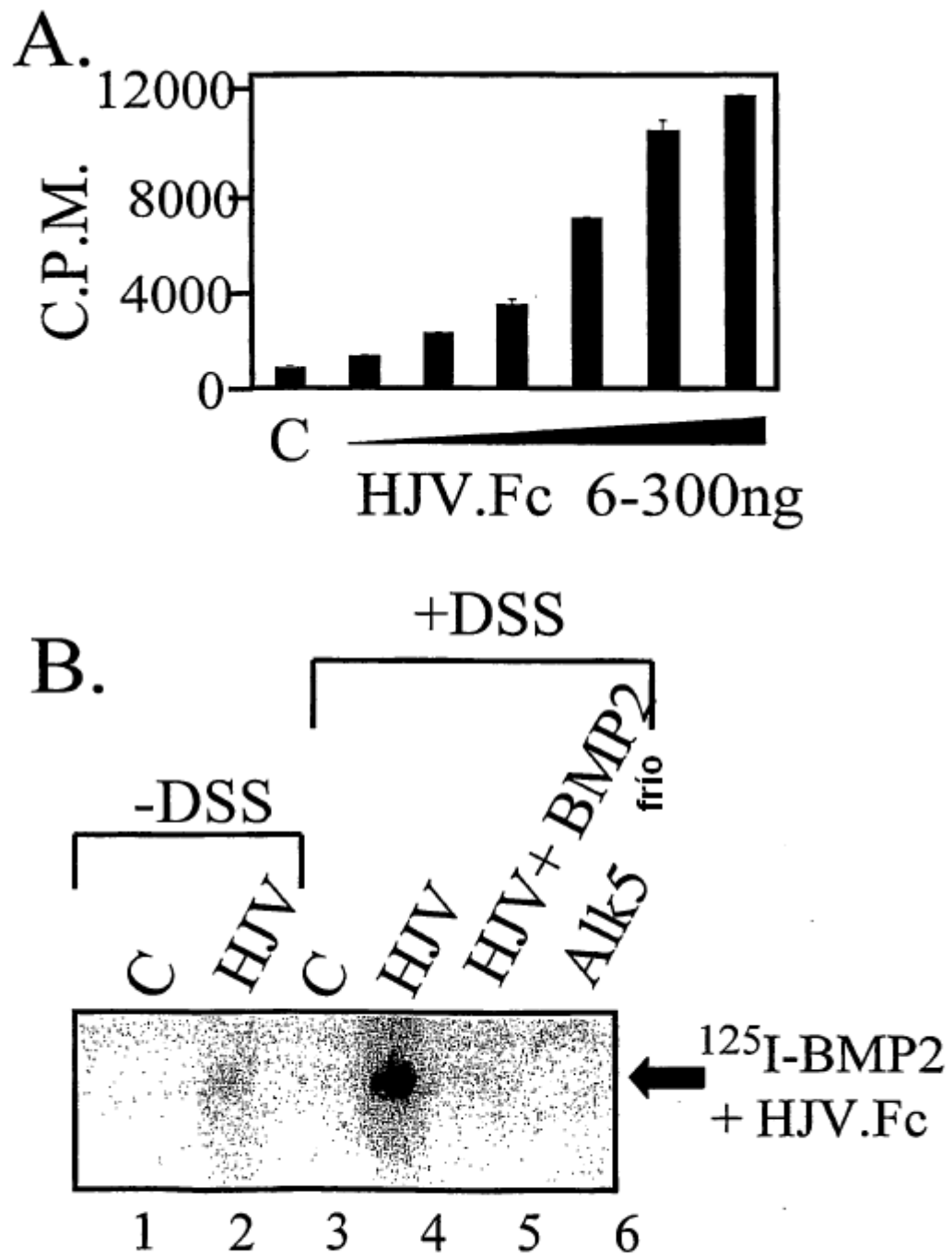


Figura 6

