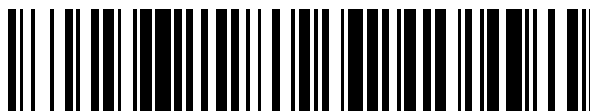


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 543**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2009** **PCT/US2009/004659**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2010** **WO10019261**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2009** **E 09806981 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019** **EP 2340031**

54 Título: **Trampas de GDF para la utilización en el tratamiento de la anemia**

30 Prioridad:

14.08.2008 US 189094 P

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

23.01.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 738 543 T3

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

DESCRIPCIÓN

Trampas de GDF para la utilización en el tratamiento de la anemia

5 **Antecedentes de la invención**

Los glóbulos rojos maduros, o eritrocitos, son responsables del transporte de oxígeno en los sistemas circulatorios de los vertebrados. Los glóbulos rojos transportan concentraciones elevadas de hemoglobina, una proteína que se une al oxígeno en los pulmones a una presión parcial relativamente elevada de oxígeno (pO_2) y suministra oxígeno a zonas del cuerpo con una pO_2 relativamente baja.

Los glóbulos rojos maduros se producen a partir de células madre hematopoyéticas pluripotentes en un proceso denominado eritropoyesis. La eritropoyesis postnatal se produce principalmente en la médula ósea y en la pulpa roja del bazo. La acción coordinada de diversas rutas de señalización controla el equilibrio de proliferación, diferenciación, supervivencia y muerte celulares. Bajo condiciones normales, se producen glóbulos rojos a una tasa que mantiene una masa constante de glóbulos rojos en el cuerpo, y la producción puede incrementarse o reducirse en respuesta a diversos estímulos, incluyendo una tensión de oxígeno o demanda tisular incrementada o reducida. El proceso de la eritropoyesis se inicia con la formación de células precursoras de linaje comprometido y pasa por una serie de tipos celulares precursores diferentes. Las etapas finales de la eritropoyesis se producen al ser liberados reticulocitos al flujo sanguíneo y perder sus mitocondrias y ribosomas, asumiendo simultáneamente la morfología de los glóbulos rojos maduros. Un nivel elevado de reticulocitos, o una proporción elevada de reticulocitos:eritrocitos, en la sangre es indicativo de tasas de producción incrementadas de glóbulos rojos.

La eritropoyetina (Epo) es ampliamente reconocida como el regulador positivo más significativo de la eritropoyesis en vertebrados después del nacimiento. La Epo regula la respuesta eritropoyética compensatoria a una tensión de oxígeno tisular reducida (hipoxia) y a niveles bajos de glóbulos rojos o a niveles bajos de hemoglobina. En el ser humano, los niveles elevados de Epo estimulan la formación de glóbulos rojos mediante la estimulación de la generación de progenitores eritroides en la médula ósea y bazo. En el ratón, la Epo potencia la eritropoyesis principalmente en el bazo.

El médico utiliza diversas formas de Epo recombinante para incrementar los niveles de glóbulos rojos en una diversidad de contextos clínicos y en particular para el tratamiento de la anemia. La anemia es una condición ampliamente definida que se caracteriza por niveles inferiores a los normales de hemoglobina o glóbulos rojos en la sangre. En algunos casos, la anemia está causada por un trastorno primario en la producción o supervivencia de los glóbulos rojos. Más comúnmente, la anemia es secundaria a enfermedades de otros sistemas (Weatherall y Provan, Lancet 355:1169-1175, 2000). La anemia puede resultar de una tasa de producción reducida o de una tasa de destrucción incrementada de los glóbulos rojos, o de la pérdida de glóbulos rojos debida a sangrado. La anemia puede resultar de una diversidad de trastornos, entre los que se incluyen, por ejemplo, la insuficiencia renal crónica, el tratamiento de quimioterapia, el síndrome mielodisplásico, la artritis reumatoide y el trasplante de la médula ósea.

Los tratamientos con Epo típicamente causan una elevación de las hemoglobinas de aproximadamente 1 a 3 g/dl en seres humanos sanos a lo largo de un periodo de semanas. Al administrarlo en individuos anémicos, este régimen de tratamiento con frecuencia proporciona incrementos sustanciales de los niveles de hemoglobina y de glóbulos rojos y conduce a mejoras de la calidad de vida y una supervivencia prolongada. Epo no es uniformemente eficaz y muchos individuos son refractarios a incluso dosis altas (Horl et al., Nephrol. Dial Transplant. 15, 43-50, 2000). Más de 50% de los pacientes con cáncer presenta una respuesta inadecuada a Epo, aproximadamente 10% con enfermedad renal de estadio terminal son hiporrespondedores (Glaspy et al., J. Clin. Oncol. 15, 1218-1234, 1997; Demetri et al., J. Clin. Oncol. 16, 3412-3425, 1998), y menos de 10% con síndrome mielodisplásico responde favorablemente (Estey, Curr. Opin. Hematol. 10, 60-67, 2003). Varios factores, incluyendo inflamación, deficiencia de hierro y vitaminas, diálisis inadecuada, toxicidad del aluminio e hiperparatiroidismo, pueden predecir una respuesta terapéutica insuficiente; los mecanismos moleculares de la resistencia a Epo todavía no están claros.

De esta manera, es un objetivo de la presente exposición proporcionar composiciones y métodos alternativos para incrementar los niveles de glóbulos rojos en el paciente.

Sumario de la invención

La presente invención se define mediante las reivindicaciones.

En un primer aspecto, la invención proporciona un polipéptido ActRIIB variante que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEC ID nº 1, comprende ácido glutámico o ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de SEC ID nº 1 e inhibe la señalización por miostatina y/o GD-FF en un ensayo celular para la utilización en un método de incremento de los niveles de glóbulos rojos o en un método de tratamiento de una anemia en un paciente que lo requiere.

La invención proporciona además una preparación farmacéutica que comprende un polipéptido según el primer aspecto de la invención para la utilización según el primer aspecto de la invención.

- 5 En la presente memoria se da a conocer una célula en cultivo que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido según el primer aspecto de la invención.

En parte, la exposición demuestra que pueden utilizarse trampas de GDF para incrementar los niveles de glóbulos rojos y de hemoglobina. Los polipéptidos ActRIIB variantes que presentan una afinidad significativamente reducida para activina (p.ej., activina A y/o activina B) respecto a otros ligandos de ActRIIB, tales como GDF11 y/o miostatina, se denominan trampas de GDF. Las variantes de ActRIIB indicadas en la presente memoria son trampas de GDF, a menos que se indique lo contrario. En particular, la exposición demuestra que una trampa de GDF que es una forma soluble del polipéptido ActRIIB que presenta un residuo ácido en la posición 79 de SEC ID nº 1, al administrarla *in vivo*, incrementa los niveles de glóbulos rojos en la sangre. Por lo tanto, la exposición proporciona métodos para utilizar trampas de GDF para incrementar los niveles de glóbulos rojos y de hemoglobina en los pacientes y para tratar trastornos asociados a niveles bajos de glóbulos rojos o de hemoglobina en pacientes que lo necesitan. Tal como se indica en la solicitud de patente US nº 12/012.652, pueden utilizarse trampas de GDF para incrementar la masa muscular y reducir la masa adiposa.

La presente exposición proporciona trampas de GDF que son polipéptidos ActRIIB variantes, incluyendo polipéptidos ActRIIB que presentan truncados aminoterminales y carboxiterminales y alteraciones de la secuencia. Opcionalmente, pueden diseñarse trampas de GDF para antagonizar preferentemente uno o más ligandos de receptores de ActRIIB, tales como GDF8 (también denominado miostatina), GDF11, Nodal y BMP7 (también denominado OP-1). Entre los ejemplos de trampas de GDF se incluyen un grupo de variantes derivadas de ActRIIB que presentan una afinidad muy disminuida para la activina. Estas variantes muestran efectos deseables sobre los glóbulos rojos, reduciendo simultáneamente los efectos sobre otros tejidos. Entre los ejemplos de tales variantes se incluyen las que presentan un aminoácido ácido (p.ej., ácido aspártico, D, o ácido glutámico, E) en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEC ID nº 1. El polipéptido trampa de GDF para la utilización en la invención comprende una secuencia de aminoácidos que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 7, 28, 29, 32, 37 o 38, y polipéptidos que son por lo menos 95%, 97%, 98% o 99% idénticos a cualquiera de los anteriores. Otros polipéptidos trampa de GDF dados a conocer en la presente memoria comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende, consiste en o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 26, y polipéptidos que son por lo menos 95%, 97%, 98% o 99% idénticos a la SEC ID nº 26.

La exposición proporciona preparaciones farmacéuticas que comprenden una trampa de GDF que se une a un ligando de ActRIIB, tal como GDF8, GDF11, activina (p.ej., activina B), BMP7 o nodal, y un portador farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, la trampa de GDF se une a un ligando de ActRIIB con una Kd inferior a 10 micromolar, inferior a 1 micromolar, inferior a 100 nanomolar, inferior a 10 nanomolar o inferior a 1 nanomolar. Opcionalmente, la trampa de GDF inhibe la señalización de ActRIIB, tal como sucesos de transducción de señales intracelulares inducidos por un ligando de ActRIIB. Una trampa de GDF para la utilización en dicha preparación puede ser cualquiera de las dadas a conocer en la presente memoria, por ejemplo, trampas de GDF que presentan una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEC ID nº 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 o 40, o trampas de GDF que presentan una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEC ID nº 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 o 40, o trampas de GDF que presentan una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEC ID nº 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 o 40, en la que la posición correspondiente a L79 en la SEC ID nº 1 es un aminoácido ácido. Una trampa de GDF preferente para la utilización en dicha preparación consiste en, o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 26. Una trampa de GDF puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido ActRIIB natural, tal como uno que comprende por lo menos 10, 20 o 30 aminoácidos de una secuencia seleccionada de las SEC ID nº 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 o 40 o una secuencia SEC ID nº 2, que no presenta los 1, 2, 3, 4, 5 o 10 a 15 aminoácidos C-terminales y que no presenta 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos en el extremo N-terminal. Un polipéptido preferente comprenderá un truncado respecto a la SEC ID nº 2 o 40 de entre 2 y 5 aminoácidos en el extremo N-terminal y no más de 3 aminoácidos en el extremo C-terminal. Una trampa de GDF puede incluir una o más alteraciones de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActRIIB (p.ej., en el dominio de unión a ligando) respecto a un polipéptido ActRIIB natural. La alteración de la secuencia de aminoácidos puede, por ejemplo, alterar la glucosilación del polipéptido al producirlo en una célula de mamífero, insecto u otra célula eucariótica, o alterar el corte proteolítico del polipéptido respecto al polipéptido ActRIIB natural.

Una trampa de GDF puede ser una proteína de fusión que presenta, como un dominio, un polipéptido ActRIIB (p.ej., un dominio de unión a ligando de un ActRIIB con una o más variaciones de secuencia) y uno o más dominios adicionales que proporcionan una propiedad deseada, tal como una farmacocinética mejorada, una purificación más sencilla, el transporte dirigido a tejidos particulares, etc. Por ejemplo, un dominio de una proteína de fusión puede potenciar uno o más de estabilidad *in vivo*, semivida *in vivo*, incorporación/administración, localización o distribución en tejidos, formación de complejos proteicos, multimerización de la proteína de fusión, y/o purificación. Las proteínas de fusión de trampa de GDF pueden incluir un dominio Fc de inmunoglobulina (de tipo salvaje o mutante) o una albúmina sérica. Una fusión de trampa de GDF comprende un conector relativamente no estructurado situado entre el

dominio Fc y el dominio de ActRIIB extracelular. Dicho conector no estructurado puede corresponder a aproximadamente la región no estructurada de 15 aminoácidos en el extremo C-terminal del dominio extracelular de ActRIIB (la "cola") o puede ser una secuencia artificial de entre 3 y 5, 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos que se encuentran relativamente libres de estructura secundaria. Un conector puede ser rico en residuos de glicina y prolina y puede, por ejemplo, contener secuencias repetitivas de treonina/serina y glicinas (p.ej., singuletes o repeticiones de TG₄ o SG₄) o una serie de tres glicinas. Una proteína de fusión puede incluir una subsecuencia de purificación, tal como una etiqueta de purificación, una etiqueta FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión de GST. Una fusión de trampa de GDF comprende una secuencia líder. La secuencia líder puede ser una secuencia líder de ActRIIB nativo o una secuencia líder heteróloga. En determinadas realizaciones, la secuencia líder es una secuencia líder de activador del plasminógeno tisular (APT). Una proteína de fusión de trampa de GDF puede comprender una secuencia de aminoácidos tal como se indica en la fórmula A-B-C. La parte B es un polipéptido ActRIIB truncado N-terminalmente y C-terminalmente que consiste en la secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 25 a 131 de la SEC ID n° 2 o 40. Las partes A y C pueden ser independiente de cero, uno o más de un aminoácido, y ambas partes, A y C, son heterólogas respecto a B. Las partes A y/o C pueden unirse a la parte B mediante una secuencia conectora.

Opcionalmente, una trampa de GDF incluye un polipéptido ActRIIB variante que presenta uno o más residuos aminoácidos modificados seleccionados de: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con una fracción lípido y un aminoácido conjugado con un agente derivatizante orgánico. Una preparación farmacéutica puede incluir además uno o más compuestos adicionales, tales como un compuesto que se utiliza para tratar un trastorno asociado a ActRIIB. Preferentemente, una preparación farmacéutica se encuentra sustancialmente libre de pirógenos. En general, resulta preferible que una trampa de GDF se exprese en una línea celular de mamífero que media en una glucosilación convenientemente natural de la trampa de GDF, de manera que se reduzca la probabilidad de una respuesta inmunológica desfavorable en un paciente. Las líneas celulares humanas y de CHO se han utilizado con éxito, y se espera que resultarán útiles otros vectores de expresión de mamífero comunes.

La exposición proporciona farmacéuticos envasados que comprenden una preparación farmacéutica indicada en la presente memoria y marcados para la utilización en el incremento de los niveles de glóbulos rojos en un ser humano.

La exposición proporciona trampas de GDF que son polipéptidos ActRIIB solubles que comprenden un dominio de unión a ligando alterado (p.ej., unión a GDF8). Las trampas de GDF con dominios de unión a ligando alterados pueden comprender, por ejemplo, una o más mutaciones en residuos aminoácidos tales como E37, E39, R40, K55, R56, Y60, A64, K74, W78, L79, D80, F82 y F101 de ActRIIB humano (la numeración es respecto a la SEC ID n° 1). Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado puede presentar una selectividad incrementada para un ligando, tal como GDF8/GDF11 respecto a un dominio de unión a ligando de tipo salvaje de un receptor de ActRIIB. A título ilustrativo, estas mutaciones se demuestran en la presente memoria que incrementan la selectividad del dominio de unión a ligando alterado para GDF11 (y, por lo tanto, presumiblemente, GDF8) respecto a la activina: K74Y, K74F, K74I, L79D, L79E y D80I. Las mutaciones siguientes presentan el efecto inverso, incrementando la proporción de unión a activina respecto a GDF11: D54A, K55A, L79A y F82A. La actividad de unión global (GDF11 y activina) puede incrementarse mediante la inclusión de la región "de cola" o, presumiblemente, una región conectora no estructurada, y también mediante la utilización de una mutación K74A. Entre otras mutaciones que causan una reducción global de la afinidad de unión a ligando se incluyen: R40A, E37A, R56A, W78A, D80K, D80R, D80A, D80G, D80F, D80M y D80N. Pueden combinarse mutaciones para conseguir efectos deseados. Por ejemplo, muchas de las mutaciones que afectan a la proporción de unión de GDF11:activina presentan un efecto global negativo sobre la unión de ligando y, por lo tanto, estos pueden combinarse con mutaciones que generalmente incrementan la unión de ligando para producir una proteína de unión mejorada con selectividad de ligando. Una trampa de GDF puede ser un polipéptido ActRIIB que comprende una mutación L79D o L79E, opcionalmente en combinación con sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos adicionales.

Opcionalmente, una trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando alterado presenta una proporción de K_d para la unión de activina a K_d para la unión de GDF8 que es por lo menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces superior a la proporción para el dominio de unión a ligando de tipo salvaje. Opcionalmente, la trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando alterado presenta una proporción de IC₅₀ para la inhibición de la actividad a IC₅₀ para la inhibición de GDF8/GDF11 que es por lo menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces superior respecto al dominio de unión a ligando de ActRIIB de tipo salvaje. Opcionalmente, la trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando alterado inhibe GDF8/GDF11 con una IC₅₀ por lo menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces inferior a la IC₅₀ para la inhibición de la activina. Estas trampas de GDF pueden ser proteínas de fusión que incluyen un dominio Fc de inmunoglobulina (de tipo salvaje o mutante). En determinados casos, las trampas de GDF solubles de la invención son antagonistas (inhibidores) de GDF8 y/o GDF11.

Se encuentran contempladas otras trampas de GDF, tales como las siguientes. Una proteína de fusión de trampa de GDF que comprende una parte derivada de la secuencia de ActRIIB de SEC ID n° 1 o 39 y una segunda parte de polipéptido, en la que la parte derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que se inicia en cualquiera de los aminoácidos 21 a 29 de la SEC ID n° 1 o 39 (opcionalmente iniciada en 22-25 de la SEC ID n° 1 o 39) y que termina en cualquiera de los aminoácidos 109 a 134 de la SEC ID n° 1 o 39, y en la que la proteína de fusión de trampa de GDF inhibe la señalización por la activina, miostatina y/o GDF11 en un ensayo celular. La proteína de fusión de trampa

de GDF, anteriormente, en la que la parte derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que se inicia en cualquiera de los aminoácidos 20 a 29 de la SEC ID nº 1 o 39 (opcionalmente iniciada en 22-25 de la SEC ID nº 1 o 39) y que termina en cualquiera de los aminoácidos 109 a 133 de la SEC ID nº 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF, anteriormente, en la que la parte derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que se inicia en cualquiera de los aminoácidos 20 a 24 de la SEC ID nº 1 o 39 (opcionalmente iniciada en 22-25 de la SEC ID nº 1 o 39) y que termina en cualquiera de los aminoácidos 109 a 133 de la SEC ID nº 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF, anteriormente, en la que la parte derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que se inicia en cualquiera de los aminoácidos 21 a 24 de la SEC ID nº 1 o 39) y que termina en cualquiera de los aminoácidos 109 a 134 de la SEC ID nº 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF, anteriormente, en la que la parte derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que se inicia en cualquiera de los aminoácidos 118 a 133 de la SEC ID nº 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF, anteriormente, en la que la parte derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que se inicia en cualquiera de los aminoácidos 21 a 24 de la SEC ID nº 1 o 39) y que termina en cualquiera de los aminoácidos 118 a 134 de la SEC ID nº 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF, anteriormente, en la que la parte derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que se inicia en cualquiera de los aminoácidos 20 a 24 de la SEC ID nº 1 o 39) y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128 a 133 de la SEC ID nº 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF, anteriormente, en la que la parte derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que se inicia en cualquiera de los aminoácidos 20 a 24 de la SEC ID nº 1 o 39) y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128 a 133 de la SEC ID nº 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF, anteriormente, en la que la parte derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que se inicia en cualquiera de los aminoácidos 21 a 29 de la SEC ID nº 1 o 39) y que termina en cualquiera de los aminoácidos 118 a 134 de la SEC ID nº 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF, anteriormente, en la que la parte derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que se inicia en cualquiera de los aminoácidos 21 a 29 de la SEC ID nº 1 o 39) y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128 a 134 de la SEC ID nº 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF, anteriormente, en la que la parte derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que se inicia en cualquiera de los aminoácidos 20 a 29 de la SEC ID nº 1, y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128 a 133 de la SEC ID nº 1 o 39. Inesperadamente, los constructos que se inician en 22-25 de la SEC ID nº 1 o 39 presentan niveles de actividad superiores a las proteínas que presentan el dominio extracelular completo de ActRIIB humano. Las proteínas de fusión de GDF dados a conocer en la presente memoria pueden comprender, consistir esencialmente en, o consistir en, una secuencia de aminoácidos que se inicia en el aminoácido 25 de la SEC ID nº 1 o 39 y que termina en la posición aminoácida 131 de la SEC ID nº 1 o 39. En realizaciones preferentes, el polipéptido trampa de GDF para la utilización en la invención consiste en, o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 7, 28, 29, 32, 37 o 38. En otros ejemplos dados a conocer en la presente memoria, el polipéptido trampa de GDF consiste en, o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 26. Cualquiera de las proteínas de fusión de trampa de GDF anteriores puede producirse en forma de un homodímero. Cualquiera de las proteínas de fusión de trampa de GDF anteriores puede presentar una parte heteróloga que comprende una región constante de una cadena pesada de IgG, tal como un dominio Fc. Cualquiera de las proteínas de fusión de trampa de GDF anteriores puede comprender un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEC ID nº 1, opcionalmente en combinación con una o más sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos adicionales respecto a la SEC ID nº 1.

Se encuentran contempladas otras proteínas trampas de GDF, tales como las siguientes. Una proteína trampa de GDF que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos 29 a 109 de la SEC ID nº 1 o 39, en la que la posición correspondiente a 64 de la SEC ID nº 1 es una R o K, y en la que la proteína trampa de GDF inhibe la señalización por la activina, miostatina y/o GDF11 en un ensayo celular. La proteína trampa de GDF anterior, en la que por lo menos una alteración con respecto a la secuencia SEC ID nº 1 o 39 se encuentra situada fuera del bolsillo de unión de ligando. La proteína trampa de GDF anterior, en la que por lo menos una alteración con respecto a la secuencia SEC ID nº 1 o 39 es una alteración conservadora situada dentro del bolsillo de unión de ligando. La proteína trampa de GDF anterior, en la que por lo menos una alteración con respecto a la secuencia SEC ID nº 1 o 39 es una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en K74, R40, Q53, K55, F82 y L79. La proteína trampa de GDF anterior, en la que la proteína comprende por lo menos una secuencia N-X-S/T en una posición diferente de una secuencia N-X-S/T endógena de ActRIIB, y una posición fuera del bolsillo de unión de ligando.

Se encuentran contempladas otras trampas de GDF, tales como las siguientes. Una proteína trampa de GDF que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos 29 a 109 de la SEC ID nº 1 o 39, y en la que la proteína comprende por lo menos una secuencia N-X-S/T en una posición diferente de una secuencia N-X-S/T endógena de ActRIIB, y una posición fuera del bolsillo de unión de ligando. La trampa de GDF anterior, en la que la proteína trampa de GDF comprende una N en la posición correspondiente a la posición 24 de la SEC ID nº 1 o 39, y una S o T en la posición correspondiente a la posición 26 de la SEC ID nº 1 o 39, y en la que la trampa de GDF inhibe la señalización de la activina, miostatina y/o GDF11 en un ensayo celular. La trampa de GDF anterior, en la que la proteína trampa de GDF comprende una R o K en la posición correspondiente a la posición 64 de la SEC ID nº 1 o 39. La trampa de GDF anterior, en la que la proteína ActRIIB comprende una D o E en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEC ID nº 1 o 39, y en la que la trampa de GDF inhibe la señalización de la activina, miostatina y/o GDF11 en un ensayo celular. La proteína trampa de GDF anterior, en la que

por lo menos una alteración con respecto a la secuencia SEC ID nº 1 o 39 es una alteración conservadora situada dentro del bolsillo de unión de ligando. La proteína trampa de GDF anterior, en la que por lo menos una alteración con respecto a la secuencia SEC ID nº 1 o 39 es una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en K74, R40, Q53, K55, F82 y L79. La trampa de GDF anterior, en la que la proteína es una proteína de fusión que comprende además una parte heteróloga. Cualquiera de las proteínas de fusión de trampa de GDF anteriores puede producirse en forma de un homodímero. Cualquiera de las proteínas de fusión de trampa de GDF anteriores puede presentar una parte heteróloga que comprende una región constante de una cadena pesada de IgG, tal como un dominio Fc.

La exposición puede proporcionar ácidos nucleicos codificantes de un polipéptido trampa de GDF. Un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia codificante para un polipéptido trampa de GDF soluble, tal como se ha indicado anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia codificante de una trampa de GDF que comprende un dominio extracelular (p.ej., un dominio de unión a ligando) de un polipéptido ActRIIB que presenta una o más variaciones de secuencia y una secuencia que codificaría para parte o todo el dominio transmembrana y/o el dominio citoplasmático de un polipéptido ActRIIB, excepto por un codón de parada situado dentro del dominio transmembranal o el dominio citoplasmático, o situado entre el dominio extracelular y el dominio transmembranal o dominio citoplasmático. Por ejemplo, un polinucleótido aislado codificante para una trampa de GDF puede comprender un polinucleótido ActRIIB de longitud completa, tal como SEC ID nº 4 que presenta una o más variaciones, o una versión parcialmente truncada, comprendiendo además dicho polinucleótido aislado un codón de terminación transcripcional por lo menos seiscientos nucleótidos antes del extremo 3'-terminal o de otro modo situado de manera que la traducción del polinucleótido da lugar a un dominio extracelular fusionado opcionalmente con una parte truncada de un ActRIIB de longitud completa. Los ácidos nucleicos dados a conocer en la presente memoria pueden encontrarse operablemente ligados a un promotor para la expresión, y la exposición proporciona células transformadas con dichos polinucleótidos recombinantes. Preferentemente, la célula es una célula de mamífero, tal como una célula CHO.

La exposición puede proporcionar métodos para producir un polipéptido trampa de GDF. Dicho método puede incluir la expresión de cualquiera de los ácidos nucleicos (p.ej., SEC ID nº 5, 25, 27, 30 o 31) dados a conocer en la presente memoria en una célula adecuada, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO). Dicho método puede comprender: a) cultivar una célula bajo condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido trampa de GDF, en la que dicha célula se transforma con un constructo de expresión de trampa de GDF, y b) recuperar el polipéptido de trampa de GDF expresado de esta manera. Los polipéptidos trampa de GDF pueden recuperarse en forma de fracciones en bruto parcialmente purificadas o altamente purificadas utilizando cualquiera de las bien conocidas técnicas para la obtención de proteínas a partir de cultivos celulares.

Puede utilizarse un polipéptido trampa de GDF dado a conocer en la presente memoria en un método para estimular la producción de glóbulos rojos o incrementar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto. La exposición proporciona métodos para tratar un trastorno asociado a recuentos bajos de glóbulos rojos o niveles bajos de hemoglobina (p.ej., una anemia) o para estimular la producción de glóbulos rojos, en pacientes que lo necesitan. Un método puede comprender la administración en un sujeto que lo necesita de una cantidad eficaz de un polipéptido trampa de GDF. La exposición proporciona usos de polipéptidos trampa de GDF para preparar un medicamento destinado al tratamiento de un trastorno o condición tal como se indica en la presente memoria.

La exposición puede proporcionar métodos para administrar un polipéptido trampa de GDF en un paciente. En parte, la exposición demuestra que pueden utilizarse polipéptidos trampas de GDF para incrementar los niveles de glóbulos rojos y de hemoglobina. También pueden utilizarse polipéptidos trampa de GDF para tratar o prevenir otros usos terapéuticos, tales como la estimulación del crecimiento muscular. En determinados casos, al administrar un polipéptido trampa de GDF para estimular el crecimiento muscular, puede resultar deseable monitorizar los efectos sobre los glóbulos rojos durante la administración del polipéptido trampa de GDF, o para determinar o ajustar la administración del polipéptido trampa de GDF, con el fin de reducir los efectos no deseados sobre los glóbulos rojos. Por ejemplo, los incrementos de los niveles de glóbulos rojos, de los niveles de hemoglobina o los niveles de hematocrito pueden causar incrementos de la presión sanguínea.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una alineación de los dominios extracelulares de ActRIIA humano (SEC ID nº 15) y ActRIIB humano (SEC ID nº 2) con los residuos que se deducen en la presente memoria, basándose en el análisis compuesto de múltiples estructuras cristalinas de ActRIIB y ActRIIA para entrar en contacto directamente con el ligando (el bolsillo de unión del ligando) indicado con cajas.

La figura 2 muestra una múltiple alineación de secuencias de diversas proteínas ActRIIB de vertebrado y ActRIIA humana (SEC ID nº 16-23).

La figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos completa para la trampa de GDF ActRIIB(L79D 20-134)-Fc_h (SEC ID nº 11), incluyendo la secuencia líder de TPA (doblemente subrayada), dominio extracelular dActRIIB (residuos 20 a 134 en la SEC ID nº 1, subrayada) y dominio Fc_h. El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia nativa se encuentra doblemente subrayada y en negrita, al igual que la glicina que revela la secuenciación que es el residuo N-terminal en la proteína de fusión madura.

La figura 4 muestra una secuencia de nucleótidos codificante de ActRIIB(L79D 20-134)-Fc-h. La SEC ID nº 25 corresponde a la cadena de sentido, y la SEC ID nº 33 corresponde a la cadena antisentido. El líder TPA (nucleótidos 1 a 66) se encuentra doblemente subrayado y el dominio extracelular de ActRIIB (nucleótidos 76 a 420) se encuentra subrayado.

La figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos completa de la trampa de GDF ActRIIB(L79D 25-131)-Fc_h (SEC ID nº 1, subrayada) y el dominio Fc_h. 1, subrayada) y dominio Fc_h. El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia nativa se encuentra doblemente subrayada y en negrita, al igual que el glutamato que revela la secuenciación que es el residuo N-terminal en la proteína de fusión madura.

