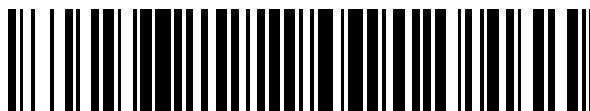


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 811**

51 Int. Cl.:

<b>C12Q 1/68</b>	(2008.01)
<b>G01N 33/53</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/68</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/705</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/72</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/74</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2013 PCT/US2013/066350**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO14066486**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2013 E 13848471 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 2912462**

54 Título: **Biomarcador para uso en el tratamiento de anemia**

30 Prioridad:

**24.10.2012 US 201261718126 P**

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

**14.04.2020**

73 Titular/es:

**CELGENE CORPORATION (100.0%)  
86 Morris Avenue  
Summit, NJ 07901, US**

72 Inventor/es:

**SUNG, VICTORIA;  
CHOPRA, RAJESH;  
HERMINE, OLIVIER;  
CRUZ MOURA, IVAN;  
DUSSIOT, MICHAEL;  
TROVATI MACIEL, THIAGO y  
FRICOT, AURELIE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 753 811 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

Biomarcador para uso en el tratamiento de anemia

### 1. Introducción

5 En la presente memoria se proporciona un inhibidor del receptor de activina tipo II para uso en métodos de tratamiento de enfermedades asociadas con anemia o eritropoyesis ineficaz usando el nivel y/o actividad de un ligando de un receptor de activina tipo II, en particular, el factor de diferenciación de crecimiento 11 (GDF11), como un indicador de la capacidad de respuesta de un paciente al tratamiento, la eficacia del tratamiento o la dosificación adecuada para el tratamiento con un inhibidor del receptor de activina tipo II. Por ejemplo, los métodos podrían ser determinar el nivel y/o actividad de GDF11, seleccionar pacientes que tengan un nivel y/o actividad elevados de GDF11 y tratar a  
10 pacientes que tengan un nivel y/o actividad elevados de GDF11 con un inhibidor del receptor de activina tipo II. Además, los métodos comprenden determinar el nivel y/o actividad de GDF11 en un paciente tratado con un inhibidor del receptor de activina tipo II, y administrar el inhibidor del receptor de activina tipo II en una cantidad de dosis dependiendo del nivel y/o actividad de GDF11 en el paciente. Dicho inhibidor del receptor de activina tipo II puede ser un inhibidor de la señalización de ActRIIA y/o ActRIIB (p. ej., una proteína de fusión humanizada que consiste en el dominio extracelular del receptor de activina tipo IIA y el dominio Fc de IgG1 humana).  
15

### 2. Antecedentes

La anemia es una disminución del número de glóbulos rojos o una cantidad menor de la normal de hemoglobina en la sangre. La anemia también puede estar causada por la disminución de la capacidad de unión a oxígeno de la hemoglobina. La anemia es el trastorno más común de la sangre.

20 La anemia puede estar causada por una eritropoyesis ineficaz. La eritropoyesis ineficaz está presente si se produce una eritropoyesis activa pero los glóbulos rojos maduros no se desarrollan a la tasa adecuada. Las células progenitoras sufren apoptosis antes de alcanzar el estadio de glóbulos rojos maduros.

La talasemia es una forma de eritropoyesis ineficaz. En la talasemia, la eritropoyesis ineficaz se caracteriza por la apoptosis de las células eritroides nucleadas en maduración. Específicamente, la beta-talasemia es una enfermedad caracterizada por defectos en la síntesis de hemoglobina (o Hgb) que conducen a una maduración y producción de eritrocitos alterada. Se cree que la disminución se debe principalmente a la diferenciación eritroide anormalmente acelerada y la apoptosis en el estadio tardío de eritroblastos basófilos/policromáticos de la diferenciación de los glóbulos rojos, lo que resulta en una disminución general en la producción de glóbulos rojos maduros. La beta-talasemia se caracteriza por un compartimento hipercelular de la médula ósea donde los eritroblastos anormales se acumulan y sufren apoptosis, lo que resulta en anemia sistémica.  
25  
30

La familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), que incluye TGF-beta, activinas, proteínas morfogénicas óseas (BMP) y factores de crecimiento y diferenciación (GDF) son proteínas secretadas que se sabe que regulan numerosos procesos celulares durante el desarrollo y homeostasis tisular. TGF-beta1, activina A, BMP-2 y BMP-4 se han asociado con la regulación de la eritropoyesis en varios sistemas modelo. TGF-beta1 inhibe y promueve la diferenciación eritroide dependiendo del contexto, se mostró que la activina A es un agente de diferenciación proeritroide, mientras que BMP-4 se ha implicado en la eritropoyesis por estrés y la recuperación de la anemia aguda en modelos murinos. BMP-2 actúa sobre las células eritroides tempranas para aumentar la formación de colonias en muestras obtenidas de células CD34+ movilizadas de sangre periférica o de médula ósea. Se han asociado niveles anormalmente altos de algunos de estos factores de crecimiento con diversas enfermedades hematológicas. Por ejemplo, los niveles altos de GDF-15 no suelen ser una característica de la eritropoyesis normal, pero en condiciones de eritropoyesis ineficaz, la expresión de GDF-15 es elevada.  
35  
40