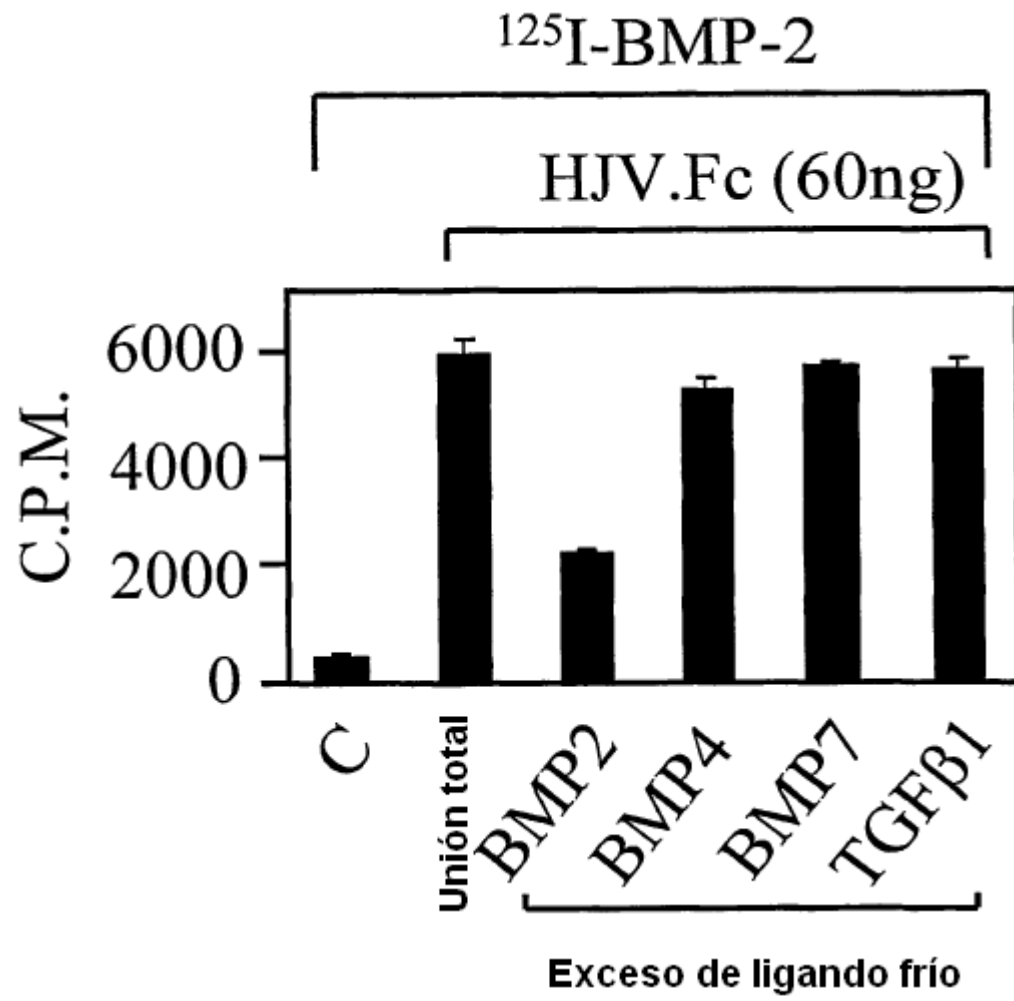


Figura 7