La figura 6 muestra una secuencia de nucleótidos codificante de ActRIIB(L79D 25-131)-Fc-h. La SEC ID nº 27 corresponde a la cadena de sentido, y la SEC ID nº 34 corresponde a la cadena antisentido. El líder TPA (nucleótidos 1 a 66) se encuentra doblemente subrayado y el dominio extracelular de ActRIIB truncado (nucleótidos 76 a 396) se encuentra subrayado. También se muestra la secuencia de aminoácidos para el dominio extracelular de ActRIIB (residuos 25-131 en la SEC ID nº 1).

La figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos de la trampa de GDF truncada ActRIIB(L79D 25-131)-Fc_h sin un líder (SEC ID nº 28). El dominio extracelular de ActRIIB truncado (residuos 25-131 en la SEC ID nº 1) se encuentra subrayado. El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia nativa se encuentra doblemente subrayada y en negrita, al igual que el glutamato que revela la secuenciación que es el residuo N-terminal en la proteína de fusión madura.

La figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos para la trampa de GDF truncada ActRIIB(L79D 25-131) sin el líder, dominio Fc_h, y conector (SEC ID nº 29). El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia nativa se encuentra subrayado y en negrita, al igual que el glutamato que revela la secuenciación que es el residuo N-terminal en la proteína de fusión madura.

La figura 9 muestra una secuencia de nucleótidos alternante codificante de ActRIIB(L79D 25-131)-Fc-h. La SEC ID nº 30 corresponde a la cadena de sentido, y la SEC ID nº 35 corresponde a la cadena antisentido. El líder TPA (nucleótidos 1 a 66) se encuentra doblemente subrayado, el dominio extracelular de ActRIIB truncado (nucleótidos 76 a 396) se encuentra subrayado y las sustituciones en la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje del dominio extracelular se encuentran doblemente subrayadas y en negrita (comparar con la SEC ID nº 27, figura 6). También se muestra la secuencia de aminoácidos para el dominio extracelular de ActRIIB (residuos 25-131 en la SEC ID nº 1).

La figura 10 muestra los nucleótidos 76 a 396 (SEC ID nº 31) de la secuencia de nucleótidos alternativa mostrada en la figura 9 (SEC ID nº 30). Las mismas sustituciones de nucleótidos indicadas en la figura 9 también se encuentran subrayadas y en negrita. La SEC ID nº 31 codifica únicamente el dominio extracelular de ActRIIB truncado (correspondiente a los residuos 25 a 131 en la SEC ID nº 1) con una sustitución L79D, p.ej., ActRIIB(L79D 25-131).

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

La figura 12 muestra el efecto de ActRIIB(L79D 25-131)-Fc_h sobre los niveles de glóbulos rojos (GR) en un modelo de ratón unilateralmente nefrectomizado (NEPHX) de enfermedad renal crónica. Los datos son de medias $\pm$ SEM. ***, $P < 0,001$ vs. línea base. Esta trampa de GDF revertió la anemia inducida por nefrectomía observada en ratones de control.

La figura 13 muestra el efecto de ActRIIB(L79D 25-131)-Fc_h sobre los niveles de glóbulos rojos (GR), hemoglobina (HGB) y hematócrito (HCT) en un modelo de ratón unilateralmente nefrectomizado (NEPHX) de enfermedad renal crónica. Los datos son cambios medios respecto a la línea base durante 4 semanas ($\pm$ SEM). *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ vs. controles de NEPHX. Esta trampa de GDF impidió el declive asociado a nefrectomía en dichos parámetros eritrocíticos, incrementando cada uno en una magnitud similar a la observada en ratones con riñones intactos (simulado).

La figura 14 muestra el efecto de ActRIIB(L79D 25-131)-Fc_h sobre los niveles de glóbulos rojos (GR) en un modelo de rata de anemia inducida por pérdida aguda de sangre. La extracción de sangre se produjo el día -1 con administración los días 0 y 3. Los datos son de medias $\pm$ SEM. **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ vs. Vehículo en el mismo punto temporal. Dicha trampa de GDF mejoró la tasa y extensión de la recuperación de la anemia inducida por pérdida de sangre.

La figura 15 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(L79D 20-134)-Fc_h (gris) o ActRIIB(L79D 25-131)-Fc_h (negro) sobre el cambio absoluto de concentración de glóbulos rojos respecto a la línea base en monos Cynomolgus. VEH = vehículo. Los datos son de medias $\pm$ SEM. $n = 4-8$ por grupo.

La figura 16 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(L79D 20-134)-Fc_h (gris) o ActRIIB(L79D 25-131)-Fc_h (negro) sobre el cambio absoluto de hematócrito respecto a la línea base en monos Cynomolgus. VEH = vehículo. Los datos son de medias $\pm$ SEM. $n = 4-8$ por grupo.

La figura 17 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(L79D 20-134)-Fc_h (gris) o ActRIIB(L79D 25-131)-Fc_h (negro) sobre el cambio absoluto de hemoglobina respecto a la línea base en monos Cynomolgus. VEH = vehículo. Los datos son de medias $\pm$ SEM. $n = 4-8$ por grupo.

La figura 18 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB(L79D 20-134)-Fc_h (gris) o ActRIIB(L79D 25-131)-Fc_h (negro) sobre el cambio absoluto de la concentración de reticulocitos circulantes respecto a la línea base en monos Cynomolgus. VEH = vehículo. Los datos son de medias $\pm$ SEM. $n = 4-8$ por grupo.

Descripción detallada de la invención

1. Descripción general

La superfamilia de factor beta de crecimiento transformante (TGF-beta, por sus siglas en inglés) contiene una diversidad de factores de crecimiento que comparten elementos de secuencia y motivos estructurales comunes. Estas proteínas es conocido que ejercen efectos biológicos sobre una gran diversidad de tipos celulares tanto en vertebrados como invertebrados. Los miembros de la superfamilia llevan a cabo funciones importantes durante el desarrollo embrionario en la formación de patrones y la especificación tisular y pueden influir sobre una diversidad de procesos de diferenciación, incluyendo adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, cardiogénesis, hematopoyesis, neurogénesis y diferenciación de las células epiteliales. La familia se divide en dos ramas generales: las ramas BMP/GDF y TGF-beta/activina/BMP10, cuyos miembros presentan efectos diversos, con frecuencia complementarios. Mediante la manipulación de la actividad de un miembro de la familia de TGF-beta, con frecuencia resulta posible provocar cambios fisiológicos significativos en un organismo. Por ejemplo, las razas de ganado Piedmontese y Belgian Blue portan una mutación de pérdida de función en el gen de GDF8 (también denominado miostatina) que provoca un incremento marcado de la masa muscular (Grobet et al., Nat Genet. 17(1):71-4, 1997). Además, en seres humanos, alelos inactivos de GDF8 se asocian a una masa muscular incrementada y, según se informa, una fuerza excepcional (Schuelke et al., N.Engl.J. Med. 350:2682-8, 2004).

Las señales de TGF- β están mediadas por complejos heteroméricos de receptores de serina/treonina quinasa de tipo I y tipo II, que fosforilan y activan proteínas Smad cadena abajo con la estimulación de ligando (Massagué, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178, 1998). Estos receptores de tipo I y de tipo II son proteínas transmembranales, compuestas de un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteínas, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático con especificidad de serina/treonina predicha. Los receptores de tipo I resultan esenciales para la señalización. Los receptores de tipo II resultan necesarios para la unión de ligandos y para la expresión de receptores de tipo I. Los receptores de activina de tipo I y II forman un complejo estable tras la unión de ligando, resultando en la fosforilación de los receptores de tipo I por receptores de tipo II.

Se han identificado dos receptores de tipo II relacionados (ActRII), ActRIIA y ActRIIB, como receptores de tipo II para activinas (Mathews y Vale, Cell 65:973-982, 1991; Attisano et al., Cell 68: 97-108, 1998). Aparte de las activinas, ActRIIA y ActRIIB pueden interactuar bioquímicamente con varias otras proteínas de la familia de TGF- β , incluyendo BMP7, Nodal, GDF8 y GDF11 (Yamashita et al., J. Cell Biol. 130:217-226, 1995; Lee y McPherron, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311, 2001; Yeo y Whitman, Mol. Cells 7: 949-957, 2001; Oh et al., Genes Dev. 16:2749-54, 1998). ALK4 es un receptor de tipo I primario para las activinas, particularmente para la activina A, y ALK-7 puede servir como receptor para las activinas también, particularmente para la activina B. La presente exposición se refiere en parte a antagonizar un ligando de receptores ActRIIB (también denominados ligando de ActRIIB) con un polipéptido trampa de GDF de la invención. Entre los ligandos ejemplares de receptores ActRIIB se incluyen algunos miembros de la familia de TGF- β , tales como activina, Nodal, GDF8, GDF11 y BMP7.

Las activinas son factores de crecimiento polipeptídicos diméricos que pertenecen a la superfamilia de TGF-beta. Existen tres formas de activina principales (A, B y AB) que son homodímeros/heterodímeros de dos subunidades β estrechamente relacionadas ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$, and $\beta_A\beta_B$, respectivamente). El genoma humano codifica además una activina C y una activina E, que se expresan principalmente en el hígado, y también se conocen formas heterodiméricas que contienen β_C o β_E . En la superfamilia de TGF-beta, las activinas son factores multifuncionales y únicos que pueden estimular la producción de hormonas en células ováricas y placentarias, favorecer la supervivencia de células neuronales, influir sobre el proceso del ciclo celular positiva o negativamente dependiendo del tipo celular, e inducir la diferenciación mesodérmica por lo menos en embriones de anfibios (DePaolo et al., Proc. Soc. Ep. Biol. Med. 198:500-512, 1991; Dyson et al., Curr Biol. 7:81-84, 1997; Woodruff, Biochem Pharmacol. 55:953-963, 1998). Además, el factor de diferenciación de eritroides (FDE) aislado a partir de células leucémicas monocíticas humanas estimuladas se encontró que era idéntico a la activina A (Murata et al., PNAS, 85:2434, 1988). Se ha sugerido que la activina A estimula la eritropoyesis en la médula ósea. En varios tejidos, la señalización de activina resulta antagonizada por su heterodímero relacionado, la inhibina. Por ejemplo, durante la liberación de hormona folículoestimulante (HFE) a partir de la pituitaria, la activina estimula la secreción y síntesis de HFE, mientras que la inhibina bloquea la secreción y síntesis de HFE. Entre otras proteínas que pueden regular la bioactividad de la activina y/o que se unen a la activina se incluyen la follistatina (FS), la proteína relacionada con la follistatina (PRFS) y la macroglobulina α_2 .

Las proteínas nodales presentan funciones en la inducción y formación de mesodermo y endodermo, así como la posterior organización de las estructuras axiales, tales como el corazón y el estómago en la embriogénesis temprana. Se ha demostrado que el tejido dorsal en un embrión de vertebrado en desarrollo contribuye predominantemente a las estructuras axiales del notocordio y la placa precordial, mientras que atrae células circundantes para formar estructuras embrionarias no axiales. Aparentemente Nodal señala a través de receptores de tipo I y de tipo II y efectores intracelulares conocidos como proteínas Smad. Algunos estudios recientes apoyan la idea de que ActRIIA y ActRIIB sirven como receptores de tipo II para Nodal (Sakuma et al., Genes Cells. 7:401-12, 2002). Se ha sugerido que los ligandos de Nodal interactúan con sus cofactores (p.ej., cripto), activando los receptores de activina de tipo I y tipo II, que fosforilan Smad2. Las proteínas Nodal participan en muchos sucesos críticos para el embrión temprano de los vertebrados, incluyendo la formación del mesodermo, formación de patrón anterior y especificación del eje izquierda-

derecha. La evidencia experimental ha demostrado que la señalización de Nodal activa pAR3-Lux, un informador de luciferasa que se ha demostrado previamente que responde específicamente a la activina y a TGF-beta. Sin embargo, Nodal es incapaz de inducir pTlx2-Lux, un informador específicamente sensible a proteínas morfogenéticas óseas. Los recientes resultados proporcionan evidencia bioquímica directa de que la señalización de Nodal está mediada por Smads, Smad2 y Smad3 de la ruta de activina-TGF-beta. Evidencia adicional ha demostrado que la proteína cripto extracelular necesita necesaria para la señalización de Nodal, distinguiéndola de la señalización de activina o de TGF-beta.

El factor de crecimiento y diferenciación 8 (GDF8, por sus siglas en inglés) también se conoce como miostatina. GDF8 es un regulador negativo de la masa de músculo esquelético. GDF8 se expresa a nivel elevado en el músculo esquelético en desarrollo y adulto. La mutación nula de GDF8 en ratones transgénicos se caracteriza por una marcada hipertrofia e hiperplasia del músculo esquelético (McPherron et al., Nature 387:83-90, 1997). Resultan evidentes incrementos similares en la masa del músculo esquelético en mutaciones naturales de GDF8 en vacas (Ashmore et al., Growth, 38:501-507, 1974; Swatland and Kieffer, J. Anim. Sci., 38:752-757, 1994; McPherron and Lee, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12457-12461, 1997, y Kambadur et al., Genome Res. 7:910-915, 1997) e, inesperadamente, en el ser humano (Schuelke et al., N. Engl. J. Med. 350:2682-8, 2004). Algunos estudios también han demostrado que el desgaste muscular asociado a la infección por el VIH en el ser humano se ve acompañado por incrementos en la expresión de la proteína GDF8 (Gonzalez-Cadavid et al., PNAS 95:14938-43, 1998). Además, GDF8 puede modular la producción de enzimas específicos musculares (p.ej., creatina quinasa) y modular la proliferación de células mioblásticas (documento n°WO 00/43781). El propéptido GDF8 puede unirse no covalentemente al dímero del dominio GDF8 maduro, inactivando su actividad biológica (Miyazono et al., J. Biol. Chem. 263: 6407-6415, 1988; Wakefield et al., J. Biol. Chem., 263: 7646-7654, 1988; y Brown et al., Growth Factors, 3: 35-43, 1998). Entre otras proteínas que se unen a GDF8, o a proteínas estructuralmente relacionadas, e inhiben su actividad biológica, se incluyen follistatina, y potencialmente proteínas relacionadas con la follistatina (Gamer et al., Dev. Biol. 208: 222-232, 1998).

El factor de crecimiento y diferenciación 11 (GDF11), también conocido como BMP11, es una proteína secretada (McPherron et al., Nat. Genet. 22: 260-264, 1998). GDF11 se expresa en la yema de cola, yema de extremidades, archos maxilares y mandibulares, y ganglios de la raíz dorsal durante el desarrollo del ratón (Nakashima et al., Mech. Dev. 80: 185-189, 1998). GDF11 desempeña un papel único en la formación de patrón en tejidos mesodérmicos y neurales (Gamer et al., Dev. Biol. 208:222-32, 1999). Se ha demostrado que GDF11 es un regulador negativo de la condrogénesis y la miogénesis en extremidades de pollo en desarrollo (Gamer et al., Dev. Biol. 229:407-20, 1998). La expresión de GDF11 en el músculo también sugiere su papel en la regulación del crecimiento muscular de una manera similar a GDF8. Además, la expresión de GDF11 en el cerebro sugiere que GDF11 también puede poseer actividades que se relacionan con el funcionamiento del sistema nervioso. Resulta interesante que GDF11 se ha encontrado que inhibe la neurogénesis en el epitelio olfativo (Wu et al., Neuron. 37:197-207, 1998). Por lo tanto, GDF11 puede presentar aplicaciones *in vitro* e *in vivo* en el tratamiento de enfermedades tales como enfermedades musculares y enfermedades neurodegenerativas (p.ej., la esclerosis lateral amiotrófica).

La proteína morfogenética ósea (BMP7, por sus siglas en inglés), también denominada proteína osteogénica 1 (OP-1), es bien conocido que induce la formación de cartilago y hueso. Además, BMP7 regula un amplio abanico de procesos fisiológicos. Por ejemplo, BMP7 podría ser el factor osteoinductor responsable del fenómeno de osteogénesis epitelial. También se ha encontrado que BMP77 desempeña un papel en la regulación del calcio y la homeostasis ósea. Como la activina, BMP7 se une a receptores de tipo II, ActRIIA y ActRIIB. Sin embargo, BMP7 y la activina atraen diferentes receptores de tipo I en complejos de receptores heteroméricos. El principal receptor de tipo I de BMP7 observado era ALK2, mientras que la activina se unía exclusivamente a ALK4 (ActRIIB). BMP7 y la activina indujeron respuestas biológicas diferentes y activaron diferentes rutas de Smad (Macias-Silva et al., J. Biol. Chem. 273:25628-36, 1998).

Tal como se demuestra en la presente memoria, un polipéptido trampa de GDF, que es un polipéptido ActRIIB variante (ActRIIB), resulta más eficaz en el incremento de los niveles de glóbulos rojos *in vivo* en comparación con un polipéptido ActRIIB soluble de tipo salvaje y presenta efectos beneficiosos en una diversidad de modelos de anemia. Debe indicarse que la hematopoyesis es un proceso complejo, regulado por una diversidad de factores, incluyendo la homeostasis de la eritropoyetina, G-CSF y hierro. Las expresiones "niveles incrementados de glóbulos rojos" y "estimula la formación de glóbulos rojos" se refieren a métricas clínicamente observables, tales como el hematócrito, los recuentos de glóbulos rojos y las mediciones de hemoglobina, y pretenden ser neutros respecto al mecanismo mediante el que se producen dichos cambios.

Además de estimular los niveles de glóbulos rojos, los polipéptidos trampa de GDF resultan útiles para una diversidad de aplicaciones terapéuticas, incluyendo, por ejemplo, la estimulación del crecimiento muscular (ver las publicaciones de patente PCT n° WO 2006/012627 y n° WO 2008/097541). En determinados casos, al administrar un polipéptido trampa de GDF para el propósito de incrementar el músculo, puede resultar deseable reducir o minimizar los efectos sobre los glóbulos rojos. Mediante la monitorización de diversos parámetros hematológicos en pacientes bajo tratamiento con, o que son candidatos para el tratamiento con, un polipéptido trampa de GDF, puede determinarse la administración apropiada (incluyendo cantidades y frecuencia de administración) basándose en las necesidades del paciente individual, parámetros hematológicos de línea base y propósito del tratamiento. Además, el progreso terapéutico y los efectos sobre uno o más parámetros hematológicos durante el tiempo puede resultar útil en el control

de pacientes en los que se administra un polipéptido trampa de PDF al facilitar el cuidado del paciente, determinando una administración de mantenimiento apropiada (tanto cantidades y frecuencia), etc.

Los términos utilizados en la presente especificación generalmente presentan sus significados ordinarios en la materia, dentro del contexto de la presente invención y en el contexto específico en que se utiliza cada término. Determinados términos se comentan posteriormente o en otros sitios en la especificación, proporcionando una guía adicional para el médico en la descripción de la materia objeto de la invención y cómo realizarla y utilizarla. El alcance o significado de cualquier uso de un término resultará evidente a partir del contexto específico en el que se utiliza el término.

“Aproximadamente” se refiere generalmente a un grado aceptable de error para la cantidad medida, dada la naturaleza o precisión de las mediciones. Típicamente, los grados ejemplares de error se encuentran dentro del 20 por ciento (%), preferentemente dentro del 10%, y más preferentemente dentro del 5% de un valor o intervalo de valores dado.

Alternativamente, y particularmente en sistemas biológicos, el término “aproximadamente” puede referirse a valores que se encuentran en un orden de magnitud, preferentemente de menos de 5 veces, y más preferentemente 2 veces, de un valor dado. Las cantidades numéricas proporcionadas en la presente memoria son aproximadas, a menos que se indique lo contrario; es decir, el término “aproximadamente” puede inferirse en el caso de que no se indique expresamente.

Los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden incluir etapas de comparación de secuencias entre sí, incluyendo secuencia de tipo salvaje con uno o más mutantes (variantes de secuencia). Tales comparaciones típicamente comprenden alineaciones de secuencias de polímero, p.ej., utilizando programas y/o algoritmos de alineación de secuencias que son bien conocidos de la técnica (por ejemplo, BLAST, FASTA y MEGALIGN, entre otros). El experto en la materia podrá apreciar fácilmente que, en tales alineaciones, donde una mutación contiene una inserción o delección de residuo, la alineación de secuencia introducirá un “hueco” (típicamente representado por un guión o una “A”) en la secuencia de polímero que no contiene el residuo insertado o delecionado.

“Homólogo”, en todas sus formas gramáticas y variaciones ortográficas, se refiere a la reacción entre dos proteínas que poseen un “origen evolutivo común”, incluyendo proteínas de superfamilias en la misma especie de organismo, así como proteínas homólogas de diferentes especies de organismo. Tales proteínas (y sus ácidos nucleicos codificantes) presentan homología de secuencias, tal como refleja su similitud de secuencias, sea en términos de porcentaje de identidad o de presencia de residuos o motivos específicos y posiciones conservadas.

La expresión “similitud de secuencias” en todas sus formas gramaticales se refiere al grado de identidad o correspondencia entre secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos que pueden compartir o no un origen evolutivo común.

Sin embargo, en el uso común y en la presente solicitud, el término “homólogo”, al modificarlo con un adverbio, tal como “altamente”, puede referirse a similitud de secuencias y puede estar relacionado o no con un origen evolutivo común.

2. Polipéptidos trampa de GDF

La presente exposición se refiere en parte a polipéptidos trampa de GDF, p.ej., polipéptidos ActRIIB variantes solubles, incluyendo, por ejemplo, fragmentos, variantes funcionales y formas modificadas de polipéptidos ActRIIB. Los polipéptidos trampa de GDF pueden presentar por lo menos una actividad biológica similar o igual a un polipéptido ActRIIB de tipo salvaje correspondiente. Por ejemplo, un polipéptido trampa de GDF para la utilización en la invención puede unirse e inhibir la función de un ligando de ActRIIB (p.ej., la activina A, la activina AB, la activina B, Nodal, GDF8, GDF11 o BMP7). Opcionalmente, un polipéptido trampa de GDF incrementa los niveles de glóbulos rojos. Entre los ejemplos de polipéptidos trampa de GDF se incluyen polipéptidos precursores de ActRIIB humanos (SEC ID nº 1 o 39) que presentan una o más variaciones de secuencia, y polipéptidos ActRIIB humanos solubles (p.ej., SEC ID nº 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 y 41) que presentan una o más variaciones de secuencia. Una trampa de GDF se refiere a un polipéptido ActRIIB que presenta una afinidad reducida para la activina respecto a otros ligandos de ActRIIB, incluyendo, por ejemplo, GDF11 y/o miostatina.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “ActRIIB” se refiere a una familia de proteínas de activina de tipo IIb de receptor de activina (ActRIIB) de cualesquiera especies y variantes derivadas de dichas proteínas ActRIIB mediante mutagénesis u otra modificación. La referencia a ActRIIB en la presente memoria se entiende que es una referencia a cualquiera de las formas actualmente identificadas. Los miembros de la familia de ActRIIB generalmente son proteínas transmembranales, compuestas de un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteínas, un dominio transmembranal, y un dominio citoplasmático con actividad de serina/treonina quinasa predicha. Las secuencias de aminoácidos de dominio extracelular soluble de ActRIIA humano (proporcionado a título comparativo) y dominio extracelular soluble de ActRIIB se ilustran en la figura 1.

La expresión “polipéptido ActRIIB” incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido natural de un miembro de la familia de ActRIIB, así como cualesquiera variantes del mismo (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y

formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil. Ver, por ejemplo, el documento nº WO 2006/012627. Por ejemplo, entre los polipéptidos ActRIIB se incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier ActRIIB conocida que presenta una secuencia por lo menos aproximadamente 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido ActRIIB, y opcionalmente una identidad por lo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o superior. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB puede unirse e inhibir la función de una proteína ActRIIB y/o activina. Un polipéptido ActRIIB que es una trampa de GDF puede seleccionarse para la actividad de estimulación de la formación *in vivo* de glóbulos rojos. Entre los ejemplos de polipéptidos ActRIIB se incluyen el polipéptido precursor de ActRIIB humano (SEC ID nº 1 y 39) y polipéptidos ActRIIB humanos solubles (p.ej., SEC ID nº 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 y 41). La numeración de todos los polipéptidos relacionados con ActRIIB indicados en la presente memoria se basa en la numeración para SEC ID nº 1, a menos que se indique específicamente lo contrario.

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

MTAPWVALALLWGSLWPGS**GRGEAETRECIYYNANWELERTN**QSGLERC
EGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ
VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLPIG
 GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPSPLVGLKPLQLLEIK
 ARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLL
 QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGKNIITWNELCHVAETM
 SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLA
 VRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLV
 LWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIK
 DHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS
 DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEC ID nº 1)

- 15 El péptido de señal está individualmente subrayado; el dominio extracelular se encuentra en negrita y los sitios de glucosilación N-ligados potenciales se muestran en cajas.

Una forma con una alanina en la posición 64 también se informa en la literatura, de la manera siguiente:

MTAPWVALALLWGSLWPGS**GRGEAETRECIYYNANWELERTN**QSGLERC
EGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ
VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLPIG
 GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPSPLVGLKPLQLLEIK
 ARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLL
 QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGKNIITWNELCHVAETM
 SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLA
 VRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLV
 LWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIK
 DHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS
 DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEC ID nº 39)

La secuencia polipeptídica procesada de ActRIIB soluble humana (extracelular) es la siguiente:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG
 TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
EAGGPEVTYEPPTAPT (SEC ID nº 2)

La forma alternativa con un A64 es la siguiente:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG
 TIELVKKGCVLDDFNCFYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
EAGGPEVTYEPPPTAPT (SEC ID nº 40)

5 Bajo algunas condiciones, la proteína puede producirse con una secuencia "SGR..." en el extremo N-terminal. La "cola" C-terminal del dominio extracelular se encuentra subrayada. La secuencia con la "cola" deletionada (una secuencia $\Delta 15$) es la siguiente.

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG
 TIELVKKGCVLDDFNCFYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
 EA (SEC ID nº 3)

La forma alternativa con un A64 es la siguiente:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG
 TIELVKKGCVLDDFNCFYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP

10 EA (SEC ID nº 41)

15 Bajo algunas condiciones, la proteína puede producirse con una secuencia "SGR..." en el extremo N-terminal. La secuencia de ácidos nucleicos codificante de una proteína precursora de ActRIIB humana es la siguiente: (nucleótidos 5-1543 de Genbank entrada nº NM_001 106)(la secuencia tal como se muestra proporciona una alanina en la posición 64 y puede modificarse para proporcionar en su lugar una arginina)

ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGGC
 CCGGCTCTGGGCGTGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAA
 CGCCAACCTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGC
 GAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACA
 GCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTT
 CAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAG

GTGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTC
 ATTTGCCAGAGGCTGGGGGCCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCGAC
 AGCCCCACCCTGCTCACGGTGTGGCCTACTCACTGCTGCCCATCGGG
 GGCCTTTCCTCATCGTCTGCTGGCCTTTTGGATGTACCGGCATCGCA
 AGCCCCCTACGGTCATGTGGACATCCATGAGGACCCTGGGCCTCCACC
 ACCATCCCCCTCTGGTGGGCCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAAG
 GCTCGGGGGCGCTTTGGCTGTGTCTGGAAGGCCAGCTCATGAATGACT
 TTGTAGCTGTCAAGATCTTCCCACTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAG
 TGAACGGGAGATCTTCAGCACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCTGCTA
 CAGTTCATTGCTGCCGAGAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAGCTGT
 GGCTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCCTCACGGATTACCTCAA
 GGGGAACATCATCACATGGAACGAACTGTGTCTATGTAGCAGAGACGATG
 TCACGAGGCCTCTCATACCTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGCCGTGGCG
 AGGGCCACAAGCCGTCTATTGCCACAGGGACTTTAAAAGTAAGAATGT
 ATTGCTGAAGAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCTGACTTTGGCTTGGCT
 GTTCGATTTGAGCCAGGGAAACCTCCAGGGGACACCCACGGACAGGTAG
 GCACGAGACGGTACATGGCTCCTGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTT
 CCAGAGAGATGCCTTCTGCGCATTGACATGTATGCCATGGGGTTGGTG
 CTGTGGGAGCTTGTGTCTCGCTGCAAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATG
 AGTACATGCTGCCCTTTGAGGAAGAGATTGGCCAGCACCTTCGTTGGA
 GGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTGCACAAGAAGATGAGGCCACCATTA
 GATCACTGGTTGAAACACCCGGGCCTGGCCCAGCTTTGTGTGACCATCG
 AGGAGTGCTGGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTGTCCGCGGGCTGTGT
 GGAGGAGCGGGTGTCCCTGATTTCGGAGGTTCGGTCAACGGCACTACCTCG
 GACTGTCTCGTTTCCCTGGTGACCTCTGTACCAATGTGGACCTGCCCC
 CTAAAGAGTCAAGCATCTAA (SEC ID nº 4)

La secuencia de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido ActRIIA soluble (extracelular) humano es la siguiente (la secuencia tal como se muestra proporciona una alanina en la posición 64 y puede modificarse para proporcionar en su lugar una arginina):

GGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCAACT
 GGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGGCGA
 GCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACAGCTCTGGC
 ACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACTGCT
 ACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTACTT
 CTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTTGCCA
 GAGGCTGGGGGCCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCGACAGCCCCCA
 CC (SEC ID nº 5)

En la presente memoria se dan a conocer polipéptidos trampa de GDF que son formas variantes de polipéptidos ActRIIB solubles. Tal como se indica en la presente memoria, la expresión "polipéptido ActRIIB soluble" se refiere de manera general a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ActRIIB. La expresión "polipéptido ActRIIB soluble", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye cualquier dominio extracelular natural

de una proteína ActRIIB, así como cualesquiera variantes de la misma (incluyendo mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil. Por ejemplo, el dominio extracelular de una proteína ActRIIB se une a un ligando y es generalmente soluble. Entre los ejemplos de polipéptidos ActRIIB solubles se incluyen polipéptidos solubles ActRIIB (p.ej., las SEC ID nº 22, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 y 41). Otros ejemplos de polipéptidos ActRIIB solubles comprenden una secuencia de señal además del dominio extracelular de una proteína ActRIIB, ver el Ejemplo 1. La secuencia de señal puede ser una secuencia de señal activa de un ActRIIB, o una secuencia de señal de otra proteína, tal como una secuencia de señal de activador de plasminógeno tisular (APT) o una secuencia de señal de melitina de abeja melífera (MAM).

La exposición identifica partes y variantes funcionalmente activas de ActRIIB. Los solicitantes han determinado que una proteína de fusión de Fc que presenta la secuencia dada a conocer en Hilden et al. (Blood. 83(8):2163-70, 15 de abril, 1994), que presenta una alanina en la posición correspondiente al aminoácido 64 de la SEC ID nº 1 (A64), presenta una afinidad relativamente baja para la activina y GDF-11). En contraste, la misma proteína de fusión de Fc con una arginina en la posición 64 (R64) presenta afinidad para la actividad y GDF-11 en el rango nanomolar bajo a picomolar alto. Por lo tanto, se utiliza una secuencia con un R64 como la secuencia de referencia de tipo salvaje para ActRIIB humano en la presente exposición.

Attisano et al. (Cell. 68(1):97-108, 10 de enero, 1992) demostraron que una delección del núcleo de prolina en el extremo C-terminal del dominio extracelular de ActRIIB reducía la afinidad del receptor para la activina. Una proteína de fusión de ActRIIB-Fc que contiene los aminoácidos 20-119 de la SEC ID nº 1, "ActRIIB(20-119)-Fc" presenta una unión reducida a GDF-11 y la activina respecto a ActRIIB(20-134)-Fc, que incluye la región de núcleo de prolina y el dominio yuxtamembranal completo. Sin embargo, la proteína ActRIIB(20-129)-Fc conserva una actividad similar aunque algo reducida respecto al tipo salvaje, aunque la región de núcleo de prolina ha sido interrumpida. De esta manera, los dominios extracelulares de ActRIIB que llegan hasta los aminoácidos 134, 133, 132, 131, 130 y 129 se espera que todos sean activos, aunque los constructos que llegan hasta 134 o 133 pueden ser los más activos. De manera similar, las mutaciones en cualquiera de los residuos 129 a 134 no se espera que alteren la afinidad de unión de ligando en un gran margen. En apoyo de lo anterior, las mutaciones de P129 y P130 no reducen sustancialmente la unión de ligandos. Por lo tanto, un polipéptido trampa de GDF que es una proteína de fusión de ActRIIB-Fc puede terminar tan pronto como el aminoácido 109 (la cisteína final), sin embargo, las formas que terminan en o entre 109 y 119, se espera que presenten una unión de ligando reducida. El aminoácido 119 se encuentra poco conservado y por lo tanto se altera o trunca fácilmente. Las formas que terminan en 128 o después conservan actividad de unión de ligando. Las formas que terminan en o entre 119 y 127 presentará una capacidad de unión intermedia. Cualquiera de estas formas puede resultar de utilización deseable, dependiendo del contexto clínico o experimental.

En el extremo N-terminal de ActRIIB, se espera que una proteína que se inicia en el aminoácido 29 o antes conservará la actividad de unión de ligando. El aminoácido 29 representa la cisteína inicial. Una mutación de alanina a asparagina en la posición 24 introduce una secuencia de glucosilación ligada a N sin afectar sustancialmente a la unión de ligando. Esto confirma que las mutaciones en la región entre el péptido de corte de señal y la región entrecruzada por cisteínas, correspondiente a los aminoácidos 20 a 29, resultan bien toleradas. En particular, los constructos que se inician en las posiciones 20, 21, 22, 23 y 24 conservan actividad y los constructos que se inician en las posiciones 25, 26, 27, 28 y 29 también se espera que conserven actividad. Los datos mostrados en los Ejemplos demuestran que, inesperadamente, un constructo que se inicia en 22, 23, 24 o 25 presentará la máxima actividad.

Conjuntamente, una parte activa de ActRIIB comprende los aminoácidos 29 a 109 de SEC ID nº 1 y constructos de trampa de GDF pueden comprender, por ejemplo, una parte de ActRIIB que se inicia en un residuo correspondiente a los aminoácidos 20 a 29 de la SEC ID nº 1 o 39 y que termina en una posición correspondiente a los aminoácidos 109 a 134 de SEC ID nº 1 o 39. Entre otros ejemplos se incluyen constructos que se inician en una posición entre 20 y 29 o entre 21 y 29 y terminan en una posición entre 119 y 134, entre 119 y 133, entre 129 y 134 o entre 129 y 133 de SEC ID nº 1 o 39. Entre otros ejemplos se incluyen constructos que se inician en una posición entre 20 y 24 (o entre 21 y 24 o entre 22 y 25) y terminan en una posición entre 109 y 134 (o entre 109 y 133), entre 119 y 134 (o entre 119 y 133) o entre 129 y 134 (o entre 129 y 133) de la SEC ID nº 1 o 39. Las variantes dentro de dichos intervalos también se encuentran contemplados, particularmente las que presentan una identidad de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95% o 99% respecto a la parte correspondiente de la SEC ID nº 1 o 39. Los polipéptidos trampa de GDF dados a conocer en la presente memoria pueden comprender, consistir esencialmente en, o consisten en un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a los residuos aminoácidos 25 a 131 de la SEC ID nº 1 o 39. En determinadas realizaciones, el polipéptido trampa de GDF para la utilización en la invención comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a las SEC ID nº 7, 28, 29, 32, 37 o 38. Otros polipéptidos trampa de GDF pueden comprender, consistir esencialmente en, o consisten en un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la SEC ID nº 26. En realizaciones preferentes, el polipéptido trampa de GDF consiste en, consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 7, 28, 29, 32, 37 o 38.

La exposición incluye los resultados de un análisis de estructuras de ActRIIB compuestas, mostradas en la figura 1, que demuestran que el bolsillo de unión de ligando está definido por los residuos Y31, N33, N35, L38 a T41, E47, E50, Q53 a K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 a N83, Y85, R87, A92 y E94 a F101. En estas posiciones, se espera que

las mutaciones conservadoras resultarán toleradas, aunque una mutación K74A resulta bien tolerada, al igual que las mutaciones R40A, K55A, F82A y las mutaciones en la posición L79. R40 es una K en *Xenopus*, indicando que aminoácidos básicos en esta posición resultarán tolerados. Q53 es R en ActRIIB bovino y K en ActRIIB de *Xenopus* y, por lo tanto, los aminoácidos, incluyendo R, K, Q, N y H, resultarán tolerados en esta posición. De esta manera, una fórmula general para una proteína trampa de GDF es una que comprende los aminoácidos 29 a 109 de SEC ID nº 1 o 39, aunque opcionalmente se inicia en una posición comprendida entre 20 y 24 o entre 22 y 25 y termina en una posición comprendida entre 129 y 134, y que comprende no más de 1, 2, 5, 10 o 15 cambios de aminoácidos conservadores en el bolsillo de unión de ligando, y cero, una o más alteraciones no conservadoras en las posiciones 40, 53, 55, 74, 79 y/o 82 en el bolsillo de unión a ligando. Dicha proteína puede conservar una identidad de secuencia superior a 80%, 90%, 95% o 99% a la secuencia de aminoácidos 29-109 de SEC ID nº 1 o 39. Entre los sitios fuera del bolsillo de unión, en los que la variabilidad puede resultar particularmente bien tolerada, se incluyen los extremos aminoterminal y carboxiterminal del dominio extracelular (tal como se ha indicado anteriormente) y las posiciones 42 a 46 y 65 a 73. Una alteración de asparagina a alanina en la posición 65 (N65A) de hecho mejora la unión de ligando en el fondo de A64, y de esta manera se espera que no presente ningún efecto perjudicial sobre la unión de ligando en el fondo de R64. Este cambio probablemente elimina la glucosilación en N65 en el fondo de A64, demostrando de esta manera que un cambio significativo en esta región probablemente resultará tolerado. Aunque un cambio R64A resulta mal tolerado, R64K resulta bien tolerado, y de esta manera, otro residuo básico, tal como H puede tolerarse en la posición 64.

ActRIIB se encuentra bien conservado en prácticamente todos los vertebrados, con tramos grandes del dominio extracelular conservados por completo. Muchos de los ligandos que se unen a ActRIIB también se encuentran altamente conservados. De acuerdo con lo anterior, las comparaciones de las secuencias de ActRIIB de diversos organismos vertebrados proporcionan conocimiento sobre los residuos que podrían alterarse. Por lo tanto, un polipéptido ActRIIB variante humano activo útil como trampa de GDF puede incluir uno o más aminoácidos en posiciones correspondientes de la secuencia de ActRIIB de otro vertebrado, o puede incluir un residuo que es similar al mismo en la secuencia humana o de otro vertebrado. Los ejemplos siguientes ilustran este enfoque a la definición de un ActRIIB variante activo. L46 es una valina en ActRIIB de *Xenopus*, y por lo tanto esta posición puede alterarse, y opcionalmente puede alterarse por otro residuo hidrofóbico, tal como V, I o F, o un residuo no polar, tal como A. E52 es una K en *Xenopus*, indicando que este sitio podría ser tolerante de una amplia diversidad de cambios, incluyendo residuos polares, tales como E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y y probablemente A. T93 es una K en *Xenopus*, indicando que una amplia variación estructural resulta tolerada en esta posición, favoreciendo residuos polares, tales como S, K, R, E, D, H, G, P, G e Y. F108 es una Y en *Xenopus*, y por lo tanto Y u otro grupo hidrofóbico, tal como I, V o L debería resultar tolerado. E111 es K en *Xenopus*, indicando que los residuos cargados resultarán tolerados en esta posición, incluyendo D, R, K y H, así como Q y N. R112 es K en *Xenopus*, indicando que los residuos básicos resultan tolerados en esta posición, incluyendo R y H. A en la posición 119 resulta relativamente mal conservada y aparece como P en roedores y V en *Xenopus*; de esta manera, esencialmente cualquier aminoácido debería resultar tolerado en esta posición.

La exposición demuestra que la adición de un sitio de glucosilación N-ligada adicional (N-X-S/T) incrementa la semivida sérica de una proteína de fusión ActRIIB-Fc, respecto a la forma ActRIIB(R64)-Fc. Mediante la introducción de una asparagina en la posición 24 (constructo A24N), se crea una secuencia NXT que proporciona una semivida más larga. Se encuentran otras secuencias NX(T/S) en 42-44 (NQS) y 65-67 (NSS), aunque esta última podría no glucosilarse eficientemente con la R en la posición 64. Las secuencias N-X-S/T pueden introducirse generalmente en posiciones fuera del bolsillo de unión a ligando definidas en la figura 1. Entre los sitios particularmente adecuados para la introducción de secuencias N-X-S/T no endógenas se incluyen los aminoácidos 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 o 129-134. Las secuencias N-X-S/T también pueden introducirse en el conector entre la secuencia de ActRIIB y el componente Fc u otro componente de fusión. Dicho sitio puede introducirse con mínimo esfuerzo mediante la introducción de una N en la posición correcta con respecto a una S o T preexistente, o mediante la introducción de una S o T en una posición correspondiente a una N preexistente. De esta manera, son alteraciones deseables que crearían un sitio de glucosilación ligada a N: A24N, R64N, S67N (posiblemente combinado con una alteración N65A), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S y R112T. Puede alterarse cualquier S que se prediga que está glucosilado, a una T sin crear un sitio inmunogénico, debido a la protección proporcionada por la glucosilación. De manera similar, cualquier T que se prediga que está glucosilado puede alterarse a una S. De esta manera, se encuentran contempladas las alteraciones S67T y S44T. De manera similar, en una variante A24N, puede utilizarse una alteración S26T. De acuerdo con lo anterior, una trampa de GDF puede ser una variante de ActRIIB que presenta una o más secuencias de consenso de glucosilación unidas a N no endógenas adicionales.

La posición L79 de ActRIIB puede alterarse para proporcionar propiedades de unión de activina-miostatina (GDF-11) alteradas. L79A o L79P reduce la unión de GDF-11 en mayor grado que la unión de activina. L79E o L79D conserva la unión de GDF-11. Notablemente, las variantes L79E y L79D presentan una unión de actividad muy reducida. Los experimentos *in vivo* indican que estos receptores no de activina conservan una capacidad significativa de incrementar los glóbulos rojos, aunque muestran efectos reducidos sobre otros tejidos. Estos datos demuestran la deseabilidad y viabilidad de la obtención de polipéptidos con efectos reducidos sobre la activina. Los métodos indicados en la presente memoria pueden utilizar un polipéptido trampa de GDF que es un polipéptido ActRIIB variante que comprende un aminoácido ácido (p.ej., D o E) en la posición correspondiente a la posición 79 de SEC ID nº 1 o 39, opcionalmente en combinación con una o más sustituciones, adiciones o deleciones adicionales de aminoácidos.

Las variaciones indicadas pueden combinarse de diversas maneras. Adicionalmente, los resultados del programa de mutagénesis indicado en la presente memoria indican que existen posiciones de aminoácidos en ActRIIB que con frecuencia resulta beneficioso conservar. Entre ellas se incluyen la posición 64 (aminoácido básico), la posición 80 (aminoácido ácido o hidrofóbico), la posición 78 (aminoácido hidrofóbico, y particularmente el triptófano), la posición 37 (ácido, y particularmente el ácido aspártico o glutámico), la posición 56 (aminoácido básico), la posición 60 (aminoácido hidrofóbico, particularmente fenilalanina o tirosina). De esta manera, en cada una de las variantes dadas a conocer en la presente memoria, la exposición proporciona un marco de aminoácido que puede conservarse. Otras posiciones que puede resultar deseable conservar son las siguientes: la posición 52 (aminoácido ácido), la posición 55 (aminoácido básico), la posición 81 (ácido), la 98 (polar o cargado, particularmente E, D, R o K).

Los fragmentos aislados de los polipéptidos ActRIIB pueden obtenerse mediante el cribado de polipéptidos producidos recombinantemente a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico codificante de un polipéptido ActRIIB (p.ej., SEC ID nº 4 y 5). Además, pueden sintetizarse químicamente fragmentos utilizando técnicas conocidas, tales como la química f-Moc o t-Boc de fase sólida de Merrifield convencional. Los fragmentos pueden producirse (recombinantemente o mediante síntesis química) y someterse a ensayo para identificar aquellos fragmentos peptídico que pueden funcionar, por ejemplo, como antagonistas (inhibidores) o agonistas (activadores) de una proteína ActRIIB o un ligando de ActRIIB.

En la presente memoria se da a conocer un polipéptido trampa de GDF que es un polipéptido ActRIIB variante que presenta una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 75% idéntica a una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 o 41. En determinados casos, la trampa de GDF presenta una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEC ID nº 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 o 41. La trampa de GDF puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en, una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEC ID nº 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 o 41, en la que la posición correspondiente a L79 de la SEC ID nº 1 es un aminoácido ácido (p.ej., un residuo aminoácido D o E).

La presente invención contempla producir variantes funcionales mediante la modificación de la estructura de un polipéptido trampa de GDF para dichos fines como potenciar la eficacia terapéutica o la estabilidad (p.ej., la vida útil *ex vivo* y la resistencia a la degradación proteolítica *in vivo*). Los polipéptidos trampa de GDF también pueden producirse mediante sustitución, delección o adición de aminoácidos. Por ejemplo, resulta razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina, o una sustitución similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado (p.ej., mutaciones conservadoras) no presentará un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Las sustituciones conservadoras son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que se relacionan por sus cadenas laterales. Si un cambio de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido trampa de GDF resulta en una variante funcional puede determinarse fácilmente mediante la evaluación de la capacidad del polipéptido trampa de GDF de producir una respuesta en células respecto al polipéptido trampa de GDF no modificado o un polipéptido ActRIIB de tipo salvaje, o de unirse a uno o más ligandos, tal como activina, GDF-11 o miostatina en comparación con el polipéptido trampa de GDF no modificado o un polipéptido ActRIIB de tipo salvaje.

La presente invención contempla producir mutaciones en el dominio extracelular (también denominado dominio de unión a ligando) de un polipéptido ActRIIB, tal como el polipéptido ActRIIB presenta actividades de unión a ligando alteradas (p.ej., afinidad de unión o especificidad de unión). En determinados casos, dichos polipéptidos trampa de GDF presentan afinidad de unión alterada (elevada o reducida) para un ligando específico. En otros casos, los polipéptidos trampa de GDF presentan una especificidad de unión alterada para ligandos de ActRIIB.

Por ejemplo, la exposición proporciona polipéptidos trampa de GDF que se unen preferentemente a GDF8/GDF11 respecto a las activinas. La exposición establece además la deseabilidad de dichos polipéptidos para reducir efectos fuera de diana, aunque tales variantes selectivas pueden resultar menos deseable para el tratamiento de enfermedades graves, en las que pueden requerirse ganancias muy grandes de los niveles de glóbulos rojos para el efecto terapéutico y en donde resulta aceptable cierto nivel de efecto fuera de diana. Por ejemplo, los residuos aminoácidos de la proteína ActRIIB, tal como E39, K55, Y60, K74, W78, D80 y F101 son el bolsillo de unión a ligando y median en la unión a sus ligandos, tales como la activina y GDF8. De esta manera, la presente exposición proporciona una trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando alterado (p.ej., un dominio de unión a GDF8) de un receptor de ActRIIB, que comprende una o más mutaciones en dichos residuos aminoácidos. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado puede presentar una selectividad incrementada para un ligando, tal como GDF8 respecto a un dominio de unión a ligando de tipo salvaje de un receptor de ActRIIB. A título ilustrativo, estas mutaciones incrementan la selectividad del dominio de unión a ligando alterado para GDF8 respecto a la activina. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado presenta una proporción de K_d para la unión a activina a K_d para la unión de GDF8 que es por lo menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces superior respecto a la proporción para el dominio de unión a ligando de tipo salvaje. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado presenta una proporción de IC_{50} para la inhibición de la actividad a IC_{50} para la inhibición de GDF8 que es por lo menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces superior respecto al dominio de unión a ligando de tipo salvaje. Opcionalmente, el dominio de unión

a ligando alterado inhibe IGF8 con una IC_{50} por lo menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces inferior a la IC_{50} para la inhibición de la activina.

A modo de ejemplo específico, el residuo aminoácido cargado positivamente Asp (D80) del dominio de unión a ligando de ActRIIB puede mutarse en un residuo aminoácido diferente para producir un polipéptido trampa de GDF que se une preferentemente a GDF8, pero no a activina. Preferentemente, el residuo D80 se cambia por un residuo aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: un residuo aminoácido no cargado, un residuo aminoácido negativo y un residuo aminoácido hidrofóbico. A título de ejemplo específico adicional, el residuo hidrofóbico L79 puede alterarse a los aminoácidos ácido aspártico o ácido glutámico para reducir mucho la unión de la activina, conservando simultáneamente la unión de GDF11. Tal como reconocerá el experto en la materia, la mayoría de las mutaciones, variantes o modificaciones indicadas pueden realizarse en el nivel de los ácidos nucleicos o, en algunos casos, mediante modificación post-traduccional o síntesis química. Dichas técnicas son bien conocidas.

La presente invención contempla los polipéptidos trampa de GDF que presentan mutaciones específicas en ActRIIB, de manera que se altera la glucosilación del polipéptido ActRIIB. Los sitios de glucosilación ejemplares en los polipéptidos trampa de GDF se ilustran en la figura 1 (p.ej., los sitios de NX(S/T) subrayados). Dichas mutaciones pueden seleccionarse para introducir o eliminar uno o más sitios de glucosilación, tal como sitios de glucosilación unidos a O o unidos a N. Los sitios de reconocimiento de glucosilación unidos a asparagina generalmente comprenden una secuencia de tripéptido, asparagina-X-treonina (donde "X" es cualquier aminoácido) que resulta específicamente reconocido por enzimas de glucosilación celulares apropiados. La alteración también puede llevarse a cabo mediante la adición o la sustitución de uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del polipéptido ActRIIB de tipo salvaje (para los sitios de glucosilación ligados a O). Una diversidad de sustituciones o deleciones de aminoácidos en uno o ambos de la primera o tercera posiciones aminoácidas de un sitio de reconocimiento de glucosilación (y/o una deleción de aminoácido en la segunda posición) resulta en la no glucosilación en la secuencia de tripéptido modificada. Otros medios para incrementar el número de fracciones carbohidrato en un polipéptido trampa de GDF es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos con el polipéptido trampa de GDF. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el azúcar o azúcares pueden unirse a: (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres, tales como los de las cisteínas, (d) grupos hidroxilo libres, tales como las de la serina, la treonina o la hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos, tales como los de la fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en el documento n° WO 87/05330 y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306, 1981. La eliminación de una o más fracciones carbohidrato presentes en el polipéptido trampa de GDF puede llevarse a cabo química y/o enzimáticamente. La desglucosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido trampa de GDF al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento resulta en el corte de la mayoría o todos los sacáridos excepto el sacárido de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando intacta la secuencia de aminoácidos. La desglucosilación química se describe adicionalmente en Hakimuddin et al., Arch. Biochem. Biophys. 259:52, 1987 y en Edge et al. Anal. Biochem. 118:131, 1987. El corte enzimático de las fracciones carbohidrato en los polipéptidos trampa de GDF puede llevarse a cabo mediante la utilización de una diversidad de endoglucosidasas y exoglucosidasas tal como se indica en Thotakura et al., Meth. Enzymol. 138:350, 1987. La secuencia de un polipéptido trampa de GDF puede ajustarse, según resulte apropiado, dependiendo del tipo de sistema de expresión utilizado, ya que las células de mamífero, levadura, insecto y vegetales pueden introducirse todas diferentes patrones de glucosilación que pueden resultar afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, los polipéptidos trampa de GDF para la utilización en el ser humano se expresarán en una línea celular de mamífero que proporcione una glucosilación apropiada, tal como las líneas celulares HEK293 o CHO, aunque se espera que también resulten útiles otras líneas celulares de expresión de mamífero.

La presente exposición contempla además un método para generar variantes, particularmente conjuntos de variantes combinatorias de un polipéptido trampa de GDF, incluyendo, opcionalmente, variantes por truncado; los pools de mutantes combinatoriales resultan especialmente útiles para identificar las secuencias de trampa de GDF. El propósito del cribado de dichas bibliotecas combinatoriales puede ser la generación de, por ejemplo, variantes de polipéptido trampa de GDF que presentan propiedades alteradas, tales como una farmacocinética alterada, o una unión a ligando alterada. Se proporcionan posteriormente una diversidad de ensayos de cribado, y dichos ensayos pueden utilizarse para evaluar variantes. Por ejemplo, una variante de polipéptido trampa de GDF puede cribarse para la capacidad de unirse a un polipéptido ActRIIB, para evitar la unión de un ligando de ActRIIB a un polipéptido ActRIIB o para interferir con la señalización causada por un ligando de ActRIIB.

La actividad de un polipéptido trampa de GDF o sus variantes también puede someterse a ensayo en un ensayo celular o *in vivo*. Por ejemplo, puede evaluarse el efecto de una variante de polipéptido trampa de GDF sobre la expresión de genes que participan en la hematopoyesis. Lo anterior puede llevarse a cabo, según se requiera, en presencia de una o más proteínas de ligando de ActRIIB recombinantes (p.ej., activina) y las células pueden transfectarse de manera que produzcan un polipéptido trampa de GDF y/o variantes del mismo, y opcionalmente, un ligando de ActRIIB. De manera similar, puede administrarse un polipéptido trampa de GDF en un ratón u otro animal, y realizarse una o más mediciones en la sangre, tal como un recuento de GR, niveles de hemoglobina, niveles de hematócrito, reservas de hierro, o recuento de reticulocitos, que pueden evaluarse utilizando métodos reconocidos de la técnica.

Pueden generarse variantes derivadas combinatorialmente que presentan una potencia selectiva respecto a un polipéptido trampa de GDF de referencia. Tales proteínas variantes, al expresarse a partir de constructos de ADN recombinante, pueden utilizarse en protocolos de terapia génica. De manera similar, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que presentan semividas intracelulares drásticamente diferentes de las del polipéptido trampa no modificado correspondiente. Por ejemplo, la proteína alterada puede convertirse en más estable o menos estable frente a la degradación proteolítica u otros procesos que resultan en la destrucción o, de otro modo, la inactivación de un polipéptido trampa de GDF no modificado. Dichas variantes, y los genes que las codifican, pueden utilizarse para alterar los niveles de polipéptido trampa de GDF mediante la modulación de la semivida de los polipéptidos trampa de GDF. Por ejemplo, una semivida corta puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y, en el caso de que sean parte de un sistema de expresión inducible, pueden permitir un control más estrecho de los niveles de polipéptido trampa de GDF recombinante dentro de la célula. En una proteína de fusión de Fc, pueden producirse mutaciones en el conector (si alguna) y/o la parte Fc para alterar la semivida de la proteína.

Los polipéptidos trampa de GDF para la utilización en la invención pueden comprender además modificaciones post-traduccionales además de las naturalmente presentes en los polipéptidos ActRIIB. Entre dichas modificaciones se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos trampa de GDF pueden contener elementos no aminoácidos, tales como polietilenglicoles, lípidos polisacáridos o monosacáridos, y fosfatos. Los efectos de dichos elementos no aminoácidos sobre la funcionalidad de un polipéptido trampa de GDF pueden someterse a ensayo tal como se indica en la presente memoria para otras variantes de polipéptido trampa de GDF. En el caso de que se produzca un polipéptido trampa de GDF en células mediante el corte de una forma naciente del polipéptido trampa de GDF, el procesamiento post-traducciona también puede resultar importante para el plegamiento y/o función correctos de la proteína. Diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) presentan una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades post-traduccionales y pueden seleccionarse para garantizar la modificación y procesamiento correctos de los polipéptidos trampa de GDF.

Entre los polipéptidos trampa de GDF pueden incluirse proteínas de fusión que presentan por lo menos una parte de un polipéptido ActRIIB y uno o más dominios de fusión. Entre los ejemplos bien conocidos de dichos dominios de fusión se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, polihistidina, Glu-Glu, glutatión-S-transferasa (GST), tiorredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (p.ej., un Fc), proteína de unión a maltosa (MBP, por sus siglas en inglés) o albúmina sérica humana. Un dominio de fusión puede seleccionarse para que proporcione una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión resultan particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad. Para el propósito de la purificación de afinidad, se utilizan matrices relevantes para la cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas con glutatión, amilasa, y níquel o cobalto. Muchas de tales matrices se encuentran disponibles en forma de "kit", tal como el sistema de purificación GST de Pharmacia y el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil con parejas de fusión (HIS₆). Como otro ejemplo, puede seleccionarse un dominio de fusión de manera que facilite la detección de los polipéptidos trampa de GDF. Entre los ejemplos de dichos dominios de detección se incluyen las diversas proteínas fluorescentes (p.ej., GFP), así como "etiquetas epítipo", que habitualmente son secuencias de péptido cortas para las que se encuentra disponible un anticuerpo específico. Entre las etiquetas epítipo bien conocidas para las que se encuentran fácilmente disponibles anticuerpos monoclonales específicos se incluyen FLAG, hemaglutinina del virus influenza (HA) y etiquetas c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión presentan un sitio de corte de proteasa, tal como Factor Xa o trombina, que permiten que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y, de esta manera, liberen las proteínas recombinantes a partir de las mismas. Las proteínas liberadas a continuación pueden aislarse a partir del dominio de fusión mediante la posterior separación cromatográfica. Un polipéptido trampa de GDF puede fusionarse con un dominio que estabiliza el polipéptido trampa de GDF *in vivo* (un dominio "estabilizador"). El término "estabilizador" se refiere a cualquier elemento que incremente la semivida sérica, con independencia de si ello se debe a una menor destrucción, un menor lavado por el riñón u otro efecto farmacocinético. Las fusiones con la parte Fc de una inmunoglobulina es conocido que proporcionan propiedades farmacocinéticas deseables en un amplio abanico de proteínas. De manera similar, las fusiones con albúmina sérica humana pueden proporcionar propiedades deseables. Entre otros tipos de dominios de fusión que pueden seleccionarse se incluyen dominios multimerizantes (p.ej., dimerizantes, tetramerizantes) y dominios funcionales (que proporcionan una función biológica adicional, tal como el incremento adicional de los niveles de glóbulos rojos).

Como ejemplo específico, la presente exposición proporciona una trampa de GDF que es una proteína de fusión de ActRIIB-Fc que comprende un dominio extracelular (p.ej., de unión a ligando) del polipéptido ActRIIB fusionado con un dominio Fc. La secuencia de un dominio Fc ejemplar se muestra posteriormente (SEC ID n° 6).