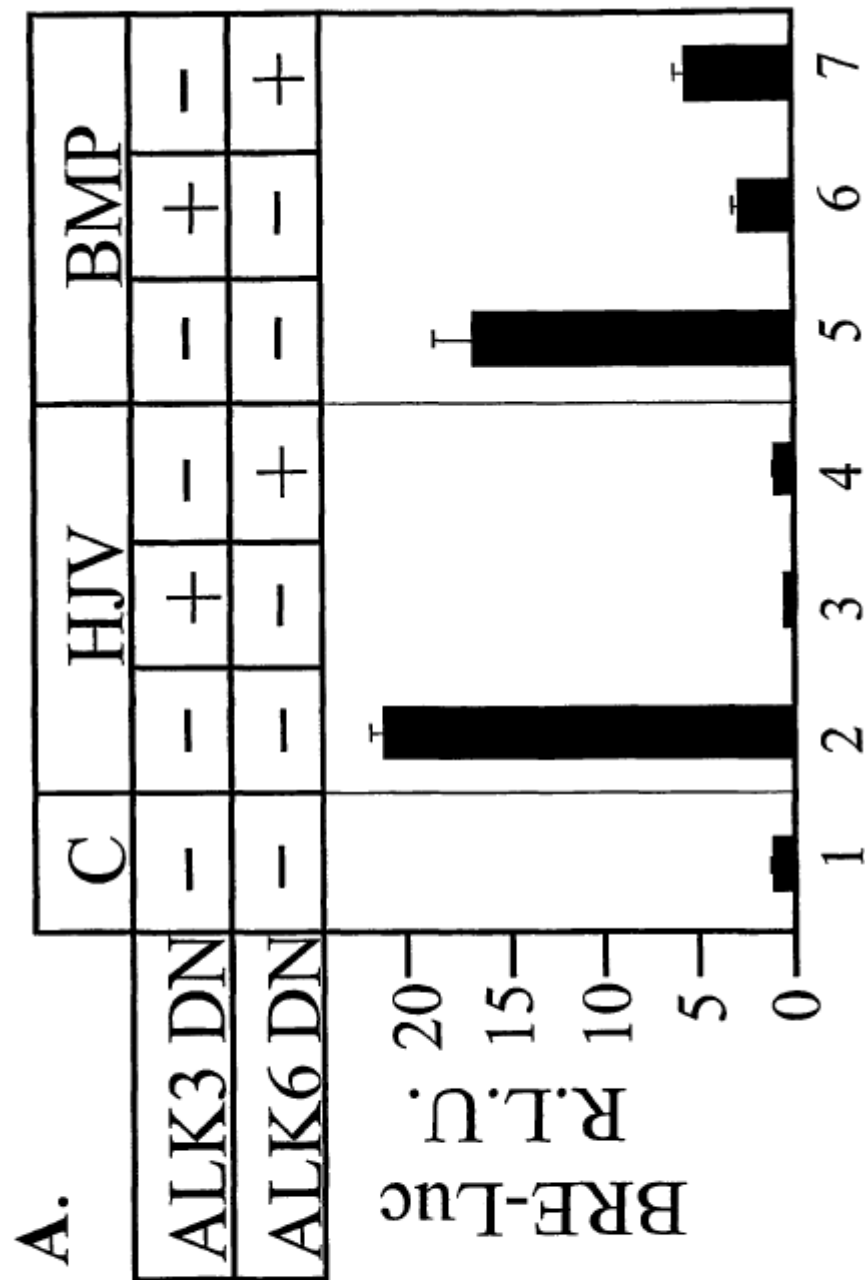


Figura 8(A)