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

Opcionalmente, el dominio Fc presenta una o más mutaciones en residuos tales como Asp-265, lisina-322 y Asn-434. En determinados casos, el dominio Fc mutante que presenta una o más de dichas mutaciones (p.ej., mutación Asp-265) presenta una capacidad reducida de unión al receptor de Fc γ respecto a un dominio Fc de tipo salvaje. En otros casos, el dominio Fc mutante que presenta una o más de dichas mutaciones (p.ej., la mutación Asn-434) presenta una capacidad incrementada de unión al receptor Fc relacionado con el CMH de clase I (FcRN) respecto al dominio Fc de tipo salvaje.

Se entiende que pueden organizarse diferentes elementos de las proteínas de fusión de cualquier manera que sea consistente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, puede introducirse un polipéptido trampa de GDF C-terminalmente respecto a un dominio heterólogo, o alternatively, puede introducirse un dominio heterólogo C-terminalmente respecto a un polipéptido trampa de GDF. El dominio polipéptido trampa de GDF y el dominio heterólogo no necesitan ser contiguos en una proteína de fusión, y pueden incluirse dominios o secuencias de aminoácidos adicionales C-terminal o N-terminalmente a cualquier dominio o entre los dominios.

Una proteína de fusión de trampa de GDF puede comprender una secuencia de aminoácidos tal como se indica en la fórmula A-B-C. La parte B es un polipéptido ActRIIB truncado N-terminalmente y C-terminalmente que consiste en la secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 26 a 132 de la SEC ID nº 26. Las partes A y C pueden ser independientemente cero, uno o más de un aminoácido, y ambas partes, A y C, en caso de estar presentes, son heterólogas respecto a B. Las partes A y/o C pueden unirse a la parte B mediante una secuencia conectora. Entre los conectores ejemplares se incluyen conectores polipeptídicos cortos, tales como 2-10, 2-5, 2-4, 2-3 residuos de glicina, tal como, por ejemplo, un conector Gly-Gly-Gly. Otros conectores adecuados se indican anteriormente en la presente memoria. Una proteína de fusión de trampa de GDF puede comprender una secuencia de aminoácidos tal como se indica en la fórmula A-B-C, en la que A es una secuencia líder, B consiste en los aminoácidos 26 a 132 de la SEC ID nº 26 y C es una parte polipéptido que potencia uno o más de estabilidad *in vivo*, semivida *in vivo*, incorporación/administración, localización o distribución en tejidos, formación de complejos de proteínas, y/o purificación. Una proteína de fusión de trampa de GDF puede comprender una secuencia de aminoácidos tal como se indica en la fórmula A-B-C, en la que A es una secuencia de líder TPA, B consiste en los aminoácidos 26 a 132 de SEC ID nº 26, y C es un dominio Fc de inmunoglobulina. Una proteína de fusión de trampa de GDF preferente comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID nº 26.

Los polipéptidos trampa de GDF para la utilización en la presente invención pueden contener una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos trampa de GDF. Por ejemplo, dichas modificaciones potencian la semivida *in vitro* de los polipéptidos trampa de GDF, potencian la semivida circulatoria de los polipéptidos trampa de GDF o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos trampa de GDF. Entre dichas modificaciones estabilizadoras se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, proteínas de fusión (incluyendo, por ejemplo, proteínas de fusión que comprenden un polipéptido trampa de GDF y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glucosilación (incluyendo, por ejemplo, la adición de un sitio de glucosilación a un polipéptido trampa de GDF) y modificaciones de fracción carbohidrato (incluyendo, por ejemplo, la eliminación de fracciones carbohidrato a partir de un polipéptido trampa de GDF). En el caso de las proteínas de fusión, se fusiona un polipéptido trampa de GDF con un dominio estabilizador, tal como una molécula de IgG (p.ej., un dominio Fc). Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "dominio estabilizador" no sólo se refiere a un dominio de fusión (p.ej., Fc) tal como en el caso de las proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteicas, tales como una fracción carbohidrato, o polímero no proteico, tal como polietilenglicol.

La presente exposición pone a disposición formas aisladas y/o purificadas de los polipéptidos trampa de GDF, que se aíslan a partir de, o de otro se encuentran sustancialmente libres de, otras proteínas.

Los polipéptidos trampa de GDF (no modificados o modificados) pueden producirse mediante una diversidad de técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos polipéptidos trampa de GDF pueden sintetizarse utilizando técnicas químicas estándares de proteínas, tales como las indicadas en Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993) y Grant G. A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, New York (1992). Además, se encuentran comercialmente disponibles sintetizadores automatizados de proteínas (p.ej., Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Biosearch 9600). Alternativamente, los polipéptidos trampa de GDF, fragmentos o variantes de los mismos, pueden producirse recombinantemente utilizando diversos sistemas de expresión (p.ej., *E. coli*, células de ovario de hámster chino (CHO), células COS, baculovirus), tal como es bien conocido de la técnica. Los polipéptidos trampa de GDF modificados o no modificados pueden producirse mediante digestión de polipéptidos trampa de GDF de longitud completa producidos recombinantemente mediante la utilización, por ejemplo, una proteasa, p.ej., tripsina, termolisina, quimotripsina, pepsina o enzima conversor de aminoácidos básicos emparejado (PACE, por sus siglas a inglés). El análisis informático (utilizando un software disponible comercialmente, p.ej., MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) puede utilizarse para identificar sitios de corte proteolítico. Alternativamente, pueden producirse dichos polipéptidos trampa de GDF a partir de polipéptidos trampa de GDF de longitud completa producidos recombinantemente, tal como técnicas estándares conocidas, tal como mediante corte químico (p.ej., bromuro de cianógeno, hidroxilamina).

3. Ácidos nucleicos codificantes de polipéptidos trampa de GDF

En la presente memoria se dan a conocer ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes codificantes de cualquiera de los polipéptidos trampa de GDF dados a conocer en la presente memoria. La SEC ID nº 4 codifica un polipéptido precursor de ActRIIB natural, mientras que SEC ID nº 5 codifica un polipéptido ActRIIB soluble, y las SEC ID nº 25, 27, 30 y 31 codifican trampas de GDF solubles. Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser de cadena sencilla o de doble cadena. Dichos ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Estos ácidos nucleicos pueden utilizarse, por ejemplo, en métodos de producción de polipéptidos trampa de GDF o como agentes terapéuticos directos (p.ej., en un enfoque de terapia génica).

Los ácidos nucleicos de la invención codificante polipéptidos trampa de GDF se entiende adicionalmente que incluyen ácidos nucleicos que son variantes de las SEC ID nº 5, 25, 27, 30 y 31. Entre las secuencias de nucleótidos variantes se incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos, tales como variantes alélicas y, por lo tanto, incluirán secuencias codificantes que difieren de la secuencia de nucleótidos de la secuencia codificante designada en las SEC ID nº 5, 25, 27, 30 y 31.

En la presente memoria se dan a conocer secuencias de ácidos nucleicos aisladas o recombinantes que son por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticas a la SEC ID Nº 5, 25, 27, 30 o 31. El experto ordinario en la materia apreciará que secuencias de ácidos nucleicos complementarias a SEC ID nº 5, 25, 27, 30 o 31 y variantes de SEC ID nº 5, 25, 27, 30 o 31 también se dan a conocer en la presente memoria. Las secuencias de ácidos nucleicos pueden aislarse, recombinarse y/o fusionarse con una secuencia de nucleótidos heteróloga, o en una biblioteca de ADN.

Entre los ácidos nucleicos dados a conocer en la presente memoria se incluyen además secuencias de nucleótidos que se hibridan bajo condiciones altamente restrictivas a la secuencia de nucleótidos designada en SEC ID nº 5, 25, 27, 30 o 31 o complementan la secuencia SEC ID nº 5, 25, 27, 30 o 31 o fragmentos de la misma. Tal como se ha comentado anteriormente, el experto ordinario en la materia entenderá fácilmente que pueden variarse las condiciones de astringencia apropiadas que estimulan la hibridación del ADN. Por ejemplo, podría llevarse a cabo la hibridación a 6,0 x cloruro sódico/citrato sódico (SSC, por sus siglas en inglés) a aproximadamente 45°C seguido de un lavado de 2,0 x SSC a 50°C. Por ejemplo, la concentración salina en la etapa de lavado puede seleccionarse de una astringencia baja de aproximadamente 2,0 x SSC a 50°C con una astringencia elevada de aproximadamente 0,2 x SSC a 50°C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede incrementarse de condiciones de baja astringencia a temperatura ambiente, aproximadamente 22°C a condiciones de alta astringencia a aproximadamente 65°C. Puede modificarse tanto la temperatura como la sal, o pueden mantenerse constantes la temperatura o la concentración salina, mientras que se modifica la otra variable. En la presente memoria se dan a conocer ácidos nucleicos que se hibridan bajo condiciones de astringencia baja de 6 x SSC a temperatura ambiente seguido de un lavado a 2 x SSC a temperatura ambiente.

También se dan a conocer en la presente memoria ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos tal como se indican en SEC ID nº 5, 25, 27, 30 o 31 debido a la degeneración del código genético. Por ejemplo, varios aminoácidos se designan mediante más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos para la histidina) pueden resultar en mutaciones "silenciosas" que no afectan a la secuencia de aminoácidos de la proteína. El polipéptido trampa de GDF puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos alternativa. Las secuencias de nucleótidos alternativas son degeneradas con respecto a la secuencia de ácidos nucleicos de la trampa de GDF nativa pero todavía codificante la misma proteína de fusión. La trampa de GDF que presenta la SEC ID nº 26 puede estar codificada por una secuencia alternativa de ácidos nucleicos que comprende la SEC ID nº 30. Sin embargo, se espera que los polimorfismos en la secuencia de ADN que no conducen a cambios en la secuencia de aminoácidos de las proteínas de la invención existirán entre las células de mamífero. El experto en la materia apreciará que estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente 3-5% de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos codificantes de una proteína particular pueden existir entre individuos de una especie dada debido a la variación alélica natural. Todas y cada una de dichas variaciones de nucleótidos y polimorfismos de aminoácidos resultantes se dan a conocer en la presente memoria.

Los ácidos nucleicos recombinantes dados a conocer en la presente memoria pueden ligarse operablemente a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras en un constructo de expresión. Las secuencias de nucleótidos reguladoras generalmente resultarán apropiadas para la célula huésped utilizada para la expresión. Se conocen de la técnica numerosos tipos de vectores de expresión apropiados, y secuencias reguladoras adecuadas, para una diversidad de células huésped. Típicamente, dicha secuencias o secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, aunque sin limitarse a ellas, secuencias de promotor, secuencias líder o de señal, sitios de unión ribosómica, secuencias de inicio y terminación transcripcional, secuencias de inicio y terminación traduccional, y secuencias intensificadoras o activadoras. Se encuentran contemplados promotores constitutivos o inducibles tal como se conocen de la técnica. Los promotores pueden ser promotores naturales o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Puede encontrarse presente un constructo de expresión en una célula en un episoma, tal como un plásmido, o el constructo de expresión puede insertarse en un cromosoma. Preferentemente, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de las células huésped transformadas. Los genes marcadores seleccionables son bien conocidos de la técnica y varían según la célula huésped utilizada.

El ácido nucleico de la invención puede proporcionarse en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido trampa de GDF y operablemente ligado a por lo menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras son secuencias reconocidas de la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido trampa de GDF. De acuerdo con lo anterior, la expresión secuencia reguladora incluye promotores, intensificadores y otros elementos de control de la expresión. Se describen secuencias reguladoras ejemplares en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, puede utilizarse en estos vectores para expresar secuencias de ADN codificantes de un polipéptido trampa de GDF una amplia diversidad de secuencias de control de la expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN en el caso de que se encuentren operablemente ligadas. Entre dichas secuencias de control de la expresión útiles se incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío de SV40, el promotor tet, el promotor temprano inmediato de adenovirus o citomegalovirus, los promotores del VSR, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor de T7 cuya expresión es dirigida por la ARN polimerasa de T7, las regiones de operador y promotor mayores del fago lambda, las regiones de control para la proteína de cubierta fd, el promotor para la 3-fosfoglicerato quinasa u otros enzimas glucolíticos, los promotores de fosfatasa ácida, p.ej., Pho5, los promotores de los factores de apareamiento α de levadura, el promotor polihédrico del sistema baculovirus y otras secuencias que es conocido que controlan la expresión de genes de las células procarióticas o eucarióticas o sus virus, y diversas combinaciones de los mismos. Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que debe transformarse y/o del tipo de proteína que se desea expresar. Además, el número de copia del vector, la capacidad de controlar ese número de copia y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como marcadores antibióticos, también debería considerarse.

Puede producirse un ácido nucleico recombinante mediante ligación del gen clonado, o una parte del mismo, en un vector adecuado para la expresión en células procarióticas, células eucarióticas (levaduras, de ave, de insecto o de mamífero), o en ambas. Entre los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido trampa de GDF recombinante se incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, entre los vectores adecuados se incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para la expresión en células procarióticas, tales como *E. coli*.

Algunos vectores de expresión de mamífero contienen secuencias procarióticas para facilitar la propagación del vector en bacterias, y una o más unidades de transcripción eucarióticas que se expresan en células eucarióticas. Los vectores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamífero adecuados para la transfección de células eucarióticas. Algunos de dichos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y la selección de resistencia a fármaco en células tanto procarióticas como eucarióticas. Alternativamente, pueden utilizarse derivados de virus, tales como el virus del papiloma bovino (VPB), o el virus de Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) para la expresión transitoria de proteínas en células eucarióticas. Pueden encontrarse ejemplos de otros sistemas de expresión vírica (incluyendo retrovírica) posteriormente en la descripción de sistemas de administración de terapia génica. Los diversos métodos utilizados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos huésped son bien conocidos de la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados para células tanto procarióticas como eucarióticas, así como procedimientos generales de recombinación, ver *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2a ed., ed. de Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) capítulos 16 y 17. En algunos casos, puede resultar deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante la utilización de un sistema de expresión baculovirus. Entre los ejemplos de dichos sistemas de expresión baculovirus se incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tales como pAcUW1) y vectores derivados de pBlueBac (tales como pBlueBac III que contiene β -gal).

Preferentemente, se diseña un vector para la producción de los polipéptidos trampa de GDF de la invención en células CHO, tal como un vector pCMV-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wisc.). Tal como resultará evidente, los constructos génicos de la invención pueden utilizarse para causar la expresión de los polipéptidos trampa de GDF de la invención en células propagadas en cultivo, p.ej., para producir proteínas, incluyendo proteínas de fusión o proteínas variantes, para la purificación.

La presente exposición se refiere además a una célula huésped transfectada con un gen recombinante, incluyendo una secuencia codificante (p.ej., SEC ID nº 4, 5, 25, 27, 30 o 31) para uno o más de los polipéptidos trampa de GDF de la invención. La célula huésped puede ser una célula procariótica o eucariótica. Por ejemplo, un polipéptido trampa de GDF para la utilización en la invención puede expresarse en células bacterianas, tales como *E. coli*, células de insecto (p.ej., utilizando un sistema de expresión baculovirus), levaduras o células de mamífero. El experto en la materia conoce otras células huésped adecuadas.

De acuerdo con lo anterior, la presente exposición se refiere además a métodos para producir los polipéptidos trampa de GDF de la invención. Por ejemplo, puede cultivarse una célula huésped con un vector de expresión codificante de un polipéptido trampa de GDF bajo condiciones apropiadas para permitir que se produzca la expresión del polipéptido trampa de GDF. El polipéptido trampa de GDF puede secretarse y aislarse a partir de una mezcla de células y medio

que contiene el polipéptido trampa de GDF. Alternativamente, el polipéptido trampa de GDF puede conservarse citoplasmáticamente o en una fracción membranal y se recolectaron y lisaron las células y se aisló la proteína. Un cultivo celular incluye células huésped, medio y otros productos secundarios. Los medios adecuados para el cultivo celular son bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos trampa de GDF de la invención pueden aislarse a partir del medio de cultivo celular, células huésped o ambos, utilizando técnicas conocidas para purificar proteínas, incluyendo la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de filtración en gel, la ultrafiltración, la electroforesis y la purificación de inmunoadinidad con anticuerpos específicos para epítopos particulares de los polipéptidos trampa de GDF. El polipéptido trampa de GDF puede ser una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación.

Un gen de fusión codificante para una secuencia líder de purificación, tal como una secuencia de sitio de corte de poli-(His)/enteroquinasa en el extremo N-terminal de la parte deseada del polipéptido trampa de GDF recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina de metal Ni^{2+} . La secuencia líder de purificación a continuación puede eliminarse mediante tratamiento con enteroquinasa, proporcionando el polipéptido trampa de GDF purificado (p.ej., ver Hochuli et al., J. Chromatography 411:177, 1987, y Janknecht et al., PNAS USA 88:8972).

Las técnicas para producir genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, la unión de diversos fragmentos de ADN para diferentes secuencias de polipéptido se lleva a cabo de acuerdo con técnicas convencionales, utilizando extremos de extremo romo o extremos escalonados para la ligación, la digestión con enzima de restricción para proporcionar extremos apropiados, el rellenado de extremos cohesivos según resulte apropiado, el tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión no deseable y la ligación enzimática. El gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales, incluyendo sintetizadores automatizados de ADN. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos génicos puede llevarse a cabo utilizando cebadores de anclaje que dan lugar a extremos protuberantes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que posteriormente pueden aparearse para generar una secuencia génica quimérica (ver, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992, 1974).

4. Ensayos de cribado

En la presente memoria se da a conocer la utilización de polipéptidos trampa de GDF de la invención (p.ej., polipéptidos ActRIIB variantes solubles) para identificar compuestos (agentes) que son agonistas o antagonistas de polipéptidos ActRIIB. Los compuestos identificados mediante este cribado pueden someterse a ensayo para evaluar su capacidad de modular los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina y/o reticulocitos *in vivo* o *in vitro*. Estos compuestos pueden someterse a ensayo, por ejemplo, en modelos animales.

Existen numerosos enfoques para el cribado para agentes terapéuticos para incrementar los niveles de glóbulos rojos o de hemoglobina mediante la utilización de la señalización de ActRIIB como diana. El cribado de alto rendimiento de compuestos puede llevarse a cabo para identificar agentes que alteran los efectos mediados por ActRIIB en una línea celular seleccionada. El ensayo puede llevarse a cabo para cribar e identificar los compuestos que inhiben o reducen específicamente la unión de un polipéptido ActRIIB a su pareja de unión, tal como un ligando de ActRIIB (p.ej., activina, Nodal, GDF8, GDF11 o BMP7). Alternativamente, puede utilizarse el ensayo para identificar compuestos que potencian la unión de un polipéptido ActRIIB a su pareja de unión, tal como un ligando de ActRIIB. Los compuestos pueden identificarse por su capacidad de interactuar con un polipéptido ActRIIB.

Resultará suficiente una diversidad de formatos de ensayo y, a la luz de la presente exposición, aquellos no indicados expresamente en la presente memoria, sin embargo, serán comprendidos por el experto ordinario en la materia. Tal como se indica en la presente memoria, los compuestos (agentes) de ensayo dados a conocer en la presente memoria pueden crearse mediante cualquier método químico combinatorial. Alternativamente, los compuestos de la invención pueden ser biomoléculas naturales sintetizadas *in vivo* o *in vitro*. Pueden producirse compuestos (agentes) que deben someterse a ensayo para su capacidad de actuar como moduladores del crecimiento tisular, por ejemplo, por bacterias, levaduras, plantas u otros organismos (p.ej., productos naturales), producirse químicamente (p.ej., moléculas pequeñas, incluyendo peptidomiméticos), o producirse recombinantemente. Entre los compuestos de ensayo contemplados se incluyen moléculas orgánicas no peptídico, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas y moléculas de ácidos nucleicos. El agente de ensayo puede ser una molécula orgánica pequeña que presenta un peso molecular inferior a aproximadamente 2.000 daltons.

Los compuestos de ensayo dados a conocer en la presente memoria pueden proporcionarse en forma de entidades discretas individuales, o proporcionarse en bibliotecas de mayor complejidad, tal como las preparadas mediante química combinatorial. Estas bibliotecas pueden comprender, por ejemplo, alcoholes, haluros de alquilo, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de compuestos orgánicos. La presentación de compuestos de ensayo al sistema de ensayo puede ser en una forma aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en las etapas de cribado iniciales. Opcionalmente, los compuestos pueden derivatizarse opcionalmente con otros compuestos y presentan grupos derivatizantes que facilitan el aislamiento de los compuestos. Entre los ejemplos no limitativos de grupos derivatizantes se incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína fluorescente verde, isótopos,

polihistidina, perlas magnéticas, glutatión-S-transferasa (GST), entrecruzantes fotoactivables, o cualesquiera combinaciones de los mismos.

En muchos programas de cribado de fármacos que someten a ensayo las bibliotecas de ensayo de compuestos y extractos naturales, los ensayos de alto rendimiento resultan deseables para maximizar el número de compuestos investigados en un periodo de tiempo dado. Los ensayos que se llevan a cabo en sistemas libres de células, tales como pueden derivarse con proteínas purificadas o semipurificadas, con frecuencia resultan preferentes como cribados "primarios" en el aspecto de que pueden generarse para permitir el rápido desarrollo y detección relativamente sencilla de una alteración en una diana molecular que está mediada por un compuesto de ensayo. Además, los efectos de toxicidad celular o biodisponibilidad del compuesto de ensayo pueden ignorarse generalmente en el sistema *in vitro*, estando centrado principalmente el ensayo, por el contrario, en el efecto del fármaco sobre la diana molecular, según se manifieste como alteración de la afinidad de unión entre un polipéptido ActRIIB y su pareja de unión (p.ej., un ligando de ActRIIB).

Meramente a título ilustrativo, en un ensayo de cribado ejemplar, el compuesto de interés se pone en contacto con un polipéptido ActRIIB aislado y purificado que ordinariamente es capaz de unirse a un ligando de ActRIIB, según resulte apropiado para el objetivo del ensayo. A la mezcla del compuesto y polipéptido ActRIIB a continuación se añade una composición que contiene un ligando de ActRIIB. La detección y cuantificación de los complejos de ActRIIB/ligando de ActRIIB proporciona un medio para determinar la eficacia del compuesto en la inhibición (o potenciación) de la formación de complejo entre el polipéptido de ActRIIB y su proteína de unión. La eficacia del compuesto puede evaluarse mediante la generación de curvas de dosis-respuesta a partir de los datos obtenidos utilizando diversas concentraciones del compuesto de ensayo. Además, también puede llevarse a cabo un ensayo de control para proporcionar una línea base para la comparación. Por ejemplo, en un ensayo de control, se añade ligando de ActRIIB aislado y purificado a una composición que contiene el polipéptido ActRIIB y la formación de complejo de ActRIIB/ligando de ActRIIB se cuantifica en ausencia del compuesto de ensayo. Se entenderá que, en general, el orden en que pueden mezclarse los reactivos puede modificarse y pueden mezclarse simultáneamente. Además, en lugar de proteínas purificadas, pueden utilizarse extractos y lisados celulares para obtener un sistema de ensayo libre de células adecuado.

La formación de complejo entre el polipéptido ActRIIB y su proteína de unión puede detectarse mediante una diversidad de técnicas. Por ejemplo, la modulación de la formación de complejos puede cuantificarse utilizando, por ejemplo, proteínas detectablemente marcadas, tales como polipéptido ActRIIB marcado radioactivamente (p.ej., ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C o ^3H), marcado fluorescentemente (p.ej., FITC), o polipéptido ActRIIB marcado enzimáticamente o su proteína de unión, mediante inmunoensayo o mediante detección cromatográfica.

En la presente memoria se da a conocer la utilización de ensayos de polarización de la fluorescencia y ensayos de transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET, por sus siglas en inglés) en la medición, directa o indirecta, del grado de interacción entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. Además, pueden utilizarse otros modos de detección, tales como los basados en guíasondas ópticas (publicación de patente PCT n° WO 96/26432 y patente US n° 5.677.196), resonancia del plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés), sensores de carga superficial y sensores de fuerza superficial.

Además, en la presente memoria se da a conocer la utilización de un ensayo de trampa de interacción, también conocido como "ensayo de doble híbrido", para identificar agentes que rompen o potencian la interacción en un polipéptido ActRIIB y su pareja de unión. Ver, por ejemplo, la patente US n° 5.283.317; Zervos et al. Cell 72:223-232, 1993; Madura et al. J. Biol. Chem. 268:12046-12054, 1993; Bartel et al. Biotechniques 14:920-924, 1993 y Iwabuchi et al. Oncogene 8:1693-1696, 1993). En la presente memoria se da a conocer la utilización de sistemas de doble híbrido inverso para identificar compuestos (p.ej., moléculas pequeñas o péptidos) que disocian interacciones entre un polipéptido de ActRIIB y su proteína de unión. Ver, por ejemplo, Vidal y Legrain, Nucleic Acids Res. 27:919-29, 1999; Vidal y Legrain, Trends Biotechnol 17:374-81, 1999 y patente US 5.525.490, n° 5.955.280 y n° 5.965.368.

Los compuestos de la invención pueden identificarse por su capacidad de interactuar con un polipéptido ActRIIB. La interacción entre el compuesto y el polipéptido ActRIIB puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, dicha interacción puede identificarse al nivel de proteína utilizando métodos bioquímicos *in vitro*, incluyendo el fotoencruzamiento, la unión de ligandos marcados radioactivamente y la cromatografía de afinidad (Jakoby WB et al., Methods in Enzymology 46: 1, 1974). En determinados casos, los compuestos pueden cribarse en un ensayo basado en el mecanismo, tal como un ensayo para detectar compuestos que se unen a un polipéptido ActRIIB. Esto puede incluir un suceso de unión en fase sólida o en fase fluida. Alternativamente, el gen codificante de un polipéptido ActRIIB puede transfectarse con un sistema informador (p.ej., β -galactosidasa, luciferasa o proteína fluorescente verde) en una célula y cribarse frente a la biblioteca preferentemente mediante un cribado de alto rendimiento o con miembros individuales de la biblioteca. Pueden utilizarse otros ensayos de unión basados en el mecanismo, por ejemplo ensayo de unión que detectan cambios en la energía libre. Pueden llevarse a cabo ensayos de unión con las dianas fijas a un pocillo, perla o chip, o capturarse mediante un anticuerpo inmovilizado o resolverse mediante electroforesis capilar. Los compuestos unidos pueden detectarse habitualmente utilizando colorimetría, fluorescencia o resonancia del plasmón superficial.

5. Usos terapéuticos ejemplares

Los polipéptidos trampa de GDF dados a conocer en la presente memoria pueden utilizarse para incrementar los niveles de glóbulos rojos en mamíferos, tales como roedores y primates, y particularmente pacientes humanos. En la presente memoria se dan a conocer métodos de tratamiento o prevención de anemia en un individuo que lo necesita, mediante la administración en el individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido trampa de GDF. Estos métodos pueden utilizarse para tratamientos terapéuticos y profilácticos de mamíferos, y particularmente seres humanos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un terapéutico que “bloquea” un trastorno o condición se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la incidencia del trastorno o condición en la muestra tratada respecto a una muestra de control no tratada, o retrasa la aparición o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o condición respecto a la muestra de control no tratada. El término “tratando” tal como se utiliza en la presente memoria incluye la profilaxis de la condición, mejora o eliminación nombrada de la condición una vez se ha establecido. En cualquier caso, la prevención o tratamiento puede determinarse en el diagnóstico proporcionado por un médico u otro profesional sanitario y el resultado deseado de la administración del agente terapéutico.

Tal como se muestra en la presente memoria, los polipéptidos trampa de GDF pueden utilizarse para incrementar los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina o reticulocitos en individuos sanos, y dichos polipéptidos trampa de GDF pueden utilizarse en poblaciones de pacientes seleccionadas. Entre los ejemplos de poblaciones de pacientes apropiadas se incluyen las que presentan niveles indeseablemente bajos de glóbulos rojos o hemoglobina, tales como pacientes que presentan una anemia, y los que presentan riesgo de desarrollar niveles indeseablemente bajos de glóbulos rojos o hemoglobina, tales como los pacientes que están a punto de someterse a cirugía mayor u otros procedimientos que pueden resultar en una pérdida sustancial de sangre. Un paciente con niveles adecuados de glóbulos rojos puede tratarse con un polipéptido trampa de GDF para incrementar los niveles de glóbulos rojos y después se extrae sangre y se almacena para el uso posterior en transfusiones.

Pueden utilizarse polipéptidos trampa de GDF dados a conocer en la presente memoria para incrementar los niveles de glóbulos rojos en pacientes que presentan una anemia. Al observar los niveles de hemoglobina en seres humanos, un nivel inferior al normal para la edad y categoría de género puede ser indicativo de anemia, aunque se consideran las variaciones individuales. Por ejemplo, un nivel de hemoglobina de 12 g/dl generalmente se considera el límite inferior de la normalidad en la población adulta general. Entre las causas potenciales se incluyen la pérdida de sangre, déficits alimentarios, reacción a la medicación, diversos problemas con la médula ósea y muchas enfermedades. Más particularmente, la anemia se ha asociado a una diversidad de trastornos, entre ellos, por ejemplo, la insuficiencia renal crónica, el síndrome mielodisplásico, la artritis reumatoide y el trasplante de médula ósea. La anemia también puede estar asociada a las condiciones siguientes: tumores sólidos (p.ej., cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon), tumores del sistema linfático (p.ej., leucemia linfocítica crónica, linfomas no de Hodgkin y de Hodgkin), tumores del sistema hematopoyético (p.ej., leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple), terapia de radiación, quimioterapia (p.ej., regímenes que contienen platino), enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, incluyendo, aunque sin limitación, artritis reumatoide, otras artritis inflamatorias, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedades cutáneas agudas o crónicas (p.ej., soriasis), enfermedad intestinal inflamatoria (p.ej., enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), enfermedad o insuficiencia renal aguda o crónica, incluyendo condiciones idiopáticas o congénitas, enfermedad hepática aguda o crónica, sangrado agudo o crónico, situaciones en las que no resulta posible la transfusión de glóbulos rojos debido a aloanticuerpos o autoanticuerpos del paciente y/o por motivos religiosos (p.ej., algunos testigos de Jehová), infecciones (p.ej., malaria, osteomielitis), hemoglobinopatías, incluyendo, por ejemplo, paludismo, talasemias, uso o abuso de fármacos, p.ej., abuso del alcohol, pacientes pediátricos con anemia por cualquier causa para evitar la transfusión, y pacientes de edad avanzada o pacientes con enfermedad cardiopulmonar subyacente con anemia que no pueden recibir transfusiones debido a problemas de sobrecarga circulatoria.

Los polipéptidos trampa de GDF resultarían apropiados para tratar anemias de médula ósea hipoproliferativa, que típicamente están asociadas a pocos cambios en la morfología de los glóbulos rojos (GR). Entre las anemias hipoproliferativas se incluyen: 1) anemia de enfermedad crónica, 2) anemia de enfermedad renal, y 3) anemia asociada a estados hipometabólicos. En cada uno de estos tipos, los niveles endógenos de eritropoyetina son *inapropiadamente bajos* para el grado de anemia observado. Entre otras anemias hipoproliferativas se incluyen: 4) anemia ferropénica de estadio temprano, y 5) anemia causada por daños a la médula ósea. En estos tipos, los niveles endógenos de eritropoyetina son *apropiadamente elevados* para el grado de anemia observado.

El tipo más común es la anemia de enfermedad crónica, que comprende inflamación, infección, lesión tisular y condiciones tales como el cáncer, y se distingue por tanto niveles bajos de eritropoyetina como una *respuesta inadecuada* a la eritropoyetina en la médula ósea (Adamson, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17a ed.; McGraw Hill, New York, páginas 628 a 634, 2008). Muchos factores pueden contribuir a la anemia relacionada con el cáncer. Algunos se asocian al proceso patológico mismo y a la generación de citoquinas inflamatorias, tales como interleuquina-1, interferón-gamma y factor de necrosis tumoral (Bron et al., Semin. Oncol. 28(supl. 8):1-6, 2001). Entre sus efectos, la inflamación induce el péptido regulador del hierro clave hepcidina, inhibiendo de esta manera la exportación de hierro de los macrófagos y limitando generalmente la disponibilidad del hierro para la eritropoyesis (Ganz, J. Am. Soc. Nephrol. 18:394-400, 2007). La pérdida de sangre por diversas rutas también puede contribuir a la

anemia relacionada con el cáncer. La prevalencia de la anemia debido a la progresión del cáncer varía con el tipo de cáncer, estando comprendida entre 5% en el cáncer de próstata y hasta el 90% en el mieloma múltiple. La anemia relacionada con el cáncer presenta consecuencias profundas para los pacientes, incluyendo fatiga y calidad de vida reducida, menor eficacia del tratamiento y mortalidad incrementada.

La enfermedad renal crónica se asocia a anemia hiperproliferativa que varía en gravedad con el grado de deterioro renal. Dicha anemia se debe principalmente a la *producción* inadecuada de eritropoyetina y a la supervivencia reducida de los glóbulos rojos. La enfermedad renal crónica habitualmente cursa gradualmente durante un periodo de años o década hasta la enfermedad de estadio terminal (estadio 5), en cuyo punto se requiere la diálisis o el trasplante renal para la supervivencia del paciente. Con frecuencia la anemia se desarrolla pronto en este proceso y se agrava a medida que avanza la enfermedad. Las consecuencias clínicas de la anemia de la enfermedad renal están bien documentadas y entre ellas se incluyen el desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda, deterioro de la función cognitiva, calidad de vida reducida y función inmunológica alterada (Levin et al., Am. J. Kidney Dis. 27:347-354, 1999; Nissenson, Am. J. Kidney Dis 20(supl. 1):21-24, 1992; Revicki et al., Am. J. Kidney Dis. 25:548-554, 1995; Gafter et al., Kidney Int. 45:224-231, 1994). Tal como demuestran los Solicitantes en un modelo de ratón de enfermedad renal crónica (ver el ejemplo, posteriormente), puede utilizarse un polipéptido trampa de GDF para tratar la anemia de la enfermedad renal.

Muchas condiciones que resultan en una tasa hipometabólica pueden producir una anemia hipoproliferativa leve a moderada. Entre dichas condiciones se encuentran los estados de deficiencia endocrina. Por ejemplo, puede producirse anemia en la enfermedad de Addison, hipotiroidismo, hiperparatiroidismo o en machos que han sido castrados o tratados con estrógeno. La anemia leve a moderada también puede producirse con la ingesta dietética reducida de proteínas, una condición particularmente prevalente en la edad avanzada. Finalmente, puede desarrollarse anemia en pacientes con enfermedad hepática crónica que aparece de prácticamente cualquier causa (Adamson, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17a ed.; McGraw Hill, New York, pp 628-634, 2008).

La anemia que resulta de la pérdida aguda de sangre de un volumen suficiente, tal como por traumatismo o hemorragia postparto, es conocida como anemia aguda posthemorrágica. La pérdida aguda de sangre inicialmente causa hipovolemia sin anemia, ya que se produce una reducción proporcional de los GR junto con otros constituyentes de la sangre. Sin embargo, la hipovolemia rápidamente induce mecanismos fisiológicos que desplazan fluidos desde el compartimiento extravascular al compartimiento vascular, lo que resulta en hemodilución y anemia. Si es crónica, la pérdida de sangre gradualmente agota las reservas corporales de hierro y finalmente lleva a una deficiencia de hierro. Tal como demuestran los Solicitantes en un modelo de ratón (ver el ejemplo, posteriormente), puede utilizarse un polipéptido trampa de GDF para acelerar la recuperación de la anemia de pérdida aguda de sangre.

La anemia ferropénica es el estadio final en una progresión gradual de creciente deficiencia de hierro que incluye un equilibrio negativo del hierro y eritropoyesis ferropénica como estadios intermedios. La deficiencia de hierro puede resultar de una demanda incrementada de hierro, de una reducción de la ingesta de hierro o de una pérdida incrementada de hierro, tal como ejemplifican condiciones tales como el embarazo, dieta inadecuada, malabsorción intestinal, inflamación aguda o crónica, y pérdida aguda o crónica de sangre. Con la anemia leve a moderada de este tipo, la médula ósea sigue siendo hipoproliferativa y la morfología de los GR es en gran medida normal; sin embargo, incluso la anemia leve puede resultar en algunos GR hipocrómicos microcíticos, y la transición a anemia ferropénica grave se ve acompañada de hiperproliferación de la médula ósea y GR microcíticos e hipocrómicos crecientemente prevalentes (Adamson, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17a ed.; McGraw Hill, New York, pp 628-634, 2008). La terapia apropiada de la anemia ferropénica depende de su causa y gravedad, siendo las opciones convencionales principales las preparaciones orales de hierro, las formulaciones parenterales de hierro y la transfusión de GR. Podría utilizarse un polipéptido trampa de GDF para tratar las anemias ferropénicas crónicas solo o en combinación con enfoques terapéuticos convencionales, particularmente para tratar anemias de origen multifactorial.

Las anemias hiperproliferativas pueden resultar de disfunción o insuficiencia primaria de la médula ósea, en lugar de disfunción secundaria a inflamación, infección o progresión del cáncer. Ejemplos prominentes serían la mielosupresión causada por fármacos quimioterapéuticos del cáncer o terapia de radiación del cáncer. Una revisión amplia de los ensayos clínicos ha encontrado que se produce anemia leve en 100% de los pacientes después de quimioterapia, mientras que puede producirse anemia más grave en hasta 80% de dichos pacientes (Groopman et al., J. Natl. Cancer Inst. 91:1616-1634, 1999). Entre los fármacos mielosupresores se incluyen: 1) agentes alquilantes tales como las mostazas nitrogenadas (p.ej., melfalán) y nitrosoureas (p.ej., estreptozocina), 2) antimetabolitos, tales como antagonistas de ácido fólico (p.ej., metotrexato), análogos de purina (p.ej., tioguanina) y análogos de pirimidina (p.ej., gemcitabina), 3) anticuerpos citotóxicos, tales como antraciclinas (p.ej., doxorubicina), 4) inhibidores de quinasa (p.ej., gefitinib), 5) inhibidores mitóticos, tales como taxanos (p.ej., paclitaxel) y alcaloides vinca (p.ej., vinorelbina), 6) anticuerpos monoclonales (p.ej., rituximab) y 7) inhibidores de topoisomerasas (p.ej., topotecán y etopósido). Tal como se demuestra en un modelo de ratón de anemia inducida por quimioterapia (ver el ejemplo, posteriormente), puede utilizarse un polipéptido trampa de GDF para tratar la anemia causada por agentes quimioterapéuticos y/o terapia de radiación.

Los polipéptidos trampa de GDF también resultarían apropiados para tratar anemias de maduración desordenada de

GR, que se caracterizan en parte por GR de tamaño reducido (microcíticos), de tamaño excesivo (macrocíticos), de forma incorrecta o de color anormal (hipocrómicos).

Los pacientes pueden tratarse con un régimen de administración destinado a restaurar al paciente al nivel diana de hemoglobina, habitualmente de entre aproximadamente 10 g/dl y aproximadamente 12,5 g/dl, y típicamente de aproximadamente 11,0 g/dl (ver también Jacobs et al., *Nephrol. Dial Transplant* 15, 15-19, 2000), aunque niveles diana más bajos pueden causar menos efectos secundarios cardiovasculares. Alternativamente, los niveles de hematócrito (porcentaje del volumen de una muestra de sangre ocupado por las células) pueden utilizarse como una medida de la condición de los glóbulos rojos. Los niveles de hematócrito para individuos sanos se encuentran comprendidos entre 41% y 51% para adultos varones y de entre 35% y 45% para adultos mujeres. Los niveles de hematócrito diana habitualmente son de aproximadamente 30% a 33%. Además, los niveles de hemoglobina/hematócrito varían de persona a persona. De esta manera, óptimamente, el nivel diana de hemoglobina/hematócrito puede individualizarse para cada paciente.

El rápido efecto sobre los niveles de glóbulos rojos de los polipéptidos trampa de GDF dados a conocer en la presente memoria indican que estos agentes actúan mediante un mecanismo diferente que la Epo. De acuerdo con lo anterior, estos antagonistas pueden resultar útiles para incrementar los niveles de glóbulos rojos y de hemoglobina en pacientes que no responden bien a la Epo. Por ejemplo, un polipéptido trampa de GDF puede resultar beneficioso para un paciente en el que la administración de una dosis normal a incrementada (>300 UI/kg/semana) de Epo no resulta en el incremento del nivel de hemoglobina hasta el nivel diana. Los pacientes con una respuesta de la Epo inadecuada se encuentran en todos los tipos de anemia, aunque se han observado números más altos de no respondedores con particular frecuencia en pacientes con cánceres y pacientes con enfermedad renal de estadio terminal. Una respuesta inadecuada a la Epo puede ser constitutiva (es decir, observada con el primer tratamiento con la Epo) o adquirida (p.ej., observada tras el tratamiento repetido con Epo).

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

También pueden utilizarse trampas de GDF en combinación con Epo y otros agentes que activan la ruta de eritropoyetina. En algunos casos, esto puede permitir una dosis más baja de cada fármaco en la combinación.

En la presente memoria se dan a conocer métodos para controlar un paciente que ha sido tratado con, o es un candidato para el tratamiento con, un polipéptido trampa de GDF mediante la medición de uno o más parámetros hematológicos en el paciente. Los parámetros hematológicos pueden utilizarse para evaluar las dosis apropiadas para un paciente que es un candidato para el tratamiento con un polipéptido trampa de GDF, para monitorizar los parámetros hematológicos durante el tratamiento con un polipéptido trampa de GDF, para evaluar si ajustar la dosis durante el tratamiento con un polipéptido trampa de GDF, y/o para evaluar una dosis de mantenimiento apropiada de un polipéptido trampa de GDF. Si uno o más de los parámetros hematológicos se encuentra fuera del nivel normal, la administración con un polipéptido trampa de GDF puede reducirse, retrasarse o terminarse.

Entre los parámetros hematológicos que pueden medirse de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente memoria se incluyen, por ejemplo, niveles de glóbulos rojos, presión sanguínea, reservas de hierro, y otros agentes presentes en líquidos corporales, que se correlacionan con niveles incrementados de glóbulos rojos, utilizando métodos reconocidos en la técnica. Dichos parámetros pueden determinarse utilizando una muestra de sangre de un paciente. Los incrementos de los niveles de glóbulos rojos, de los niveles de hemoglobina y/o de los niveles de hematócrito pueden causar incrementos de la presión sanguínea.

Si uno o más parámetros hematológicos se encuentran fuera del intervalo normal, o en el lado elevado de la normalidad, en un paciente que es un candidato para el tratamiento con un polipéptido trampa de GDF, puede retrasarse el inicio de la administración del polipéptido trampa de GDF hasta que los parámetros hematológicos hayan vuelto a un nivel normal o aceptable de manera natural o mediante intervención terapéutica. Por ejemplo, en el caso de que el paciente candidato sea hipertenso o prehipertenso, el paciente puede tratarse con un agente reductor de la presión sanguínea para reducir la presión sanguínea del paciente. Puede utilizarse cualquier agente reductor de la presión sanguínea apropiado para la condición del paciente individual, incluyendo, por ejemplo, diuréticos, inhibidores adrenérgicos (incluyendo alfa-bloqueantes y beta-bloqueantes), vasodilatadores, bloqueantes de los canales del calcio, inhibidores del enzima conversor de la angiotensina (ACE, por sus siglas en inglés) o bloqueantes del receptor de angiotensina II. La presión sanguínea puede tratarse alternativamente utilizando un régimen de dieta y ejercicio. De manera similar, en el caso de que un paciente candidato presente reservas de hierro que son inferiores a las normales, o en el lado bajo de la normalidad, el paciente puede tratarse con un régimen apropiado de dieta y/o suplementos de hierro hasta que las reservas de hierro del paciente hayan vuelto a un nivel normal o aceptable. Para

pacientes con niveles de glóbulos rojos y/o de hemoglobina más elevados de lo normal, la administración del polipéptido trampa de GDF puede retrasarse hasta que los niveles hayan vuelto a un nivel normal o aceptable.

Si uno o más parámetros hematológicos están fuera del intervalo normal, o en el lado elevado de la normalidad, en un paciente que es un candidato al tratamiento con un polipéptido trampa de GDF, el inicio del tratamiento no puede retrasarse. Sin embargo, la cantidad de dosis o frecuencia de la administración de polipéptidos trampa de GDF puede fijarse en una cantidad que reduciría el riesgo de un incremento inaceptable de los parámetros hematológicos que se produce con la administración del polipéptido trampa de GDF. Alternativamente, puede desarrollarse un régimen terapéutico para el paciente que combine un polipéptido trampa de GDF con un agente terapéutico que trate el nivel no deseable del parámetro hematológico. Por ejemplo, en el caso de que el paciente presente una presión sanguínea elevada, puede diseñarse un régimen terapéutico que implique la administración de un polipéptido trampa de GDF y un agente reductor de la presión sanguínea. Para un paciente que presente reservas de hierro más baja de lo deseado, puede desarrollarse un régimen terapéutico de un polipéptido trampa de GDF y suplementación de hierro.

El parámetro o Parámetros de línea base de uno o más parámetros hematológicos pueden establecerse para un paciente que es un candidato para el tratamiento con un polipéptido trampa de GDF y establecerse un régimen de administración apropiado para ese paciente basándose en el valor o valores de línea base. Alternativamente, podrían utilizarse parámetros de línea base establecidos basados en la historia médica del paciente, en los que basar un régimen de administración de polipéptidos trampa de GDF apropiado para el paciente. Por ejemplo, en el caso de que un paciente sano presente una lectura de línea base establecida de presión sanguínea que sea superior al intervalo normal definido, puede no resultar necesario llevar la presión sanguínea del paciente al intervalo que se considera normal para la población general antes del tratamiento con el polipéptido trampa de GDF. También pueden utilizarse valores de línea base del paciente para uno o más parámetros hematológicos antes del tratamiento con un polipéptido trampa de GDF como valores comparativos relevantes para la monitorización de cualesquiera cambios en los parámetros hematológicos durante el tratamiento con el polipéptido trampa de GDF.

Pueden medirse uno o más parámetros hematológicos en pacientes bajo tratamiento con un polipéptido trampa de GDF. Los parámetros hematológicos pueden utilizarse para monitorizar el paciente durante el tratamiento y permitir el ajuste o terminación de la administración con el polipéptido trampa de GDF o la administración adicional con otro agente terapéutico. Por ejemplo, en el caso de que la administración de un polipéptido trampa de GDF resulte en un incremento de la presión sanguínea, nivel de glóbulos rojos o nivel de hemoglobina, o una reducción de las reservas de hierro, la dosis del polipéptido trampa de GDF puede reducirse en cantidad o frecuencia con el fin de reducir los efectos del polipéptido trampa de GDF sobre el parámetro o parámetros hematológicos. En el caso de que la administración de un polipéptido trampa de GDF resulte en un cambio en uno o más parámetros hematológicos que resulte adverso para el paciente, la administración del polipéptido trampa de GDF puede terminarse temporalmente, hasta que el parámetro o parámetros hematológicos vuelvan a un nivel aceptable, o permanentemente. De manera similar, en el caso de que uno o más parámetros hematológicos no se lleven dentro de un intervalo aceptable después de reducir la dosis o frecuencia de administración del polipéptido trampa de GDF, puede terminarse la administración. Alternativamente o adicionalmente a la reducción o terminación de la administración con el polipéptido trampa de GDF, el paciente puede recibir la administración de un agente terapéutico adicional que trata el nivel no deseable del parámetro o parámetros hematológicos, tal como, por ejemplo, un agente reductor de la presión sanguínea o un suplemento de hierro. Por ejemplo, en el caso de que el paciente bajo tratamiento con un polipéptido trampa de GDF presente una presión sanguínea elevada, la administración con el polipéptido trampa de GDF puede continuar en el mismo nivel y se añade un agente reductor de la presión sanguínea al régimen de tratamiento, puede reducirse la administración del polipéptido trampa de GDF (p.ej., en cantidad y/o frecuencia) y se añade un agente reductor de la presión sanguínea al régimen de tratamiento, o puede terminarse la administración del polipéptido trampa de GDF y el paciente puede tratarse con un agente reductor de la presión sanguínea.

Los pacientes tratados con un polipéptido trampa de GDF, o pacientes candidatos para el tratamiento con un polipéptido trampa de GDF, pueden ser pacientes que requieren crecimiento muscular, tales como pacientes que sufren, o están en riesgo de desarrollar, un trastorno neuromuscular o un trastorno musculodegenerativo. Por ejemplo, los pacientes o pacientes candidatos pueden sufrir de, o estar en riesgo de desarrollar, enfermedad de Lou Gehrig (ELA), cáncer, síndrome de anorexia-caquexia, distrofia muscular, atrofia muscular, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva (y pérdida muscular asociada a EPOC), síndrome de atrofia muscular, sarcopenia o caquexia. La distrofia muscular se refiere a un grupo de enfermedades musculares degenerativas caracterizadas por el debilitamiento y deterioro graduales de los músculos esqueléticos y en ocasiones los músculos cardíacos y respiratorios. Entre las distrofias musculares ejemplares que pueden tratarse con un régimen que incluye los polipéptidos trampa de GDF de la invención se incluyen: Distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker (DMB), distrofia muscular de Emery-Dreifuss (DMED), distrofia muscular de Limb-Girdle (DMLG), distrofia muscular fascio-escápulo-humeral (DMFEH) (también conocida como Landouzy-Dejerine), distrofia miotónica (DMM) (también conocida como enfermedad de Steinert), distrofia muscular oculofaríngea (DMOF), distrofia muscular distal (DD) y distrofia muscular congénita (DMC).

6. Composiciones farmacéuticas

Los compuestos (p.ej., polipéptidos trampa de GDF) de la presente invención pueden formularse con un portador

farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, puede administrarse un polipéptido trampa de GDF solo o como componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Los compuestos de la invención pueden formularse para la administración de cualquier manera conveniente para la utilización en medicina humana o veterinaria.

El método terapéutico dado a conocer en la presente memoria puede incluir la administración de la composición sistémicamente, o localmente como implante o dispositivo. Al administrarla, la composición terapéutica para la utilización en la presente invención se encuentra evidentemente en forma fisiológicamente aceptable libre de pirógenos. Agentes terapéuticamente útiles diferentes de los polipéptidos trampa de GDF que también pueden incluirse opcionalmente en la composición tal como se ha indicado anteriormente, pueden administrarse simultánea o secuencialmente con los compuestos de la invención (p.ej., polipéptidos trampa de GDF) en los métodos dados a conocer en la presente memoria.

Típicamente, los compuestos se administran por vía parenteral. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral comprenden uno o más polipéptidos trampa de GDF en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles inmediatamente antes de la utilización, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos, solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor deseado o agentes de suspensión o espesantes. Entre los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden utilizarse en las composiciones farmacéuticas de la invención se incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Puede mantenerse la fluidez correcta, por ejemplo mediante la utilización de materiales de recubrimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento de un tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante la utilización de tensioactivos.

Además, la composición puede encapsularse o inyectarse en una forma para la administración en un sitio de tejido diana (p.ej., médula ósea). Entre las composiciones de la presente invención puede incluirse una matriz capaz de administrar uno o más compuestos terapéuticos (p.ej., polipéptidos trampa de GDF) en un sitio de tejido diana (p.ej., médula ósea), que proporciona una estructura para el tejido en desarrollo y capaz óptimamente de ser reabsorbido en el cuerpo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar una liberación lenta de los polipéptidos trampa de GDF. Dichas matrices pueden formarse de materiales utilizados actualmente para otras aplicaciones médicas implantadas.

La elección de material de matriz se basa en la biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, apariencia cosmética y propiedades de la interfaz. La aplicación particular de las composiciones de la invención define la formulación apropiada. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser biodegradables y sulfato de calcio, fosfato tricálcico, hidroxiapatito, ácido poliláctico y polianhídridos definidos químicamente. Otros materiales potenciales son biodegradables y han sido biológicamente bien definidos, tales como el colágeno óseo o dérmico. Algunas matrices adicionales comprenden proteínas puras o componentes de la matriz extracelular. Otras matrices potenciales no son biodegradables y están definidos químicamente, tales como hidroxiapatito sinterizado, biovidrio, aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden comprender combinaciones de cualquiera de los tipos anteriormente indicados de material, tales como ácido poliláctico e hidroxiapatito o colágeno y fosfato tricálcico. La biocerámica puede alterarse en la composición, tal como en el aluminato-fosfato de calcio y el procesamiento para alterar el tamaño de poro, el tamaño de partícula, la forma de partícula y la biodegradabilidad.

Pueden administrarse composiciones de la invención adecuadas para la administración oral, p.ej., en forma de cápsulas, sellos, píldoras, tabletas, pastillas (utilizando una base saborizada, habitualmente sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos o en forma de una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o en forma de una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite, o como elixir o jarabe, o en forma de pastillas (utilizando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia) y/o en forma de colutorio y similares, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de un agente como ingrediente activo. También puede administrarse un agente en forma de un bolo, electuario o pasta.

En formas de administración sólidas para la administración oral (cápsulas, tabletas, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), uno o más compuestos terapéuticos de la presente invención pueden mezclarse con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato sódico o fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes: (1) rellenos o extensores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico, (2) ligantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia, (3) humectantes, tales como glicerol, (4) agentes desintegrantes, tales como agar agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido alginico, determinados silicatos y carbonato sódico, (5) agentes retardantes de solución, tales como parafina, (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario, (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita, (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato sódico y mezclas de los mismos, y (10) agentes colorantes. En el caso de las cápsulas, tabletas y píldoras, las composiciones farmacéuticas pueden comprender además agentes tamponadores. Las composiciones sólidas de un tipo similar

también pueden utilizarse como rellenos en cápsulas rellenas de gelatina blanda y dura utilizando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Entre las formas de administración líquidas para la administración oral se incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de administración líquidas pueden comprender diluyentes inertes utilizados comúnmente en la técnica, tales como agua u otros solventes, agentes solubilizadores y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (por ejemplo aceites de semilla de algodón, de cacahuete, de maíz, de germen, de oliva, de ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofúrico, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso de sorbitán y mezclas de los mismos. Aparte de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

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

Las composiciones pueden contener además adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. El bloqueo de la acción de los microorganismos puede garantizarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabeno, clorobutanol, ácido fenol-sorbico y similares. También puede resultar deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, puede conseguirse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Se entiende que el régimen de administración será determinado por el médico responsable considerando diversos factores que modifican la acción de los compuestos de la invención (p.ej., polipéptidos trampa de GDF). Entre los diversos factores se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el recuento de glóbulos rojos del paciente, el nivel de hemoglobina u otras evaluaciones diagnósticas, el recuento de glóbulos diana objetivo deseado, la edad, sexo y dieta del paciente, la gravedad de cualquier enfermedad que pueda estar contribuyendo a un nivel deprimido de glóbulos rojos, el tiempo de administración y otros factores clínicos. La adición de otros factores de crecimiento conocidos a la composición final también puede afectar a las dosis. Puede monitorizarse el progreso mediante la evaluación periódica de los niveles de glóbulos rojos y de hemoglobina, así como mediante evaluaciones de los niveles de reticulocitos y otros indicadores del proceso hematopoyético.

En la presente memoria se da a conocer terapia génica para la producción *in vivo* de polipéptidos trampa de GDF. Dicha terapia conseguirá su efecto terapéutico mediante la introducción de las secuencias polinucleótidas de trampa de GDF en células o tejidos que presentan los trastornos indicados anteriormente. La administración de secuencias polinucleótidas de trampa de GDF puede llevarse a cabo utilizando un vector de expresión recombinante, tal como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. Resulta preferente para la administración terapéutica de secuencias polinucleótidas de trampa de GDF la utilización de liposomas dirigidos.

Entre los diversos vectores víricos que pueden utilizarse para la terapia génica tal como se enseña en la presente memoria se incluyen adenovirus, virus herpes, vaccinia o un virus ARN, tal como un retrovirus. El vector retroviral puede ser un derivado de un retrovirus murino o aviar. Entre los ejemplos de vectores retrovíricos en los que puede insertarse un único gen foráneo se incluyen, aunque sin limitarse a ellos: virus de la leucemia murina de Moloney (VLMuMo), virus del sarcoma murino de Harvey (VSMuHa), virus del tumor mamario murino (VTMMu) y virus del sarcoma de Rous (VSR). Varios vectores retrovíricos adicionales pueden incorporar múltiples genes. La totalidad de estos vectores puede transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable, de manera que las células transducidas pueden identificarse y generarse. Los vectores retrovíricos pueden convertirse en específicos de diana mediante la unión de, por ejemplo, un azúcar, un glucolípido o una proteína. El transporte dirigido preferente se consigue mediante la utilización de un anticuerpo. El experto en la materia reconocerá que pueden insertarse secuencias polinucleótidas específicas en el genoma retroviral o unirse a una cubierta vírica para permitir la administración específica de diana del vector retroviral que contiene el polinucleótido de trampa de GDF.

Alternativamente, células de cultivo de tejidos pueden transfectarse directamente con plásmidos codificantes de los genes estructurales retrovíricos *gag*, *pol* y *env*, mediante transfección convencional con fosfato de calcio. A continuación, estas células se transfectan con el plásmido vector que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retroviral al medio de cultivo.

Otro sistema de administración dirigida para los polinucleótidos trampa de GDF es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas, y sistemas a base de lípidos, incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas, y liposomas. El sistema de coloidal preferente es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificial que son útiles como vehículos de administración *in vitro* e *in vivo*. El ARN, el ADN y los viriones intactos pueden encapsularse dentro del interior acuoso y suministrarse a las células en una forma biológicamente activa (ver, por ejemplo, Fraley, y col., Trends

Biochem. Sci., 6:77, 1981). Los métodos para la transferencia génica eficiente utilizando un vehículo liposoma son conocidos de la técnica; ver, p.ej., Mannino et al., Biotechniques 6:682, 1988. La composición del liposoma habitualmente es una combinación de fosfolípidos, habitualmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También pueden usarse otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica, y la presencia de cationes divalentes.

Entre los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas se incluyen compuestos fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos. Entre los fosfolípidos ilustrativos se incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina. El transporte dirigido de liposomas también resulta posible basándose en, por ejemplo, la especificidad de órgano, la especificidad celular y la especificidad de orgánulo y es conocido de la técnica.

Ejemplificación

La invención que se describe de manera general a continuación, se entenderá más fácilmente en referencia a los ejemplos siguientes, que se incluyen meramente con fines ilustrativos de determinados aspectos y realizaciones de la presente invención y no pretenden ser limitativos de la misma.