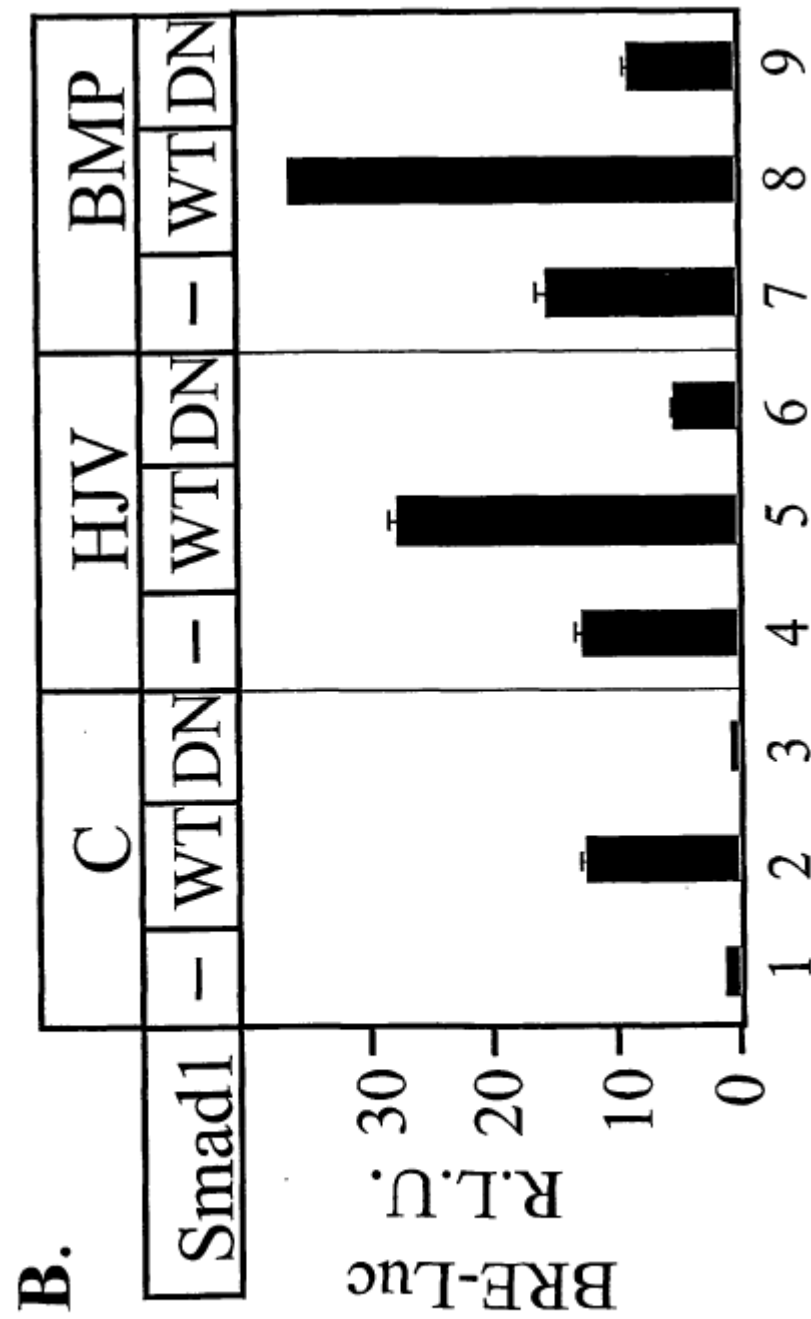


Figura 8(B)