Ejemplo 1. Generación de una trampa de GDF

Los solicitantes han construido una trampa de GDF de la manera siguiente. Un polipéptido que presentaba un dominio extracelular modificado de ActRIIB con unión de activina A reducida en gran medida respecto a GDF11 y/o miostatina (como consecuencia de una sustitución de leucina a aspartato en la posición 79 en la SEC ID nº 1) se fusionó con un dominio Fc humano o de ratón con un conector mínimo (tres aminoácidos glicina) entre ellos. Los constructos se denominan ActRIIB(L79D 20-134)-hFc y ActRIIB(L79D 20-134)-mFc, respectivamente. Formas alternativas con un glutamato en lugar de un aspartato en la posición 79 funcionaron de manera similar (L79E). También se generaron formas alternativas con una alanina en lugar de una valina en la posición 226 con respecto a la SEC ID nº 7, y funcionaron equivalentemente en todos los aspectos sometidos a ensayo. El aspartato en la posición 79 (respecto a la SEC ID nº 1, o la posición 60 respecto a la SEC ID nº 7) se subraya en gris, posteriormente. La valina en la posición 226 respecto a la SEC ID nº 7 también se subraya en gris posteriormente.

La trampa de GDF ActRIIB(L79D 20-134)-Fc_h se muestra posteriormente como purificada a partir de líneas de células CHO (SEC ID nº 7).

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
GCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPT
APTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PVPPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

La parte derivada de ActRIIB de la trampa de GDF presenta la secuencia de aminoácidos indicada posteriormente (SEC ID nº 32) y esa parte podría utilizarse como un monómero o como una proteína de fusión no de Fc como monómero, dímero o complejo de orden superior.

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIE
LVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYE
PPPTAPT (SEC ID nº 32)

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

- (i) Melitina de abeja melífera (MLAM): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEC ID nº 8)
- (ii) Activador de plasminógeno tisular (APT): MDAMKRGGLCCVLLCGAVFVSP (SEC ID nº 9)
- (iii) Nativa: MTAPWVALALLWGSLCAGS (SEC ID nº 10).

La forma seleccionada utiliza el líder de APT y presenta la secuencia de aminoácidos no procesada siguiente:

MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCE
GEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE
GNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPKIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID nº 11)

Dicho polipéptido está codificado por la secuencia de ácidos nucleicos siguiente (SEC ID nº 12):

A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA GTCTTCGTTT
CGCCCGGCGC CTCTGGGCGT GGGGAGGCTG AGACACGGGA GTGCATCTAC TACAACGCCA
ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACCAGAGCG GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA
AGCGGCTGCA CTGCTACGCC TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA
AGGGCTGCTG GGACGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG
AGAACCCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG CGCTTCACTC
ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC ACCCCCGACA GCCCCACCG
GTGGTGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG
TCTTCTCTTT CCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG
ACGGCGTGGA GTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT
ACCGTGTTGT CAGCGTCCTC ACCGTCTGTC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG TCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA
AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA
AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG
AGTGGGAGAG CAATGGGCGAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT
CCGACGGCTC TTCTTCTCTC TATAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA
5 GCCTTCCCT GTCTCCGGT AAATGA

La purificación pudo conseguirse mediante una serie de etapas de cromatografía de columna, incluyendo, por ejemplo, tres o más de las siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de Q-sefariosa, cromatografía de fenilsefariosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación pudo completarse con la filtración vírica y el intercambio de tampones. En un ejemplo de un esquema de purificación, se pasó el medio de cultivo celular por una columna de proteína A, se lavó en Tris/HCl 150 mM (pH 8,0), después se lavó en Tris/NaCl 50 mM (pH 8,0) y se eluyó con glicina 0,1 M, pH 3,0. El eluido de pH bajo se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos como etapa de eliminación vírica. A continuación, se neutralizó el eluido y se pasó por una columna de intercambio iónico Q-sefariosa y se lavó en Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 50 mM, y se eluyó en Tris 50 mM, pH 8,0, con una concentración de NaCl de entre 150 mM y 300 mM. A continuación, se cambió el eluido por Tris 50 mM, pH 8,0, sulfato amónico 1,1 M y se pasó por una columna de fenil-sefariosa, se lavó y se eluyó en Tris 50 mM, pH 8,0, con sulfato amónico entre 150 y 300 mM. El eluido se dializó y se filtró para la utilización.

Se describen trampas de GDF adicionales (proteínas de fusión de ActRIIB-Fc modificadas para reducir la proporción de unión de activina A respecto a miostatina o GDF11) en:

documentos nº PCT/US2008/001506 y nº WO 2006/012627.

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

Se utilizó un ensayo de gen informador A-204 para evaluar los efectos de las proteínas ActRIIB-Fc y trampas de GDF sobre la señalización por GDF-11 y activina A. Línea celular: Rbdomiosarcoma humano (de origen muscular). Vector informador: pGL3(CAGA)12 (descrito en Dennler et al., EMBO 17: 3091-3100, 1998). El motivo CAGA12 se encuentra presente en los genes sensibles a TGF-beta (gen PAI-1), de manera que este vector es de uso general para factores que señalizan a través de Smad2 y 3.

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

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

Día 3: adición de factores (diluidos en medio + BSA al 0,1%). Los inhibidores necesitan preincubarse con factores durante 1 h antes de la adición a las células. 6 h después, las células se enjuagaron con PBS y se lisaron las células.

A lo anterior siguió un ensayo de luciferasa. En ausencia de ningún inhibidor, la activina A mostró una estimulación de 10 veces de la expresión del gen informador y una $ED_{50} \sim 2$ ng/ml. GDF-11: estimulación de factor 16, ED_{50} : $\sim 1,5$ ng/ml.

ActRIIB(20-134) es un potente inhibidor de la actividad de activina, GDF-8 y GDF-11 en este ensayo. También se sometieron a ensayo variantes en el presente ensayo.

Ejemplo 3. Inhibición de GDF-11 por truncados N-terminales y C-terminales

Se generaron variantes de ActRIIB(20-134)-Fc_h con truncados en los extremos N-terminal y/o C-terminal y se sometieron a ensayo para actividad como inhibidores de GDF-11 y activina. Las actividades se muestran posteriormente (medidas en medio condicionado):

Truncados de ActRIIB-Fc_h C-terminales:

	IC_{50} (ng/ml)	
	GDF-11	Activina
ActRIIB(20-134)-Fc_h	45	22
ActRIIB(20-132)-Fc_h	87	32
ActRIIB(20-131)-Fc_h	120	44
ActRIIB(20-128)-Fc_h	130	158

Tal como puede observarse, los truncados de tres (finalizados en PPT), seis (finalizados en YEP) o más aminoácidos en el extremo C-terminal causan una reducción de tres veces o superior de la actividad de la molécula. El truncado de los 15 aminoácidos finales de la parte ActRIIB causa una mayor pérdida de actividad (ver el documento nº WO2006/012627).

Se realizaron truncados aminotermiales en un fondo de proteína ActRIIB(20-131)-Fc_h. Las actividades se muestran posteriormente (medidas en medio condicionado):

Truncados de ActRIIB-Fc_h N-terminales:

	IC_{50} (ng/ml)	
	GDF-11	Activina
ActRIIB(20-131)-Fc_h (GRG...)	183	201
ActRIIB(21-131)-Fc_h (RGE...)	121	325
ActRIIB(22-131)-Fc_h (GEA...)	71	100
ActRIIB(23-131)-Fc_h (EAE...)	60	43
ActRIIB(24-131)-Fc_h (AET...)	69	105

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, los truncados de dos, tres o cuatro aminoácidos del extremo N-terminal conducen a la producción de una proteína más activa que las versiones con un dominio extracelular de longitud completa. Experimentos adicionales muestran que un truncado de cinco aminoácidos, ActRIIB(25-131)-Fc_h, presenta una actividad equivalente a la forma no truncada y las delecciones adicionales del extremo N-terminal continúan degradando la actividad de la proteína. Por lo tanto, los constructos óptimos presentarán un extremo C-terminal que termina entre los aminoácidos 133 y 134 de la SEC ID nº 1 y un extremo N-terminal que se inicia en los aminoácidos 22 a 24 de la SEC ID nº 1. Un extremo N-terminal correspondiente al aminoácido 21 o 25 proporcionará una actividad que es similar a la del constructo ActRIIB(20-134)-Fc_h. Estos truncados también pueden utilizarse en el contexto de trampas de GDF, tales como una variante L79D o L79E.

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

Se sometió a ensayo la actividad de las proteínas ActRIIB-Fc y trampas de GDF en un ensayo celular, tal como se ha indicado anteriormente. Se muestran los resultados en la tabla, posteriormente. Algunas variantes se sometieron a ensayo en diferentes constructos de truncado C-terminal. Tal como se ha comentado anteriormente, los truncados de cinco o quince aminoácidos causaron una reducción de la actividad. Las trampas de GDF (variantes L79D y L79E) mostraron una pérdida sustancial de actividad de activina, conservando simultáneamente una inhibición prácticamente de tipo salvaje de GDF-11.

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

Variaciones de ActRIIB-Fc	Parte de ActRIIB (corresponde a los aminoácidos de la SEC ID nº 1)	Actividad de inhibición de GDF11	Actividad de inhibición de activina
R64	20-134	+++ (K _i aprox. 10 ⁻⁸ M)	+++ (K _i aprox. 10 ⁻⁸ M)
A64	20-134	+ (K _i aprox. 10 ⁻⁶ M)	+ (K _i aprox. 10 ⁻⁶ M)
R64	20-129	+++	+++
R64 K74A	20-134	++++	++++
R64 A24N	20-134	+++	+++
R64A24N	20-119	++	++
R64 A24N K74A	20-119	+	+
R64 L79P	20-134	+	+
R64 L79P K74A	20-134	+	+
R64 L79D	20-134	+++	+
R64 L79E	20-134	+++	+
R64K	20-134	+++	+++
R64K	20-129	+++	+++
R64 P129S P130A	20-134	+++	+++
R64N	20-134	+	+
+ Poca actividad (K _i aprox. 1x10 ⁻⁶) ++ Actividad moderada (K _i aprox. 1x10 ⁻⁷) +++ Buena actividad (tipo salvaje) (K _i aprox. 1x10 ⁻⁸) ++++ Actividad superior a la de tipo salvaje			

Se evaluaron varias variantes para la semivida en suero en ratas. ActRIIB(20-134)-Fc presentaba una semivida en suero de aproximadamente 70 horas. ActRIIB(A24N 20-134)-Fc presentaba una semivida en suero de aproximadamente 100 a 150 horas. La variante A24N presentaba actividad en el ensayo celular (anteriormente) y en ensayos *in vivo* (posteriormente) que era equivalente a la de la molécula de tipo salvaje. Junto con la semivida más larga, lo anterior significa que, con el tiempo, una variante A24N, presnetará una mayor efecto por unidad de proteína que la molécula de tipo salvaje. La variante A24N, y cualquiera de las demás variantes sometidas a ensayo anteriormente, puede combinarse con las moléculas trampa de GDF, tales como las variantes L79D o L79E.

Ejemplo 5. Unión de GDF-11 y activina A

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

Las variantes de ActRIIB-Fc o la proteína de tipo salvaje se capturaron en el sistema utilizando un anticuerpo anti-Fc_h. Se inyectaron ligandos y se hicieron fluir sobre las proteínas receptoras capturadas. Se muestran los resultados en las tablas, posteriormente.

Variantes de IIB de especificidad de unión a ligando.

Proteína	GDF11		
	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-Fc _h	1,34e-6	1,13e-4	8,42e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-Fc _h	1,21e-6	6,35e-5	5,19e-11
ActRIIB(L79D 20-134)-Fc _h	6,7e-5	4,39e-4	6,55e-10
ActRIIB(L79E 20-134)-Fc _h	3,8e-5	2,74e-4	7,16e-10
ActRIIB(R64K 20-134)-Fc _h	6,77e-5	2,41e-5	3,56e-11
Proteína	GDF8		
	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-Fc _h	3,69e-5	3,45e-5	9,35e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-Fc _h			
ActRIIB(L79D 20-134)-Fc _h	3,85e-5	8,3e-4	2,15e-9
ActRIIB(L79E 20-134)-Fc _h	3,74e-5	9e-4	2,41e-9
ActRIIB(R64K 20-134)-Fc _h	2,25e-5	4,71e-5	2,1e-10
ActRIIB(R64K 20-129)-Fc _h	9,74e-4	2,09e-4	2,15e-9
ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-Fc _h	1,08e-5	1,8e-4	1,67e-9
ActRIIB(K74A 20-134)-Fc _h	2,8e-5	2,03e-5	7,18e-11

Proteína	Activina A		
	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-Fc _h	5,94e6	1,59e-4	2,68e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-Fc _h	3,34e6	3,46e-4	1,04e-10
ActRIIB(L79D 20-134)-Fc _h			Baja unión
ActRIIB(L79E 20-134)-Fc _h			Baja unión
ActRIIB(R64K 20-134)-Fc _h	6,82e6	3,25e-4	4,76e-11
ActRIIB(R64K 20-129)-Fc _h	7,46e6	6,28e-4	8,41e-11
ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-Fc _h	5,02e6	4,17e-4	8,31e-11

Estos datos confirman los datos del ensayo celular, demostrando que la variante A24N conserva una actividad de unión a ligando que es similar a la de la molécula ActRIIB(20-134)-Fc_h y que la molécula L79D o L79E conserva la unión de miostatina y GDF11 pero muestra una unión marcadamente reducida (no cuantificable) a la activina A.

Se generaron y sometieron a ensayo otras variantes, tal como se informa en el documento nº WO2006/012627; ver, p.ej., las páginas 59 y 60, utilizando ligandos acoplados al dispositivo y receptor que fluía sobre los ligandos acoplados. Notablemente, K74Y, K74F, K74I (y presumiblemente otras sustituciones hidrofóbicas en K74, tales como K74L), y D80I, causan una reducción de la proporción de unión de activina A a unión de GDF11 respecto a la molécula K74 de tipo salvaje. Se reproduce posteriormente una tabla de datos con respecto a estas variantes:

Variantes de ActRIIB-Fc solubles de unión a GDF11 y a activina A (ensayo BiaCore)

ActRIIB	Act A	GDF11
WT (64A)	KD=1,8e-7M (+)	KD= 2,6e-7M (+)
WT (64R)	na	KD= 8,6e-8M (+++)
+ 15cola	KD ~2,6 e-8M (+++)	KD= 1,9e-8M (++++)
E37A	*	*
R40A	-	-
D54A	-	*
K55A	++	*
R56A	*	*
K74A	KD=4,35e-9 M +++++	KD=5,3e-9M +++++
K74Y	*	-
K74F	*	-
K74I	*	-
W78A	*	*
L79A	+	*
D80K	*	*
D80R	*	*
D80A	*	*
D80F	*	*
D80G	*	*
D80M	*	*
D80N	*	*
D80I	*	--
F82A	++	-

* No se observa unión
-- unión <1/5 WT
- unión ~1/2 WT
+ WT
++ unión incrementada <2x
+++ unión incrementada ~5x
++++ unión incrementada ~10x
+++++ unión incrementada ~40x

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

Se administró ActRIIB(20-134)-Fc_h (IgG1) una vez a la semana durante 1 semana a monos Cynomolgus macho y hembra mediante inyección subcutánea. Se asignaron cuarenta y ocho monos Cynomolgus (24/sexo) a cuatro grupos de tratamiento (6 animales/sexo/grupo) y recibieron inyecciones subcutáneas de vehículo o ActRIIB-Fc_h a razón de 3, 10 o 30 mg/kg una vez a la semana durante 4 semanas (total de 5 dosis). Los parámetros evaluados fueron la patología clínica general (hematología, química clínica, coagulación y análisis de orina). ActRIIB-Fc_h causó valores

absolutos de reticulocitos estadísticamente significativamente elevados el día 15 en los animales tratados. El día 36, ActRIIB-Fc_h causó varios cambios hematológicos, entre ellos valores medios absolutos elevados de reticulocitos y de anchura de la distribución de glóbulos rojos y una concentración media más baja de hemoglobina corpuscular. Todos los grupos tratados y ambos sexos resultaron afectados. Estos efectos eran consistentes con un efecto positivo de ActRIIB-Fc_h sobre la liberación de reticulocitos inmaduros de la médula ósea. Este efecto se revertió tras el lavado del fármaco de los animales tratados (el día de estudio 56). De acuerdo con lo anterior, los presentes inventores concluyeron que ActRIIB-Fc_h estimula la eritropoyesis.

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

En el presente estudio, se analizaron los efectos de la administración *in vivo* de ActRIIB(20-134)-Fc_m sobre la frecuencia de progenitores hematopoyéticos en médula ósea y bazo. En un grupo de ratones C57BL/6 se inyectó PBS como control y en un segundo grupo de ratones, se administraron dos dosis de ActRIIB-Fc_m a razón de 10 mg/kg y ambos grupos fueron sacrificados tras 8 días. Se utilizó sangre periférica para realizar recuentos sanguíneos completos y se utilizaron fémures y bazos para llevar a cabo ensayos clonogénicos *in vitro* para evaluar el contenido de células progenitoras linfoides, eritroides y mieloides en cada órgano. En el breve marco temporal del presente estudio, no se observaron cambios significativos de los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina o glóbulos blancos en los ratones tratados. En los fémures, no se observó ninguna diferencia en los números de células nucleadas o el contenido de progenitores en grupos de control y tratados. En los bazos, el grupo tratado con compuesto experimentó un incremento estadísticamente significativo del número de colonias de progenitores eritroides maduros (UFC-E) por placa, frecuencia y número total de progenitores por bazo. Además, se observó un incremento del número de progenitores mieloides (UFC-GM), eritroides inmaduros (UFE-E) y número total de progenitores por bazo.

Animales:

En el estudio se utilizaron dieciséis ratones C57BL/6 hembra de 6 a 8 semanas de edad. En ocho ratones se inyectó subcutáneamente compuesto de ensayo ActRIIB-Fc_m los días 1 y 3 a una dosis de 10 mg/kg y en ocho ratones se inyectó por vía subcutánea control de vehículo, solución salina tamponada con fosfato (PBS) a un volumen de 100 µl por ratón. Se sacrificaron todos los ratones 8 días después de la primera inyección de acuerdo con las directrices relevantes de cuidado animal. Se recogieron muestras de sangre periférica (SP) de animales individuales mediante punción cardiaca y se utilizaron para obtener recuentos sanguíneos completos y diferenciales (CBC/dif.). Se recolectaron los fémures y bazos de cada ratón.

Ensayos realizados:

Recuentos de CBC/Dif

Se recogió la SP de cada ratón mediante punción cardiaca y se introdujo en tubos Microtainer apropiados. Las muestras se enviaron a CLV para el análisis en un contador CellDyn 3500.

Ensayos clonogénicos

Se evaluaron los progenitores clonogénicos de los linajes mieloides, eritroides y linfoides utilizando los sistemas basados en metilcelulosa *in vitro* indicados posteriormente.

Progenitores eritroides maduros:

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

Progenitores linfoides:

Se cultivaron progenitores clonogénicos del linaje linfoides (UFC-pre-B) en MethoCult® 3630, un medio a base de metilcelulosa que contiene interleuquina 7 rh (10 ng/ml).

Progenitores eritroides mieloides e inmaduros:

Se cultivaron progenitores clonogénicos de los linajes de granulocitos-monocitos (UFC-GM), eritroide (UFE-E) y multipotencial (UFC-GEMM) en MethoCult™ 3434, un medio a base de metilcelulosa que contiene factor de células madre murino recombinante (rm) (50 ng/ml), interleuquina-6 rh (10 ng/ml), interleuquina-3 rm (10 ng/ml) y eritropoyetina rh (3 U/ml).

Métodos:

Se procesaron fémures y bazos de ratón según protocolos estándares. Brevemente, se obtuvo médula ósea mediante

enjuague de la cavidad femoral con medio de Dulbecco modificado por Iscove que contenía suero de feto bovino al 2% (IMDM, FBS al 2%, por sus siglas en inglés) utilizando una aguja de calibre 21 y una jeringa de 1 cm³. Se obtuvieron células de bazo mediante trituración de bazo a través de un filtro de 70 µm y enjuagando el filtro con IMDM, FBS al 2%. A continuación, se realizaron recuentos de células nucleadas en ácido acético glacial al 3% en las suspensiones de células individuales utilizando una cámara de recuento de Neubauer de manera que pudiese calcularse el número total de células por órgano. Para eliminar los glóbulos rojos contaminantes, seguidamente se diluyeron las células

totales de bazo con 3 veces el volumen de tampón de lisis de cloruro amónico y se incubaron sobre hielo durante 10 minutos. A continuación, se lavaron las células y se resuspendieron en IMDM, FBS al 2% y se llevó a cabo un segundo recuento celular para determinar la concentración celular después de la lisis.

Se prepararon reservas de células y se añadieron a cada formulación de medio a base de metilcelulosa para obtener las concentraciones de siembra en placa óptimas para cada tejido en cada formulación de medio. Se sembraron 1x10⁵ células de médula ósea en cada placa en medio MethoCult™ 3334 para evaluar los progenitores eritroides maduros, 2x10⁵ células en cada placa en MethoCult™ 3630 para evaluar los progenitores linfoides y 3x10⁴ células en cada placa en MethoCult™ 3434 para evaluar los progenitores eritroides y mieloides inmaduros. Se sembraron 4x10⁵ células de bazo en cada placa en medio MethoCult™ 3334 para evaluar los progenitores eritroides maduros, 4x10⁵ células en cada placa en MethoCult™ 3630 para evaluar los progenitores linfoides y 2x10⁵ células en cada placa en MethoCult™ 3434 para evaluar los progenitores eritroides y mieloides inmaduros. Los cultivos sembrados en placas por triplicado se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ hasta la enumeración de las colonias y personal formado llevó a cabo la evaluación. Se cultivaron progenitores eritroides maduros durante 2 días; se cultivaron progenitores linfoides durante 7 días y se cultivaron progenitores eritroides y mieloides maduros durante 12 días.

Análisis:

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

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

Células sembradas por placa
CFC media puntuada por placa

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

CFC totales puntuadas x recuento de células nucleadas por fémur o bazo (tras la lisis de los GR)
Número de células nucleadas cultivadas

Se llevaron a cabo ensayos t estándares para evaluar si existían diferencias en el número medio de células o progenitores hematopoyéticos entre los ratones de control de PBS y los ratones tratados con compuesto. Debido a la potencial subjetividad de la enumeración de colonias, se consideró que un valor de p inferior a 0,01 era significativo. Se muestran los valores medios (+/- SD) para cada grupo en las tablas, a continuación.

Tabla: Parámetros hematológicos

Grupo de tratamiento	Glóbulos blancos (x10 ⁹ /l)	Glóbulos rojos (x10 ⁹ /l)	Hemoglobina (g/l)	Hematócrito (l/l)
PBS (n=8)	9,53 +/- 1,44	10,5 +/- 1,1	160,9 +/- 13,3	0,552 +/- 0,057
ActRIIB-Fc _m (n=8)	9,77 +/- 1,19	10,8 +/- 0,3	162,1 +/- 4,1	0,567 +/- 0,019

Tabla: CFC de fémur y bazo

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

El tratamiento de ratones con ActRIIB (20-134)-Fc_m, en el breve marco temporal del presente estudio, no resultó en incrementos significativos del contenido de glóbulos rojos o hemoglobina. Sin embargo, el efecto sobre el contenido de células progenitoras fue notable. En los fémures, no se observó ninguna diferencia en los números de células nucleadas o el contenido de progenitores en grupos de control y tratados. En los bazo, el grupo tratado con compuesto experimentó un incremento estadísticamente significativo del número de células nucleadas antes de la lisis de los glóbulos rojos y en el número de colonias de progenitores eritroides maduros (UFC-E) por placa, y de la frecuencia y número total de progenitores por bazo. Además, se observó un incremento del número de progenitores mieloides (UFC-GM), eritroides inmaduros (UFE-E) y del número total de progenitores por bazo. De acuerdo con lo anterior, se

espera que, a lo largo de un curso temporal más largo, el tratamiento con ActRIIB(20-134)-Fc_m resultará en un contenido elevado de glóbulos rojos y hemoglobina.

Ejemplo 8: una trampa de GDF incrementa los niveles de glóbulos rojos *in vivo*

Se asignaron ratones CD57BL/6NTac macho de doce semanas de edad a dos grupos de tratamiento (N=10). Los ratones recibieron dosis de vehículo o de un polipéptido ActRIIB variante ("trampa de GDF") [ActRIIB(L79D,20-134)-Fc_h] mediante inyección subcutánea (SC) a razón de 10 mg/kg dos veces a la semana durante 4 semanas. Al terminar el estudio, se recolectó sangre completa mediante punción cardiaca en tubos que contenían EDTA y se analizó la distribución de las células utilizando un analizador hematológico HM2 (Abaxis, Inc.).

Descripción de grupo

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

El tratamiento con la trampa de GDF no presentó un efecto estadísticamente significativo sobre el número de glóbulos blancos (GB) en comparación con los controles de vehículo. El número de glóbulos rojos (GR) se incrementó en el grupo tratado respecto a los controles (ver la tabla, posteriormente). Tanto el contenido de hemoglobina (HGB) como el hematócrito (HCT) también se incrementaron debido a los glóbulos rojos adicionales. La anchura media de los glóbulos rojos (RDWc, por sus siglas en inglés) fue más elevada en los animales tratados, indicando un incremento del pool de glóbulos rojos inmaduros. Por lo tanto, el tratamiento con la trampa de GDF condujo a un incremento de los glóbulos rojos, sin efectos distinguibles sobre las poblaciones de glóbulos blancos.

Resultados hematológicos

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

Ejemplo 9: una trampa de GDF es superior a ActRIIB-Fc en el incremento de los niveles de glóbulos rojos *in vivo*

Se asignaron aleatoriamente ratones C57BL/6NTac macho de diecinueve semanas de edad a tres grupos. Los ratones recibieron una dosis de vehículo (solución salina tamponada con Tris 10 mM, TBS), ActRIIB(20-134)-Fc_m de tipo salvaje o la trampa de GDF ActRIIB(L79D,20-134)-Fc_h mediante inyección subcutánea dos veces a la semana durante tres semanas. Se recogió sangre mediante sangrado por la mejilla en la línea base y tras semanas de administración y se analizó para la distribución de las células utilizando un analizador hematológico (HM2, Abaxis, Inc.).

El tratamiento con ActRIIB-Fc o la trampa de GDF no presentó ningún efecto significativo sobre el número de glóbulos blancos (GB) en comparación con los controles de vehículo. Los niveles de recuento de glóbulos rojos (GR), hematócrito (HCT) y hemoglobina se encontraban elevados en los ratones tratados con trampa de GDF en comparación con los controles o el constructo de tipo salvaje (ver la tabla, posteriormente). Por lo tanto, en una comparación directa, la trampa de GDF se incrementa en los glóbulos rojos en un grado significativamente superior que la proteína ActRIIB-Fc de tipo salvaje. De hecho, en el presente experimento, la proteína ActRIIB-Fc de tipo salvaje no causó un incremento estadísticamente significativo de los glóbulos rojos, sugiriendo que se requeriría una dosis más prolongada o más elevada para revelar este efecto.

Resultados hematológicos tras tres semanas de administración

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

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

Tal como se ha indicado en el Ejemplo 1, se generó una trampa de GDF denominada ActRIIB (L79D, 20-134)-Fc_h mediante fusión N-terminal de líder APT con el dominio extracelular de ActRIIB (residuos 20 a 134 en la SEC ID nº 1) que contiene una sustitución de leucina a aspartato (en el residuo 79 en la SEC ID nº 1) y fusión C-terminal del dominio

Fc humano con un conector mínimo (tres residuos de glicina) (figura 3). Una secuencia de nucleótidos correspondiente a dicha proteína de fusión se muestra en la figura 4.

Se generó una trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB truncado, denominado ActRIIB(L79D, 25-131)-Fc_h mediante fusión N-terminal del líder APT con el dominio extracelular truncado (residuos 25 a 131 en la SEC ID nº 1) que contiene una sustitución de leucina a aspartato (en el residuo 79 en la SEC ID nº 1) y fusión C-terminal del dominio Fc humano con un conector mínimo (tres residuos de glicina) (figura 5). Una secuencia de nucleótidos correspondiente a dicha proteína de fusión se muestra en la figura 6.

Ejemplo 11. Unión de ligando selectiva mediante trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB doblemente truncado

La afinidad de las trampas de GDF y otras proteínas ActRIIB-Fc_h para varios ligandos se evaluó *in vitro* con un instrumento Biacore™. Se muestran los resultados en la tabla, posteriormente. Se obtuvieron valores de K_d mediante ajuste de afinidad de estado estable debido a la asociación y disociación muy rápidas del complejo, que impidió una determinación exacta de K_{on} y K_{off}.

Selectividad de ligando de variantes de ActRIIB-Fc_h:

Constructo de fusión	Activina A (Kd e-11)	Activina B (Kd e-11)	GDF11 (Kd e-11)
ActRIIB(L79 20-134)-Fc _h	1,6	1,2	3,6
ActRIIB(L79D 20-134)-Fc _h	1350,0	78,8	12,3
ActRIIB(L79 25-131)-Fc _h	1,8	1,2	3,1
ActRIIB(L79D 25-131)-Fc _h	2290,0	62,1	7,4

La trampa de GDF con un dominio extracelular truncado, ActRIIB(L79D, 25-131)-Fc_h, alcanzó o superó la selectividad de ligando mostrada por la variante más larga, ActRIIB(L79D, 20-134)-Fc_h, con una pérdida pronunciada de unión de activina A y activina B y una retención prácticamente completa de la unión de GDF11 en comparación con contrapartidas de ActRIIB-Fc_h que no presentaban la sustitución L79D. Observar que el truncado solo (sin la sustitución L79D) no alteró la selectividad entre los ligandos que se muestran en la presente memoria [comparar ActRIIB(L79, 25-131)-Fc_h con ActRIIB(L79, 20-134)-Fc_h].