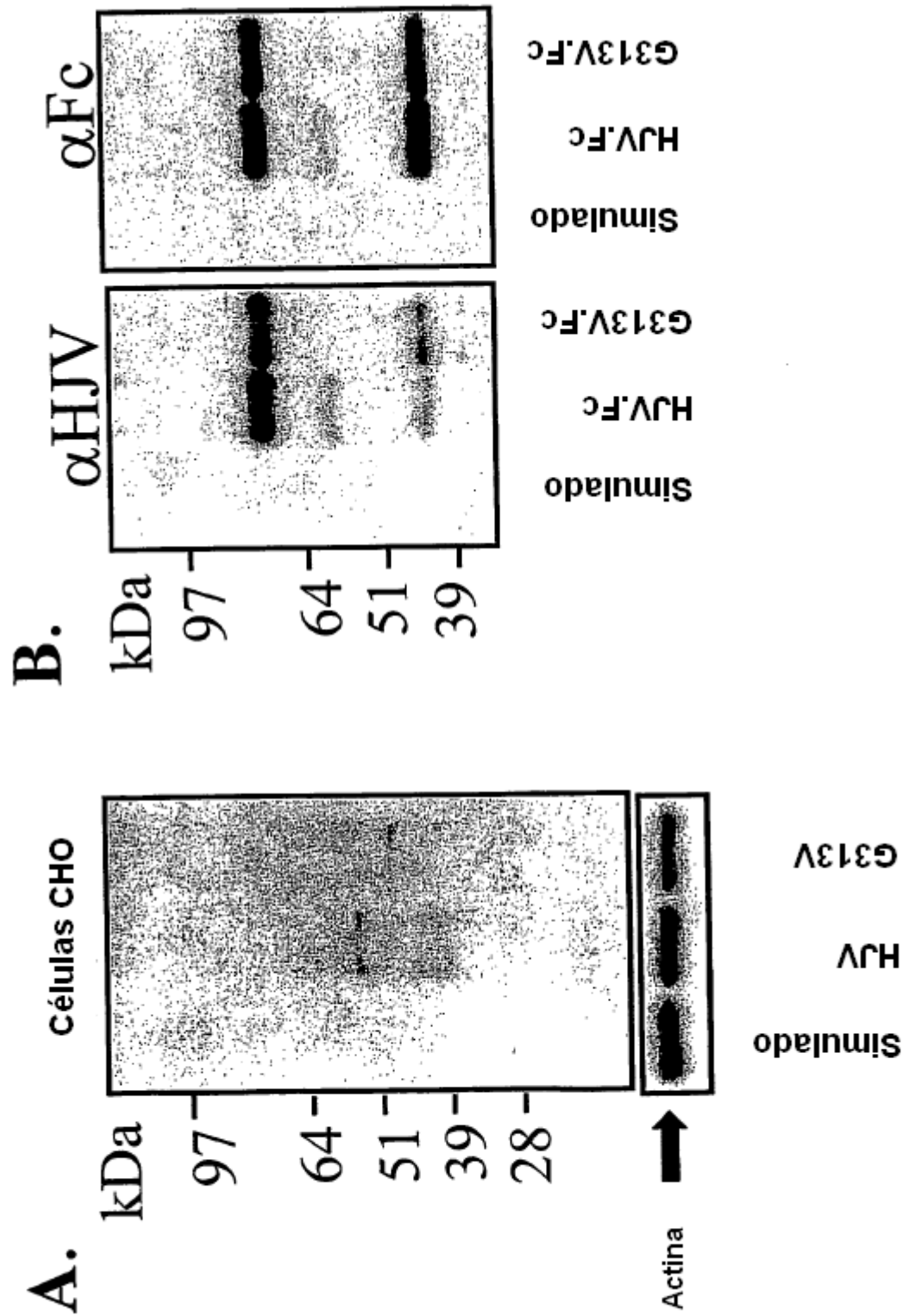


Figura 9

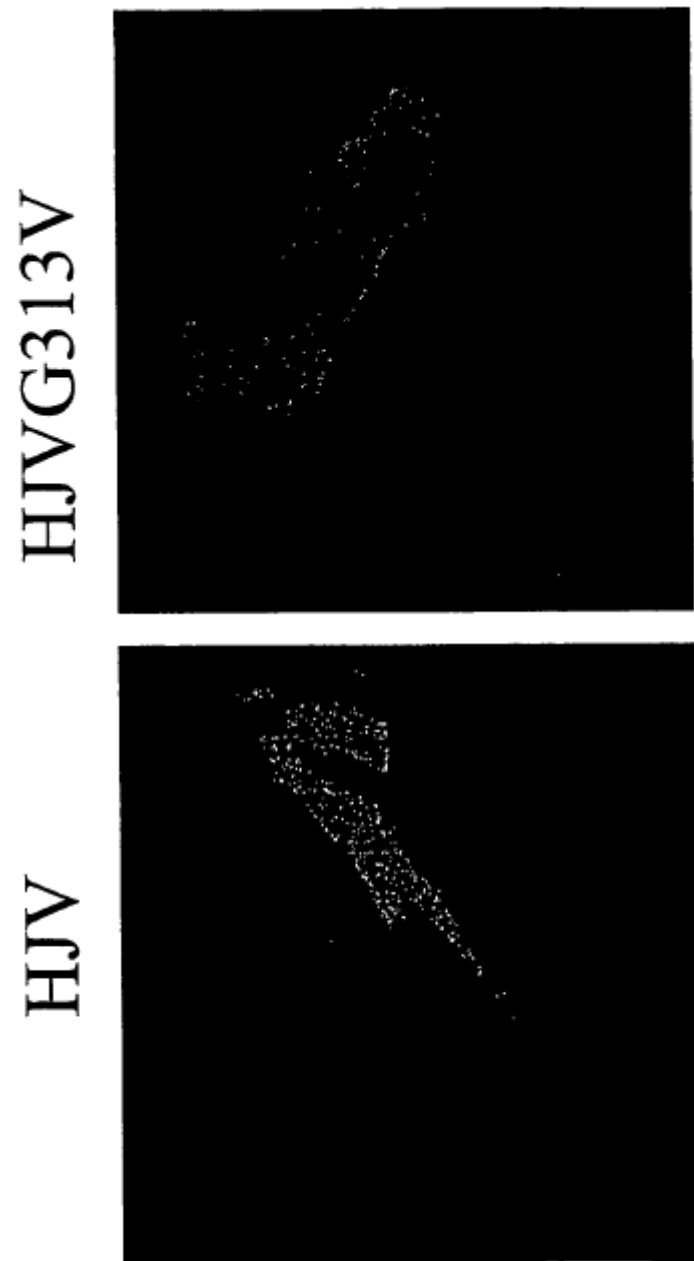


Figura 10

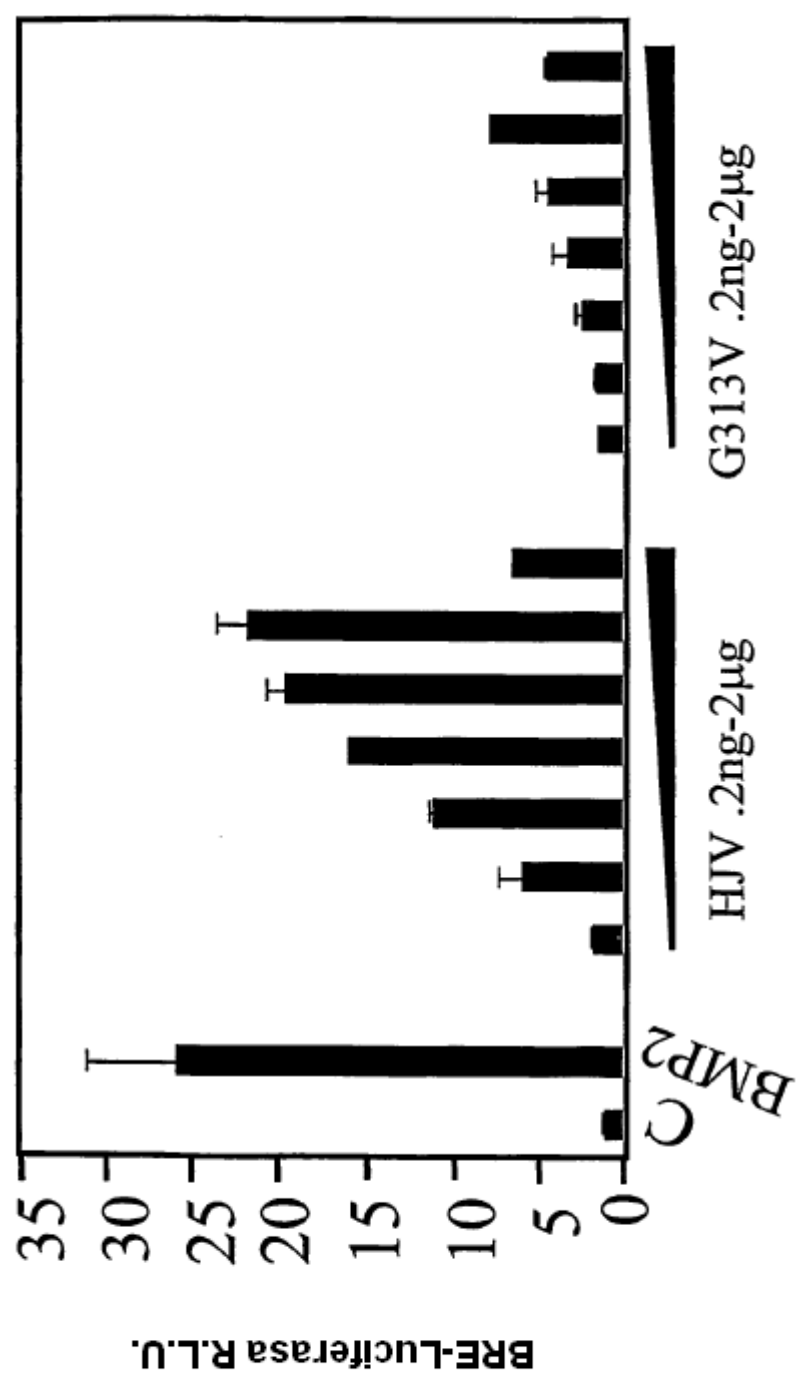


Figura 11

	Hierro Sérico	TIBC	
BMP2 (18 mcg)	114,02	216,80	n= 8 ratones
Vehículo	169,12	249,09	n= 7 ratones
valor p	0,0194	0,0268	

Figura 12

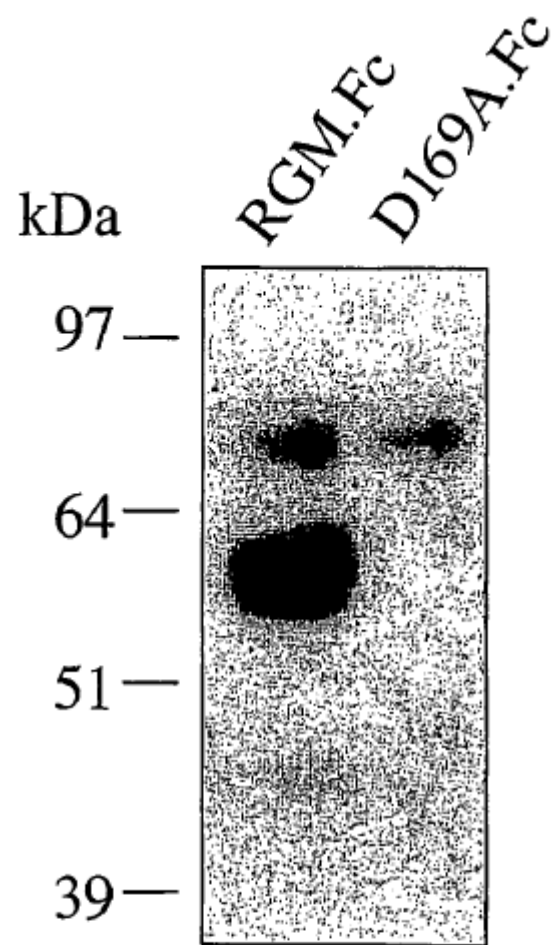


Figura 13

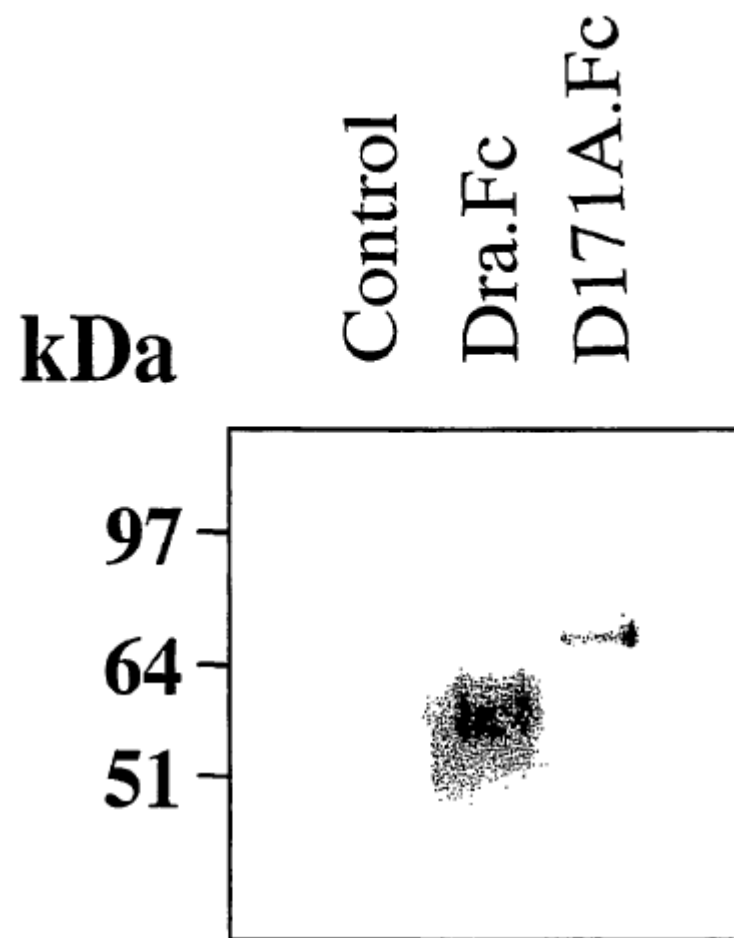


Figura 14

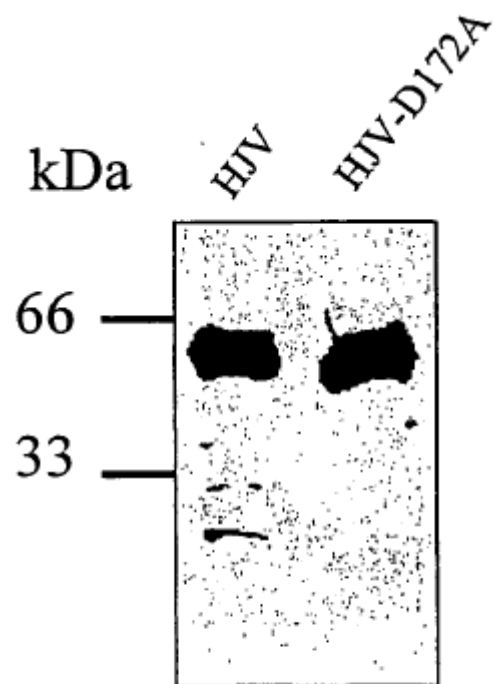


Figura 15