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

Para generar ActRIIB(L79D, 25-131)-Fc_h, el dominio extracelular de ActRIIB humano con una sustitución del aspartato en la posición nativa 79 (SEC ID nº 1) y con truncados N-terminal y C-terminal (residuos 25 a 131 en la SEC ID nº 1) se fusionó N-terminalmente con una secuencia líder APT en lugar del líder ActRIIB nativo y C-terminalmente con un dominio Fc humano mediante un conector mínimo (tres residuos de glicina) (figura 5). Se muestra una secuencia de nucleótidos codificante de dicha proteína de fusión en la figura 6 (SEC ID nº 27) y una secuencia de nucleótidos alternativa codificante exactamente de la misma proteína de fusión se muestra en la figura 9 (SEC ID nº 30). Esta proteína se expresó y se purificó utilizando la metodología indicada en el Ejemplo 1.

Ejemplo 13. Trampa de GDF con un dominio extracelular de ActRIIB truncado incrementa la proliferación de progenitores eritroides en ratones

Se evaluó ActRIIB(L79D, 25-131)-Fc_h para determinar su efecto sobre la proliferación de progenitores eritroides. Se trataron ratones C57BL/6 macho (8 semanas de edad) con ActRIIB(L79D, 25-131)-Fc_h (10 mg/kg, s.c., n=6) o vehículo (TBS, n=6) los días 1 y 4, después se eutanizaron el día 8 para la recolección de bazo, tibias, fémures y sangre. Se aislaron las células del bazo y la médula ósea, se diluyeron en medio de Dulbecco modificado por Iscove que contenía suero de feto bovino al 5%, se suspendieron en medio a base de metilcelulosa especializado y se cultivaron durante 2 o 12 días para evaluar los niveles de progenitores clonogénicos en la unidad formadora de colonias-eritroides (UFC-E) y estadios de unidades formadoras en estallido-eritroides (UFE-E), respectivamente. El medio a base de metilcelulosa para la determinación de UFE-E (MethoCult M3434, Stem Cell Technologies) incluía factor de células madre murino recombinante, interleuquina-3 e interleuquina-6, que no se encontraban presentes en el medio de metilcelulosa para la determinación de UFC-E (MethoCult M3334, Stem Cell Technologies), mientras que ambos medios contenían eritropoyetina, entre otros constituyentes. Para tanto UFE-E como UFC-E, se determinó el número de colonias en placas de cultivo por duplicado derivadas de cada muestra de tejido, y el análisis estadístico de los resultados se basó en el número de ratones por grupo de tratamiento.

Los cultivos derivados de bazo procedentes de ratones tratados con ActRIIB(L79D, 25-131)-Fc_h presentaba el doble de colonias de UFC-E que los cultivos correspondientes de ratones de control (P<0,05), mientras que el número de colonias UFE-E no difería significativamente con tratamiento *in vivo*. El número de colonias UFC-E o UFE-E de cultivos de médula ósea tampoco difería significativamente con el tratamiento. Tal como se esperaba, un número incrementado de colonias de UFC-E en cultivos derivados de bazo se vio acompañado de cambios altamente significativos (P<0,001) en el nivel de glóbulos rojos (incremento de 11,6%), de concentración de hemoglobina (incremento de 12%) y del nivel

de hematócrito (incremento de 11,6%) en el momento de la eutanasia en ratones tratados con ActRIIB(L79D, 25-131)-Fc_h en comparación con los controles. Estos resultados indican que la administración *in vivo* de una trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB truncado puede estimular la proliferación de progenitores eritroides como parte de su efecto global de incremento de los niveles de glóbulos rojos.

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

Los solicitantes investigaron el efecto de ActRIIB(L79D, 25-131)-Fc_h sobre parámetros eritropoyéticos en un modelo de ratón de anemia inducida por quimioterapia basado en paclitaxel, que inhibía la división celular mediante el bloqueo de la polimerización de los microtúbulos. Se asignaron ratones C57BL/6 macho (8 semanas de edad) a cuatro tratamientos.

- 1) Paclitaxel (25 mg/kg, i.p.)
- 2) ActRIIB(L79D 25-131)-Fc_h (10 mg/kg, i.p.)
- 3) Paclitaxel + ActRIIB(L79D 25-131)-Fc_h
- 4) Vehículo (TBS).

Se administró paclitaxel el día 0, mientras que se administró ActRIIB(L79D, 25-131)-Fc_h o vehículo los días 0 y 3. Se recogieron muestras de sangre para el análisis de CBC de cohortes separados los días 1, 3 y 5 y se expresaron los resultados para los grupos de tratamiento 1 a 3 (anteriormente) como diferencia porcentual respecto al vehículo en un punto temporal dado. El desgaste debido a la toxicidad del paclitaxel constituyó un problema en la cohorte de solo paclitaxel el día 3 (donde n=1); en cualquier otro caso, n=3-5 por tratamiento por punto temporal. En comparación con el vehículo, el paclitaxel solo redujo la concentración de hemoglobina prácticamente el 13% el día 5, mientras que la adición de ActRIIB(L79D, 25-131)-Fc_h evitó este declive inducido por paclitaxel (figura 11). Se observaron resultados similares para los niveles de hematócrito y GR. En ausencia de paclitaxel, ActRIIB(L79D, 25-131)-Fc_h incrementó la concentración de hemoglobina en 10% en comparación con el vehículo los días 3 y 5 (figura 11). De esta manera, una trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB truncado puede incrementar los niveles de glóbulos rojos suficientemente para compensar la anemia inducida por quimioterapia.

Ejemplo 15. Trampa de GDF con un dominio extracelular de ActRIIB truncado revierte la anemia inducida por nefrectomía en ratones

Los solicitantes investigaron el efecto de ActRIIB (L79D, 25-131)-Fc_h sobre la anemia en el modelo de ratón nefrectomizado de enfermedad renal crónica. Ratones C57BL/6 macho (11 semanas de edad) fueron sometidos a una operación simulada o una nefrectomía unilateral para reducir la capacidad de producción de eritropoyetina. Se dejó una semana de recuperación postquirúrgica y después fueron tratados dos veces a la semana con ActRIIB(L79D, 25-131)-Fc_h (10 mg/kg, i.p.; n=15 por condición) o vehículo (TBS, n=15 por condición) durante un total de 4 semanas. Se recogieron muestras de sangre antes del inicio de la administración y tras 4 semanas de tratamiento. Mientras que los ratones nefrectomizados tratados con vehículo mostraron un declive significativo del número de glóbulos rojos durante el periodo de tratamiento de 4 semanas, el tratamiento con ActRIIB(L79D, 25-131)-Fc_h no sólo evitó el declive sino que *incrementó* los niveles de glóbulos rojos el 17% (P<0,001) respecto a la línea base (figura 12), a pesar de la capacidad renal reducida para la producción de eritropoyetina. En ratones nefrectomizados, ActRIIB(L79D, 25-131)-Fc_h también generó incrementos significativos respecto de la línea base de la concentración de hemoglobina y del nivel de hematócrito y, especialmente, estimuló cada uno de estos parámetros eritropoyéticos aproximadamente en la misma medida bajo condiciones nefrectomizados que bajo condiciones de operación simulada (figura 13). De esta manera, una trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB truncado puede incrementar los niveles de glóbulos rojos suficientemente para revertir la anemia en un modelo de enfermedad renal crónica.

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

Los solicitantes investigaron el efecto de ActRIIB(L79D, 25-131)-Fc_h sobre parámetros eritropoyéticos en un modelo de rata de anemia inducido por pérdida aguda de sangre (anemia posthemorrágica aguda). Ratas Sprague-Dawley macho (de aproximadamente 300 g) recibieron un catéter yugular crónico del proveedor (Harlan). El día 1, se extrajo 20% del volumen total de sangre de cada rata durante un periodo de 5 min por el catéter bajo anestesia con isoflurano. El volumen de sangre extraído se basa en un valor de volumen total de sangre calculado según la relación siguiente derivada por Lee y colaboradores (J. Nucl. Med. 25:72-76, 1985) para ratas con un peso corporal superior a 120 g:

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

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

Las ratas de control respondieron a la pérdida de 20% de sangre con una caída de prácticamente 15% de los niveles de glóbulos rojos el día 0. Estos niveles se mantuvieron significativamente más bajos que la línea base los días 2 y 4 y no se habían recuperado por completo el día 6 (figura 14). Aunque las ratas tratadas con ActRIIB(L79D, 25-131)-Fc_h mostraron una caída prácticamente idéntica de los niveles de glóbulos rojos tras la pérdida de 20% de sangre, estas ratas mostraron a continuación una recuperación completa de dichos niveles el día 2, seguido de una elevación adicional los días 4 y 6, que representa una mejora altamente significativa respecto a los niveles de control en los puntos temporales correspondientes (figura 14). Se obtuvieron resultados similares para la concentración de hemoglobina. Estos resultados demuestran que una trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB truncado puede producir una recuperación más rápida de los niveles de glóbulos rojos de la anemia causada por hemorragia aguda.

Ejemplo 17. Trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB truncado incrementa los niveles de glóbulos rojos en primates no humanos

Se evaluaron dos trampas de GDF: ActRIIB(L79D, 20-134)-Fc_h y ActRIIB(L79D, 25-131)-Fc_h para su capacidad de estimular la producción de glóbulos rojos en monos *Cynomolgus*. Los monos se trataron por vía subcutánea con trampa de GDF (10 mg/kg, n=4 machos/4 hembras) o vehículo (n=2 machos/2 hembras) los días 1 y 8. Se recogieron muestras de sangre los días 1 (línea de base pretratamiento), 3, 8, 15, 29 y 44, y se analizaron para los niveles de glóbulos rojos (figura 15), hematócrito (figura 16), niveles de hemoglobina (figura 17) y niveles de reticulocitos (figura 18). Los monos tratados con vehículo mostraron niveles reducidos de glóbulos rojos, hematócrito y hemoglobina en todos los puntos temporales post-tratamiento, un efecto esperado del muestreo repetido de sangre. En contraste, el tratamiento con ActRIIB(L79D, 20-134)-Fc_h o ActRIIB(L79D, 25-131)-Fc_h incrementó estos parámetros ya en el primer punto temporal post-tratamiento (día 3) y los mantuvo en niveles sustancialmente elevados durante todo el estudio (figuras 15 a 17). Resulta importante que los niveles de reticulocitos en monos tratados con ActRIIB(L79D, 20-134)-Fc_h o ActRIIB(L79D, 25-131)-Fc_h se incrementaron sustancialmente los días 8, 15 y 29 en comparación con el vehículo (figura 18). Este resultado demuestra que el tratamiento de trampa de GDF incrementa la producción de precursores de glóbulos rojos, resultando en niveles elevados de glóbulos rojos.

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

Ejemplo 18. Trampa de GDF derivada de ActRIIB5

Otros han informado de una forma soluble alternativa de ActRIIB (denominada ActRIIB5), en la que el exón 4, que incluye el dominio transmembranal de ActRIIB, ha sido sustituido por una secuencia C-terminal diferente (documento n° WO2007/053775).

La secuencia de ActRIIB5 humana nativa sin su líder es la siguiente:

```
GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWLDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCLEGPAHE
```

(SEC ID n° 36)

Puede llevarse a cabo una sustitución de leucina a aspartato, u otras sustituciones ácidas, en la posición nativa 79 (subrayada y en negrita) tal como se indica para construir la variante ActRIIB5(L79), que presente la secuencia a continuación:

```
GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWLDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCLEGPAHE
```

(SEC ID n° 37)

Esta variante puede conectarse a Fc humana con un conector TGGG para generar una proteína de fusión humana ActRIIB5(L79D)-Fc_h con la secuencia a continuación:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGSALWLCLEGPAHETGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 38)

Este constructo puede expresarse en células CHO.

5 Aunque se han comentado realizaciones específicas de la materia objeto de la invención, la especificación anterior es ilustrativa y no limitativa. Muchas variaciones resultarán evidentes para el experto en la materia tras la revisión de la presente especificación y las reivindicaciones, posteriormente. El alcance completo de la invención debe determinarse en referencia a las reivindicaciones, junto con el alcance completo de los equivalentes, y la especificación, junto con dichas variaciones.

10 Esta variante puede conectarse a Fc humana con un conector TGGG para generar una proteína de fusión humana ActRIIB5(L79D)-Fc_h con la secuencia a continuación:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGSALWLCLEGPAHETGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID nº 38)

15 Este constructo puede expresarse en células CHO.

INCORPORACIÓN COMO REFERENCIA

20 Aunque se han comentado realizaciones específicas de la materia objeto de la invención, la especificación anterior es ilustrativa y no limitativa. Muchas variaciones comprendidas dentro del alcance según las reivindicaciones resultarán evidentes para el experto en la materia tras la revisión de la presente especificación y las reivindicaciones, a continuación. El alcance completo de la invención debe determinarse en referencia a las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido ActRIIB variante que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de SEC ID nº 1, comprende ácido glutámico o ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de SEC ID nº 1 e inhibe la señalización por miostatina y/o GD-FF en un ensayo celular para la utilización en un método de incremento de los niveles de glóbulos rojos o en un método de tratamiento de una anemia en un paciente que lo requiere.
2. Polipéptido para la utilización según la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido ActRIIB variante comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 90% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia que se inicia en cualquiera de los aminoácidos 22 a 24 de la SEC ID nº 1, y que termina en cualquiera de los aminoácidos 133 a 134 de la SEC ID nº 1, (b) una secuencia que se inicia en cualquiera de los aminoácidos 21 a 29 de la SEC ID nº 1, y que termina en cualquiera de los aminoácidos 118 a 134 de la SEC ID nº 1, (c) una secuencia que se inicia en cualquiera de los aminoácidos 21 a 29 de la SEC ID nº 1, y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128 a 134 de la SEC ID nº 1, (d) una secuencia que se inicia en cualquiera de los aminoácidos 21 a 24 de la SEC ID nº 1, y que termina en cualquiera de los aminoácidos 109 a 134 de la SEC ID nº 1, (e) una secuencia que se inicia en cualquiera de los aminoácidos 21 a 24 de la SEC ID nº 1, y que termina en cualquiera de los aminoácidos 118 a 134 de la SEC ID nº 1, (f) una secuencia que se inicia en cualquiera de los aminoácidos 21 a 24 de la SEC ID nº 1, y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128 a 134 de la SEC ID nº 1, (g) una secuencia que se inicia en cualquiera de los aminoácidos 20 a 29 de la SEC ID nº 1, y que termina en cualquiera de los aminoácidos 109 a 133 de la SEC ID nº 1, (h) una secuencia que se inicia en cualquiera de los aminoácidos 20 a 29 de la SEC ID nº 1, y que termina en cualquiera de los aminoácidos 118 a 133 de la SEC ID nº 1, (i) una secuencia que se inicia en cualquiera de los aminoácidos 20 a 29 de la SEC ID nº 1, y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128 a 133 de la SEC ID nº 1, (j) una secuencia que se inicia en cualquiera de los aminoácidos 20 a 24 de la SEC ID nº 1, y que termina en cualquiera de los aminoácidos 109 a 133 de la SEC ID nº 1, (k) una secuencia que se inicia en cualquiera de los aminoácidos 20 a 24 de la SEC ID nº 1, y que termina en cualquiera de los aminoácidos 118 a 133 de la SEC ID nº 1, (l) una secuencia que se inicia en cualquiera de los aminoácidos 20 a 24 de la SEC ID nº 1, y que termina en cualquiera de los aminoácidos 128 a 133 de la SEC ID nº 1, y (m) una secuencia que se inicia en el aminoácido 20 de la SEC ID nº 1 y que termina en el aminoácido 134 de la SEC ID nº 1.
3. Polipéptido para la utilización según la reivindicación 2, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es (a) por lo menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos 29 a 109 de SEC ID nº 1, (b) por lo menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos 25 a 118 de SEC ID nº 1, (c) por lo menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos 25 a 128 de SEC ID nº 1, (d) por lo menos 97% idéntica a la secuencia de aminoácidos 25 a 131 de SEC ID nº 1.
4. Polipéptido para la utilización según cualquier reivindicación anterior, en el que el paciente es un paciente humano.
5. Polipéptido para la utilización según cualquier reivindicación anterior, en el que el paciente presenta anemia asociada a un trastorno renal, asociado a un tratamiento de quimioterapia, o que se produce como consecuencia de la pérdida de sangre.
6. Polipéptido para la utilización según la reivindicación 5, en el que el trastorno renal es enfermedad renal crónica.
7. Polipéptido para la utilización según la reivindicación 5, en el que el tratamiento de quimioterapia es un taxano.
8. Polipéptido para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el paciente presenta anemia asociada a enfermedad o insuficiencia renal crónica.
9. Polipéptido para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el paciente presenta anemia asociada a enfermedad o insuficiencia renal aguda.
10. Polipéptido para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el paciente presenta anemia asociada a mieloma múltiple.
11. Polipéptido para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el paciente presenta anemia asociada a síndrome mielodisplásico.
12. Polipéptido para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el paciente presenta anemia asociada a talasemia.

13. Polipéptido para la utilización según cualquier reivindicación anterior, en el que el incremento de los niveles de glóbulos rojos se mide como un incremento de los niveles de hemoglobina en la sangre.
- 5 14. Polipéptido para la utilización según cualquier reivindicación anterior, que causa un incremento de menos de 15% de la masa muscular esquelética del paciente.
- 10 15. Polipéptido para la utilización según cualquier reivindicación anterior, en el que el polipéptido es una proteína de fusión que incluye, además de un dominio de polipéptido ActRIIB variante, una parte polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en:
un dominio Fc de inmunoglobulina y una albúmina sérica.
- 15 16. Polipéptido de fusión para la utilización según la reivindicación 15, en el que el polipéptido comprende además una región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina.
- 20 17. Polipéptido de fusión para la utilización según la reivindicación 16, en el que la región constante de una inmunoglobulina es un dominio Fc.
- 25 18. Polipéptido de fusión para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el que la proteína de fusión forma un homodímero.
- 30 19. Polipéptido de fusión para la utilización según la reivindicación 18, en el que la región constante se deriva de una cadena pesada de IgG.
- 35 20. Polipéptido de fusión para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en el que el polipéptido comprende además un dominio conector Gly-Gly-Gly.
- 40 21. Polipéptido para la utilización según la reivindicación 15 o según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20 en caso de ser dependientes de la reivindicación 15, en el que la proteína de fusión incluye uno o más residuos aminoácidos modificados seleccionados de: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con una fracción lipídica, y un aminoácido conjugado con un agente derivatizante orgánico.
- 45 22. Polipéptido para la utilización según cualquier reivindicación anterior, en el que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos 29 a 109 de SEC ID nº 1 o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 95% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos 29 a 109 de SEC ID nº 1 y comprende ácido glutámico o ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEC ID nº 1.
- 50 23. Polipéptido para la utilización según cualquier reivindicación anterior, en el que el polipéptido comprende la secuencia SEC ID nº 7 o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 95% o 99% idéntica a la secuencia SEC ID nº 7 y comprende ácido glutámico o ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEC ID nº 1.
- 55 24. Polipéptido para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en el que el polipéptido comprende la secuencia SEC ID nº 32 o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 95% o 99% idéntica a la secuencia SEC ID nº 32 y comprende ácido glutámico o ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEC ID nº 1.
- 60 25. Polipéptido para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en el que el polipéptido comprende la secuencia SEC ID nº 37 o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 95% o 99% idéntica a la secuencia SEC ID nº 37 y comprende ácido glutámico o ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEC ID nº 1.
- 65 26. Polipéptido para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en el que el polipéptido comprende la secuencia SEC ID nº 38 o una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 95% o 99% idéntica a la secuencia SEC ID nº 38 y comprende ácido glutámico o ácido aspártico en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEC ID nº 1.
27. Polipéptido para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en el que el polipéptido comprende la secuencia SEC ID nº 28.
28. Polipéptido para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en el que el polipéptido comprende la secuencia SEC ID nº 29.
29. Polipéptido para la utilización según cualquier reivindicación anterior, en el que el polipéptido presenta una proporción de unión de GDF11:activina A que es superior a la proporción para el polipéptido ActRIIB de tipo salvaje correspondiente.

30. Preparación farmacéutica que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29.

ActRIIa	ILGRSETQEC	LFENANWEKD	RTNQTGVEPC	YGD KDKRR HC	FATWKNISGS
ActRIIb	GRGEAETREC	IYYNANWELE	RTN Q SGLERC	EGE QDKRL HC	YASWRN SS GT

IEIVKQGCWL	DDINCYDRTD	CVEKKDSPEV	YFCCCEGNMC	NEKFSYFP	EM
IELVKKGCWL	DDFN CYDR QE	CVATEENPQV	YFCCCEGNFC	NERFTHLPEA	

EVTQPTSNPV	TPKPPT
GGPEVTYEPP	PTAPT

FIGURA 1

		10	20	30	40	50	
Iib de rata	M	A	A	A	A	-LALL	GSLCAGSGRGEAETRECIYVNAWELERTNOSGLER-CEGEQDKR
Iib de cerdo	M	A	A	A	A	-LALL	GSLCVGSGRGEAETRECIYVNAWELERTNOSGLER-CEGEQDKR
Iib de ratón	M	A	A	A	A	-LALL	GSLCAGSGRGEAETRECIYVNAWELERTNOSGLER-CEGEQDKR
Iib humano	M	A	A	V	A	-LALL	GSLCAGSGRGEAETRECIYVNAWELERTNOSGLER-CEGEQDKR
Iib bovino	M	A	A	A	A	-LALL	GSLCAGSGRGEAETRECIYVNAWELERTNOSGLER-CEGEQDKR
Iib de <i>Xenopus</i>	M	G	A	V	A	L	L L L L A T T R A G S G H D E V E T R E C I Y V N A W E L E R T N O S G V E R L V E G K K D K R
IIA humano	M	G	A	A	K	L	A F A V F L I S C S S G A I L G R S E T D E C L F F N A N W E K D R T N O T G V E F - C Y G D K D K R
Consenso	M	A	A	A	A	X I a I I I G S I C A G S G I G H A E T R E C I Y V N A W E L E R T N O S G I E I L C E G E Q D K R	
	60	70	80	90	100	110	
Iib de rata	L	H	C	A	S	R	N S S G T I E L V K K G C W L D D F N C Y D R D E C V A T E E N F Q V Y F C C C E G N F C N E R F T
Iib de cerdo	L	H	C	A	S	R	N S S G T I E L V K K G C W L D D F N C Y D R D E C V A T E E N F Q V Y F C C C E G N F C N E R F T
Iib de ratón	L	H	C	A	S	R	N S S G T I E L V K K G C W L D D F N C Y D R D E C V A T E E N F Q V Y F C C C E G N F C N E R F T
Iib humano	L	H	C	A	S	R	N S S G T I E L V K K G C W L D D F N C Y D R D E C V A T E E N F Q V Y F C C C E G N F C N E R F T
Iib bovino	L	H	C	A	S	R	N S S G T I E L V K K G C W L D D F N C Y D R D E C V A T E E N F Q V Y F C C C E G N F C N E R F T
Iib de <i>Xenopus</i>	L	H	C	A	S	R	N S S G T I E L V K K G C W L D D F N C Y D R D E C I A K E E N F Q V Y F C C C E G N F C N K K F T
IIA humano	R	H	C	A	T	N	K K I S G S I E I V K G C W L S I N C Y D R T D C V E K K S S E V Y F C C C E G N M C N S K F S
Consenso	L	H	C	A	S	R	N S S G T I E I V K K G C W L D D F N C Y D R D E C V A T E E N F Q V Y F C C C E G N F C N E R F T
	120	130	140	150			
Iib de rata	H	L	E	F	G	G	R E V T Y E P - P P T A P T L L V L A Y S L L I G G L S -
Iib de cerdo	H	L	E	F	G	G	R E V T Y E P - P P T A P T L L V L A Y S L L I G G L S -
Iib de ratón	H	L	E	F	G	G	R E V T Y E P - P P T A P T L L V L A Y S L L I G G L S -
Iib humano	H	L	E	F	G	G	R E V T Y E P - P P T A P T L L V L A Y S L L I G G L S -
Iib bovino	H	L	E	F	G	G	R E V T Y E P - P P T A P T L L V L A Y S L L I G G L S -
Iib de <i>Xenopus</i>	H	L	E	F	G	G	R E V T Y E P - P P T A P T L L V L A Y S L L I G G L S -
IIA humano	Y	E	F	E	M	E	V T O P T S N F - V T P K P P Y Y I L L Y S L V L M L I -
Consenso	H	L	E	F	G	G	R E V T Y E P - P P T A P T L L V L A Y S L L I G G L S -

FIGURA 2

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

FIGURA 3

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
   TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

51  AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG
   TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGAGACCCGC ACCCCTCCGA CTCTGTGCCC

101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC
   TCACGTAGAT GATGTTGCGG TTGACCCTCG ACCTCGCGTG GTTGGTCTCG

151 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC
   CCGGACCTCG CGACGCTTCC GCTCGTCCTG TTCGCCGACG TGACGATGCG

201 CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT
   GAGGACCGCG TTGTCGAGAC CGTGGTAGCT CGAGCACTTC TTCCCGACGA

251 GGGATGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG
   CCCTACTACT GAAGTTGACG ATGCTATCCG TCCTCACACA CCGGTGACTC

301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA
   CTCTTGGGGG TCCACATGAA GACGACGACA CTTCCGTTGA AGACGTTGCT

351 GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC
   CGCGAAGTGA GTAAACGGTC TCCGACCCCC GGGCCTTCAG TGCATGCTCG

401 CACCCCCGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
   GTGGGGGCTG TCGGGGGTGG CCACCACCTT GAGTGTGTAC GGGTGGCAGC

451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAAA
   GGTCTGTGAC TTGAGGACCC CCCTGGCAGT CAGAAGGAGA AGGGGGGTTT

501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
   TGGGTTCTTG TGGGAGTACT AGAGGGCCTG GGGACTCCAG TGTACGCACC

551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
   ACCACCTGCA CTCGGTGCTT CTGGGACTCC AGTTCAAGTT GACCATGCAC

601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
   CTGCCGCACC TCCACGTATT ACGGTTCTGT TTCGGCGCCC TCCTCGTCAT

651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT
   GTTGTCTGTC ATGGCACACC AGTCGCAGGA GTGGCAGGAC GTGGTCCTGA

701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
   CCGACTTACC GTTCCTCATG TTCACGTTCC AGAGGTTGTT TCGGGAGGGT

751 GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
   CGGGGGTAGC TCTTTTGGTA GAGGTTTCGG TTTCCCGTCG GGGCTCTTGG

```

FIGURA 4

801	ACAGGTGTAC	ACCCTGCCCC	CATCCCGGGA	GGAGATGACC	AAGAACCAGG
	TGTCCACATG	TGGGACGGGG	GTAGGGCCCT	CCTCTACTGG	TTCTTGGTCC
851	TCAGCCTGAC	CTGCCTGGTC	AAAGGCTTCT	ATCCCAGCGA	CATCGCCGTG
	AGTCGGACTG	GACGGACCAG	TTTCCGAAGA	TAGGGTCGCT	GTAGCGGCAC
901	GAGTGGGAGA	GCAATGGGCA	GCCGGAGAAC	AACTACAAGA	CCACGCCTCC
	CTCACCCCTCT	CGTTACCCGT	CGGCCTCTTG	TTGATGTTCT	GGTGCGGAGG
951	CGTGCTGGAC	TCCGACGGCT	CCTTCTTCCT	CTATAGCAAG	CTCACCGTGG
	GCACGACCTG	AGGCTGCCGA	GGAAGAAGGA	GATATCGTTC	GAGTGGCACC
1001	ACAAGAGCAG	GTGGCAGCAG	GGGAACGTCT	TCTCATGCTC	CGTGATGCAT
	TGTTCTCGTC	CACCGTCGTC	CCCTTGCAGA	AGAGTACGAG	GCACTACGTA
1051	GAGGCTCTGC	ACAACCACTA	CACGCAGAAG	AGCCTCTCCC	TGTCCCCGGG
	CTCCGAGACG	TGTTGGTGAT	GTGCGTCTTC	TCGGAGAGGG	ACAGGGGCCC
1101	TAAATGA (SEC ID n° 25)				
	ATTTACT (SEC ID n° 33)				

FIGURA 4 CONT.

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

FIGURA 5

1	<u>ATGGATGCAA</u>	<u>TGAAGAGAGG</u>	<u>GCTCTGCTGT</u>	<u>GTGCTGCTGC</u>	<u>TGTGTGGAGC</u>
	TACCTACGTT	ACTTCTCTCC	CGAGACGACA	CACGACGACG	ACACACCTCG
			E T R E C I Y Y		
51	<u>AGTCTTCGTT</u>	<u>TCGCCCCGGCG</u>	<u>CCGCTGAGAC</u>	<u>ACGGGAGTGC</u>	<u>ATCTACTACA</u>
	TCAGAAGCAA	AGCGGGCCGC	GGCGACTCTG	TGCCCTCACG	TAGATGATGT
	N A N W E L E R T N Q S G L E R C				
101	<u>ACGCCAACTG</u>	<u>GGAGCTGGAG</u>	<u>CGCACCAACC</u>	<u>AGAGCGGCCT</u>	<u>GGAGCGCTGC</u>
	TGCGGTTGAC	CCTCGACCTC	GCGTGGTTGG	TCTCGCCGGA	CCTCGCGACG
	E G E Q D K R L H C Y A S W R N S				
151	<u>GAAGGCGAGC</u>	<u>AGGACAAGCG</u>	<u>GCTGCACTGC</u>	<u>TACGCCTCCT</u>	<u>GGCGCAACAG</u>
	CTTCCGCTCG	TCCTGTTCGC	CGACGTGACG	ATGCGGAGGA	CCGCGTTGTC
	S G T I E L V K K G C W D D D F				
201	<u>CTCTGGCACC</u>	<u>ATCGAGCTCG</u>	<u>TGAAGAAGGG</u>	<u>CTGCTGGGAC</u>	<u>GATGACTTCA</u>
	GAGACCGTGG	TAGCTCGAGC	ACTTCTTCCC	GACGACCCTG	CTACTGAAGT
	N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V				
251	<u>ACTGCTACGA</u>	<u>TAGGCAGGAG</u>	<u>TGTGTGGCCA</u>	<u>CTGAGGAGAA</u>	<u>CCCCCAGGTG</u>
	TGACGATGCT	ATCCGTCCTC	ACACACCGGT	GACTCCTCTT	GGGGGTCCAC
	Y F C C C E G N F C N E R F T H L				
301	<u>TACTTCTGCT</u>	<u>GCTGTGAAGG</u>	<u>CAACTTCTGC</u>	<u>AACGAGCGCT</u>	<u>TACTCATTTT</u>
	ATGAAGACGA	CGACACTTCC	GTTGAAGACG	TTGCTCGCGA	AGTGAGTAAA
	P E A G G P E V T Y E P P P T				
351	<u>GCCAGAGGCT</u>	<u>GGGGGCCCGG</u>	<u>AAGTCACGTA</u>	<u>CGAGCCACCC</u>	<u>CCGACAGGTG</u>
	CGGTCTCCGA	CCCCCGGGCC	TTCAGTGCAT	GCTCGGTGGG	GGCTGTCCAC
401	GTGGAAGTCA	CACATGCCCA	CCGTGCCCAG	CACCTGAACT	CCTGGGGGGA
	CACCTTGAGT	GTGTACGGGT	GGCACGGGTC	GTGGACTTGA	GGACCCCCCT
451	CCGTCAGTCT	TCCTCTTCCC	CCCAAACCC	AAGGACACCC	TCATGATCTC
	GGCAGTCAGA	AGGAGAAGGG	GGGTTTTGGG	TTCCTGTGGG	AGTACTAGAG
501	CCGGACCCCT	GAGGTCACAT	GCGTGGTGGT	GGACGTGAGC	CACGAAGACC
	GGCCTGGGGA	CTCCAGTGTA	CGCACCAcca	CCTGCACTCG	GTGCTTCTGG
551	CTGAGGTCAA	GTTCAACTGG	TACGTGGACG	GCGTGGAGGT	GCATAATGCC
	GACTCCAGTT	CAAGTTGACC	ATGCACCTGC	CGCACCTCCA	CGTATTACGG

FIGURA 6

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

FIGURA 6 CONT.

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

FIGURA 7

1 ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
51 KGCWDDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
101 TYEPPPT (SEC ID n° 29)

FIGURA 8

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCCGAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA
 TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGGCTTTG GCGCTTACA TAAATAATGT

101 ATGCTAATTG GGAACTCGAA CGGACGAACC AATCCGGGCT CGAACGGTGT
 TACGATTAAC CCTTGAGCTT GCCTGCTTGG TTAGGCCCCG GCTTGCCACA

151 GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTCGT GGAGGAACTC
 CTCCCCCTTG TCCTATTTGC GGAGGTAACG ATACGCAGCA CCTCCTTGAG

201 CTCCGGGACG ATTGAACTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTTC
 GAGGCCCTGC TAACTTGACC AGTTCTTTCC CACGACCCTG CTGCTAAAGT

251 ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTCGCGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC
 TAACAATACT GCGGTCCTT ACACAGCGCT GGCTTCTCTT AGGCGTCCAG

301 TATTTCTGTT GTTGCGAGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT
 ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTAAAGACA TTACTTGCCA AATGGGTGGA

351 CCCCGAAGCC GCGGGGCCCG AGGTGACCTA TGAACCCCGG CCCACCGGTG
 GGGGCTTCGG CCGCCCGGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGGC GGGTGGCCAC

401 GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA
 CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
 GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
 GGCTTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
 GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
 TTCTGTTTTG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
 GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

FIGURA 9

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

FIGURA 9 CONT.

GAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA ATGCTAATTG GGA^{ACTCGAA} CGGACGAACC
 AATCCGGGCT CGAACGGTGT GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTCGT
 GGAGGAACTC CTCCGGGACG ATTGA^{ACTGG} TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTTC^A
 ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTCGCGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC TATTTCTGTT
 GTTGCAGAGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT CCCC^{GAAGCC} GGCGGGCCCG
 AGGTGACCTA TGAACCC^{CCG} CCCACC (SEC ID n° 31)

FIGURA 10

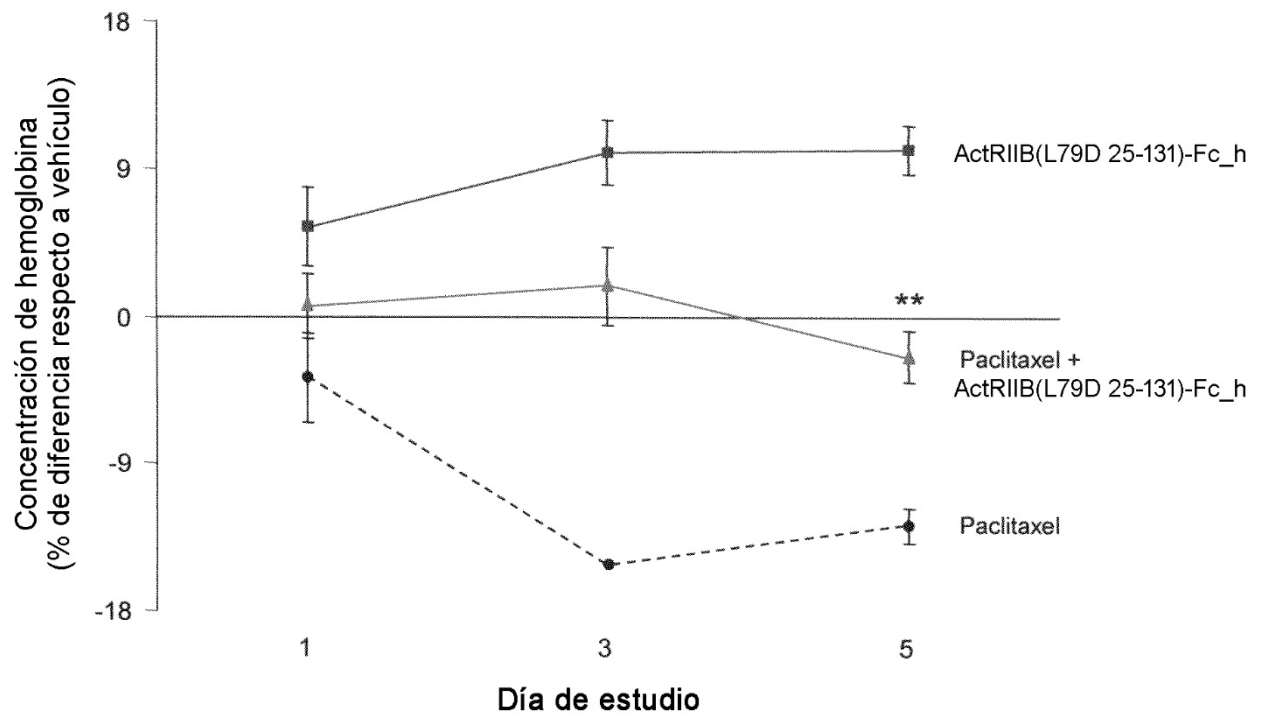


FIGURA 11

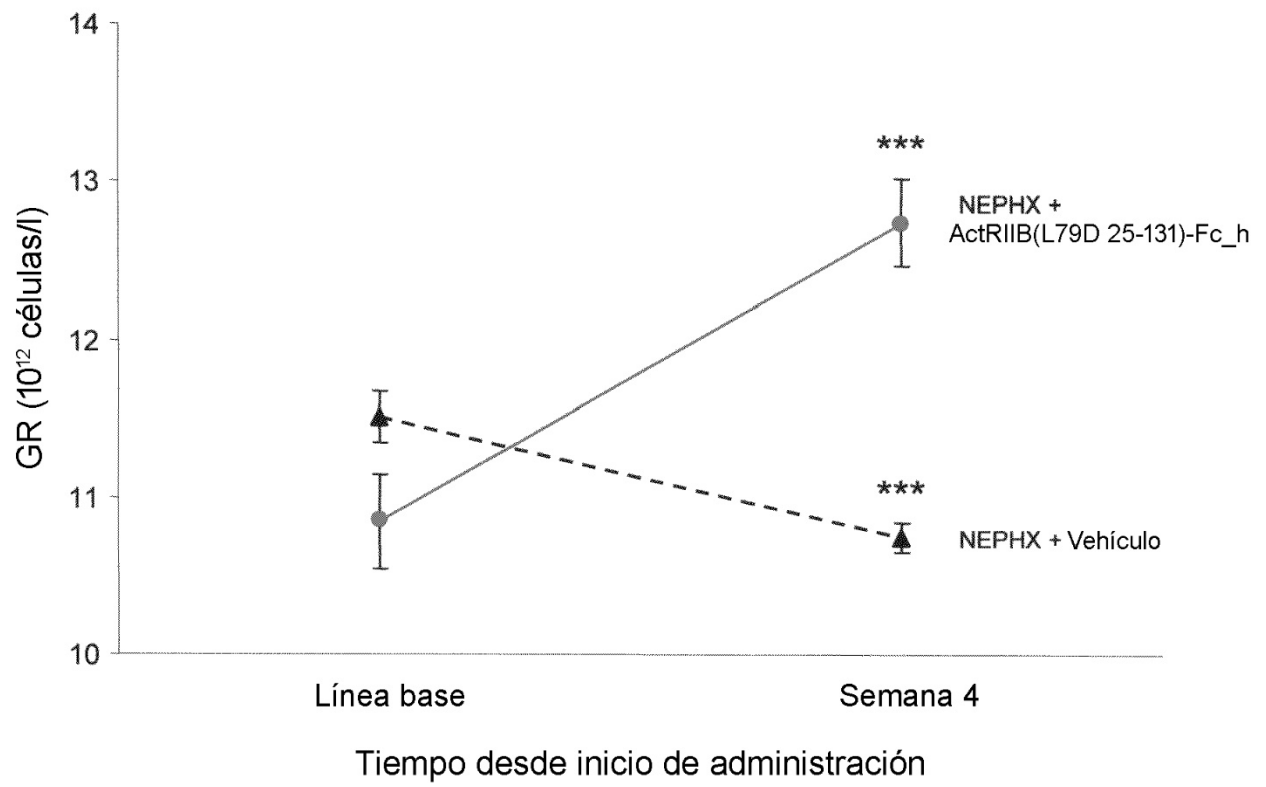


FIGURA 12

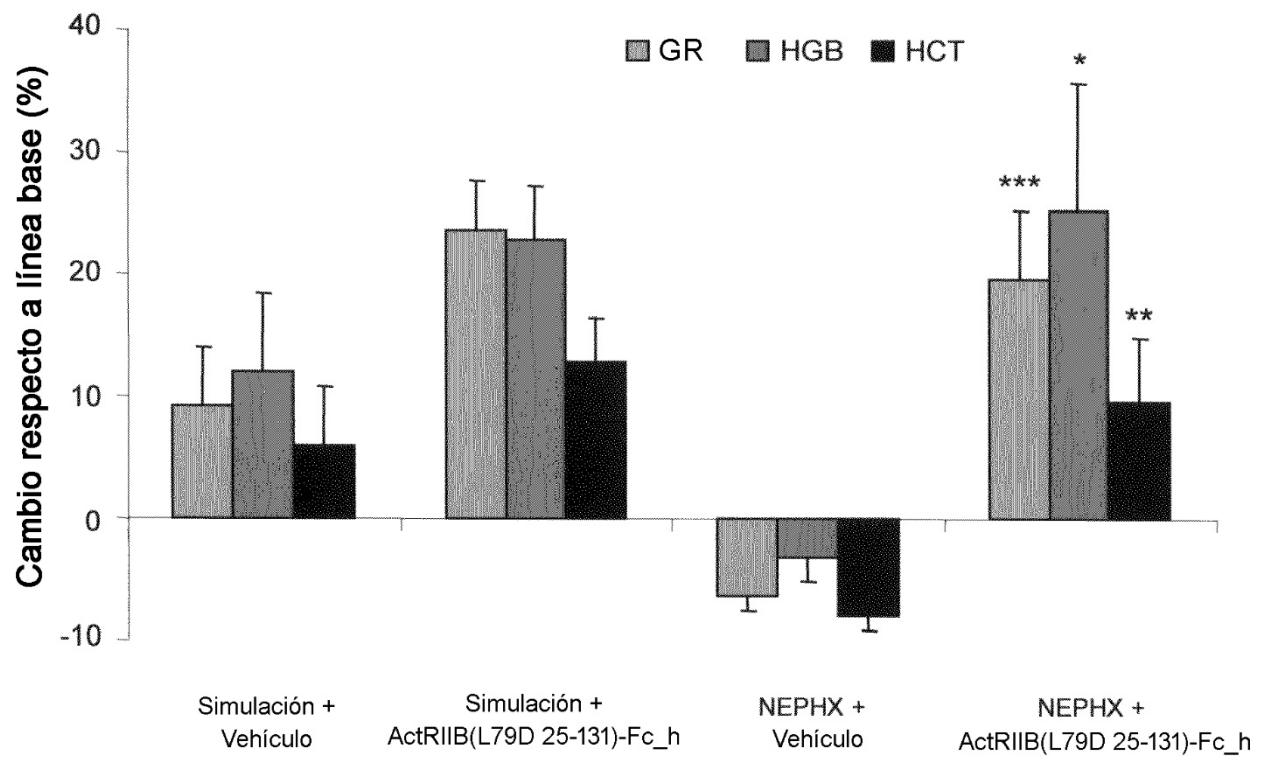


FIGURA 13

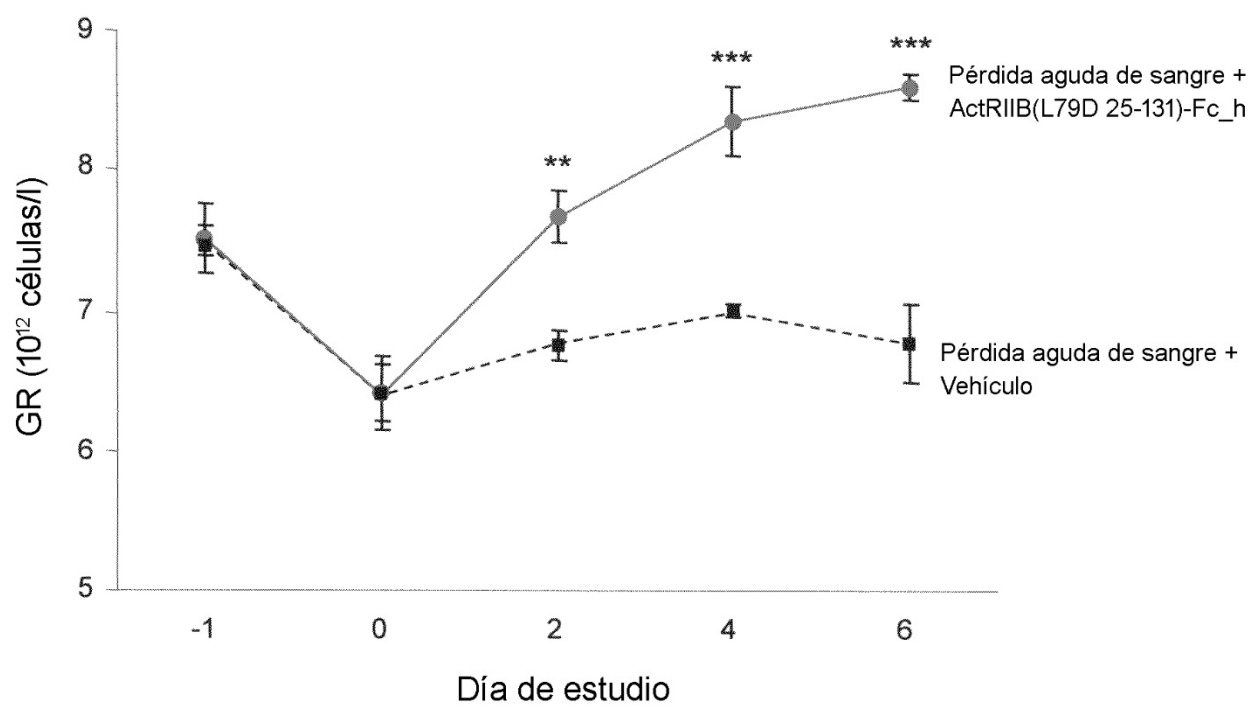


FIGURA 14

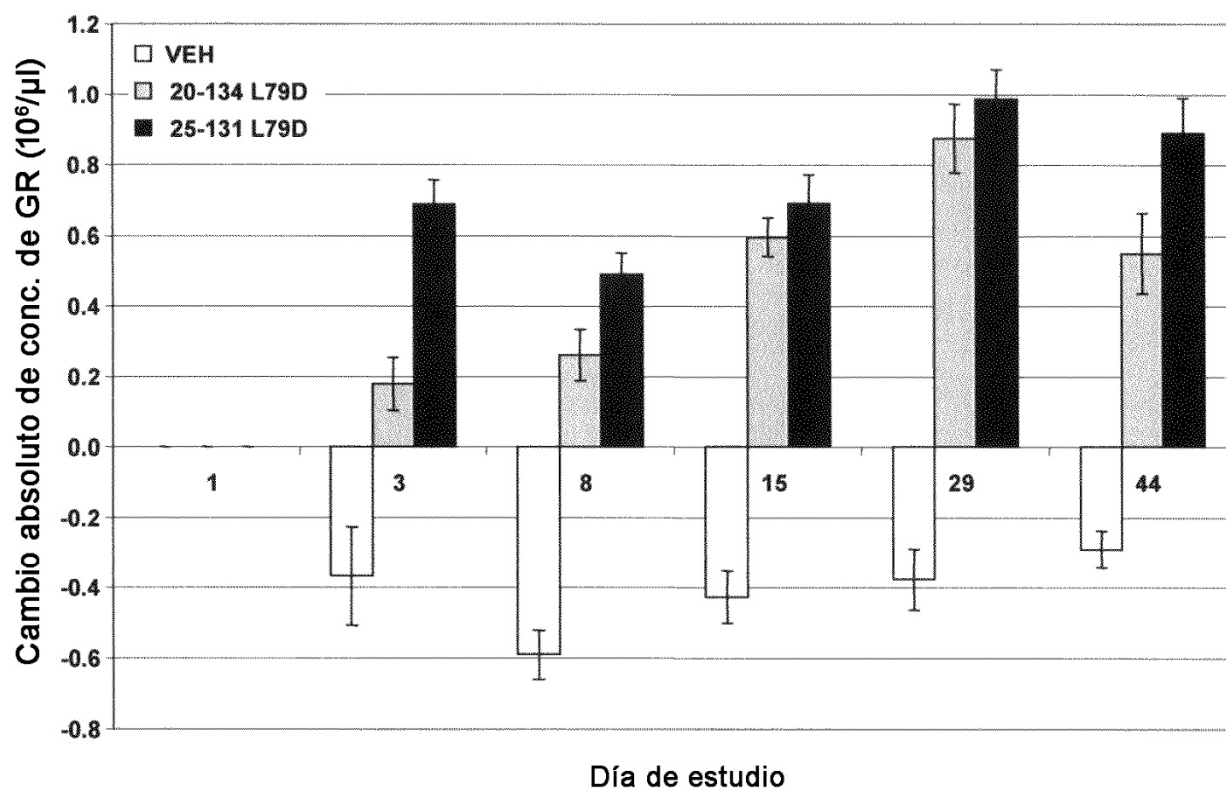


FIGURA 15

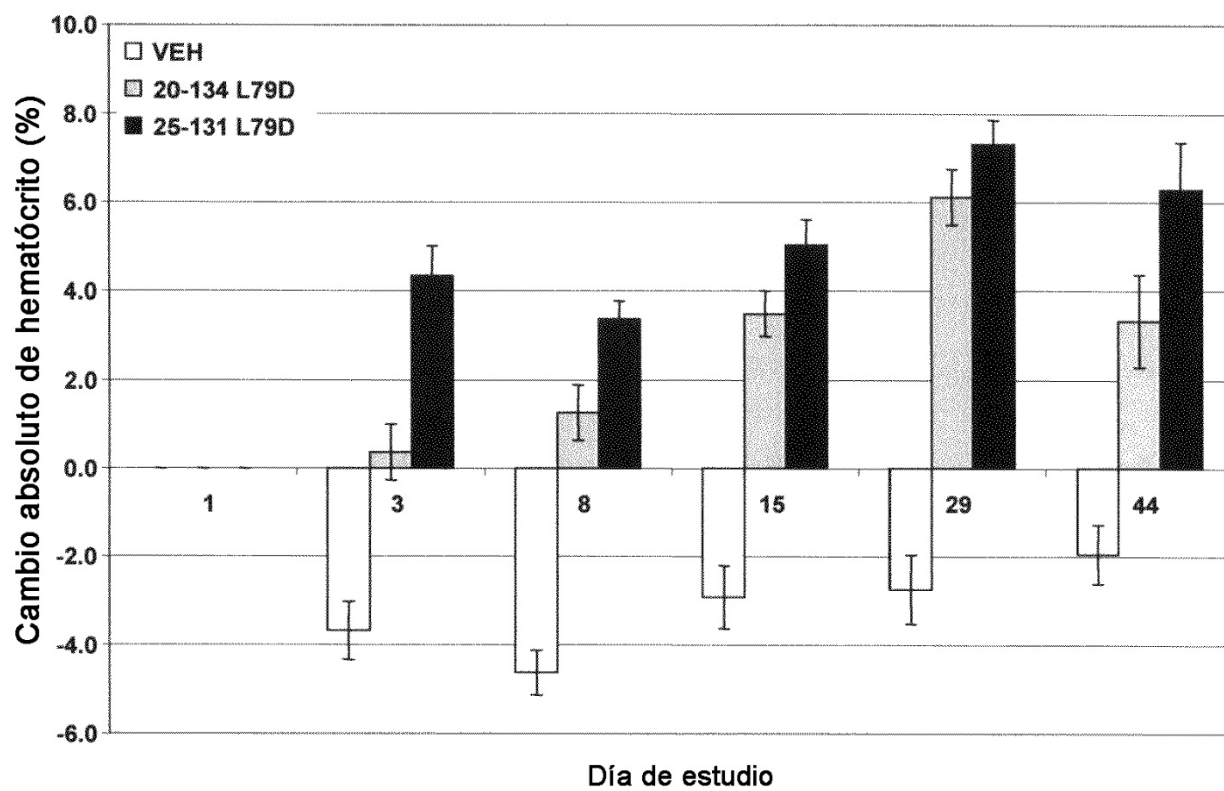


FIGURA 16

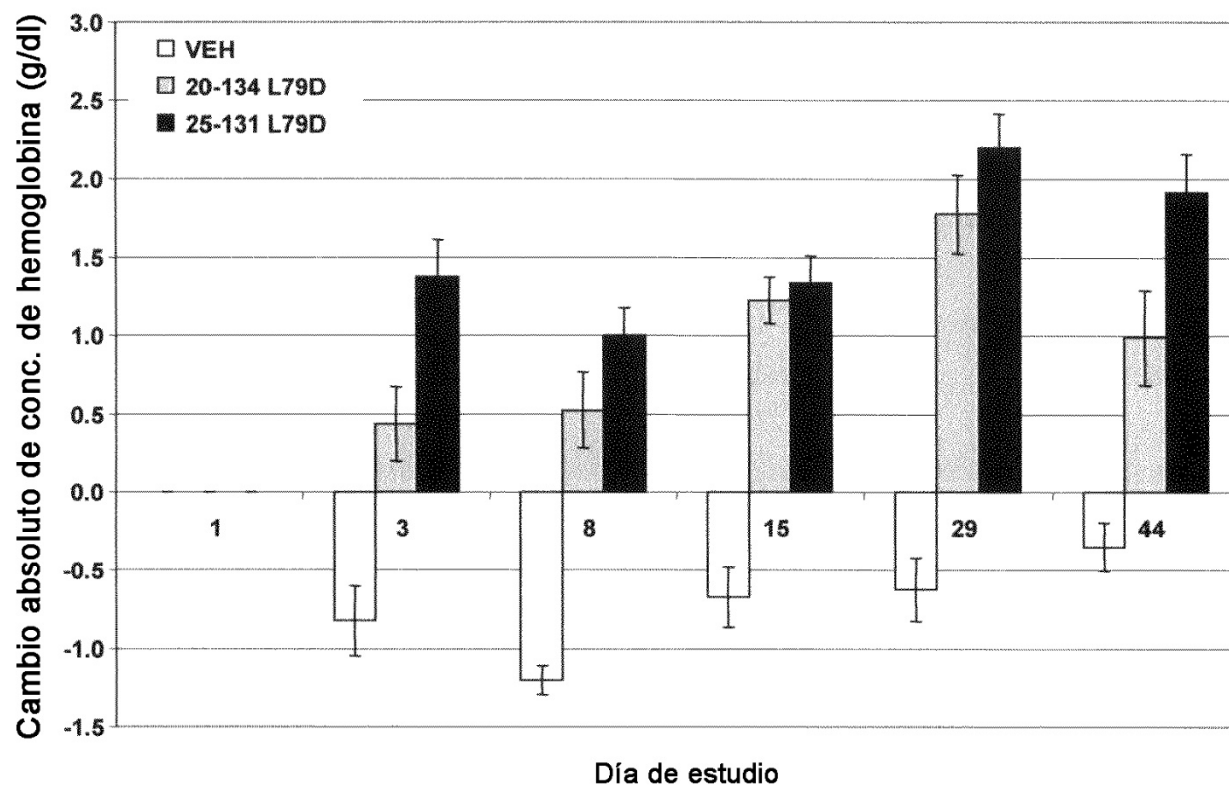


FIGURA 17

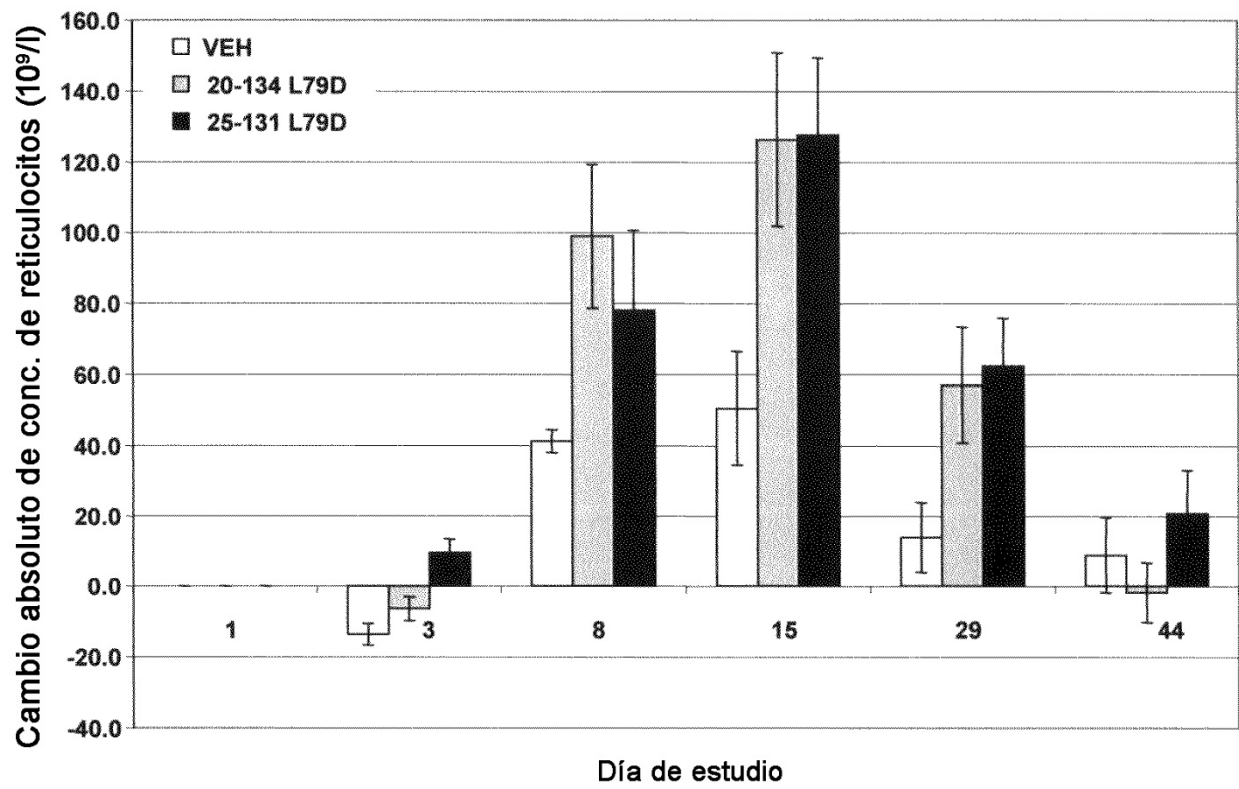


FIGURA 18