La superfamilia TGF-beta consiste en más de 30 proteínas y señalizan solo a través de un número limitado de receptores y rutas de señalización, apuntando a la promiscuidad y redundancia inherentes en sus acciones. Además, en cualquier tejido dado, se pueden encontrar varios ligandos diferentes y, presumiblemente, la señalización se produce a través de un subconjunto superpuesto de receptores lo que complica la capacidad de asociar ligandos particulares a su función. GDF11 es un miembro de la subfamilia GDF y comparte aproximadamente el 90 % de homología de aminoácidos con GDF8, también conocido como miostatina. Ambos pueden unirse a los receptores de activina tipo IIA y B y activar la ruta de señalización Smad 2/3. GDF11 juega un papel importante en el desarrollo, participando en la formación de músculo, cartílago, hueso, riñón y sistema nervioso, mientras que, en tejidos adultos, se detectó GDF11 en el páncreas, intestino, riñón, músculo esquelético, cerebro y pulpa dental. También se pueden encontrar bajas cantidades de GDF-11 en la circulación. Hasta la fecha, sin embargo, no hay evidencia que describa un papel para GDF-11 en la eritropoyesis.  
45  
50

Los receptores de tipo II para activinas también pueden unirse a GDF11. Se han identificado dos receptores de tipo II relacionados, ActRIIA y ActRIIB (Mathews y Vale, 1991, Cell 65: 973-982; Attisano et al., 1992, Cell 68:97-108). Además de GDF11, ActRIIA y ActRIIB pueden interactuar bioquímicamente con varias otras proteínas de la familia TGF-beta, incluidas BMP7, Nodal, GDF8 y activina (Yamashita et al., 1995, J. Cell Biol. 130: 217-226; Lee y  
55

McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 9306-9311; Yeo y Whitman, 2001, Mol. Cell 7:949-957; Oh et al., 2002, Genes Dev. 16: 2749-54). ALK4 es el receptor primario de tipo I para las activinas, particularmente para la activina A, y ALK-7 también puede servir como un receptor para las activinas, particularmente para la activina B.

5 El documento WO 2011/020045 A1 describe un uso combinado de trampas de GDF y activadores del receptor de eritropoyetina para aumentar los niveles de glóbulos rojos.

El documento WO 2009/158025 A2 describe métodos para dosificar un antagonista anti-receptor IIB de activina (ActRIIB) y monitorizar a los pacientes tratados con el mismo.

El documento US 2012/237521 A1 describe el uso de anticuerpos anti-ActRIIB para tratar trastornos musculares, tales como la pérdida de masa muscular debido a una enfermedad o desuso.

10 Una proteína de fusión humanizada que consiste en el dominio extracelular del receptor de activina tipo IIA (ActRIIA) y el Fc de IgG1 humana (ActRIIA-hFc) se está evaluando actualmente en ensayos clínicos de fase II para el tratamiento de pacientes con anemia y trastornos óseos asociados con la enfermedad renal en estadio terminal (ESRD), así como para aquellos pacientes con beta-talasemia. En mujeres posmenopáusicas sanas, se mostró que ActRIIA-hFc  
15 aumenta significativamente el hematocrito (Hct) y la hemoglobina (Hgb), así como la densidad mineral ósea. Sin embargo, la identidad de los ligandos de ActRIIA secuestrados por ActRIIA-hFc en el torrente sanguíneo sigue siendo desconocida.

### 3. Resumen

20 La invención proporciona un inhibidor del receptor de activina tipo II para uso en un método para el tratamiento de anemia, beta talasemia, o para aumentar los niveles de glóbulos rojos o eritroblastos ortocromáticos (Ery-C) en un sujeto que lo necesite, en donde el método comprende: (a) evaluar el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido del sujeto, y (b) si el nivel y/o actividad de GDF11 está elevado sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11, administrar un inhibidor del receptor de activina tipo II al sujeto.

25 La invención también proporciona un inhibidor del receptor de activina tipo II para uso en un método para el tratamiento de anemia, beta talasemia, o para aumentar los niveles de glóbulos rojos o eritroblastos ortocromáticos (Ery-C) en un sujeto que lo necesite, en donde el método comprende: (a) administrar un inhibidor del receptor de activina tipo II, y (b) monitorizar el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido del sujeto.

Dentro del límite de la invención, el inhibidor del receptor de activina tipo II es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

a	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 2;
b	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 2;
c	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 2;
d	SEQ ID NO:2;
e	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 3;
f	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 3;
g	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 3;
h	SEQ ID NO:3;
i	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 6;
j	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 6;
k	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 6;
l	SEQ ID NO:6;

ES 2 753 811 T3

m	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 7;
n	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 7;
o	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 7;
p	SEQ ID NO:7;
q	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 12;
r	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 12;
s	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 12;
t	SEQ ID NO:12;
u	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 17;
v	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 17;
w	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 17;
x	SEQ ID NO:17;
y	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 20;
z	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 20;
aa	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 20;
bb	SEQ ID NO:20;
cc	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 21;
dd	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 21;
ee	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 21;
ff	SEQ ID NO:21
gg	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 22;
hh	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 22;
ii	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 22;
jj	SEQ ID NO:22;
kk	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 23;
ll	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 23;
mm	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 23;

nn	SEQ ID NO:23;
oo	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 24;
pp	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 24;
qq	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 24;
rr	SEQ ID NO:24;
ss	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 25;
tt	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 25;
uu	98% idéntica a SEQ ID NO: 25; y
vv	SEQ ID NO:25;

o

en donde el inhibidor del receptor de activina tipo II es un polipéptido que comprende el dominio extracelular del receptor de activina tipo IIA unido a la porción Fc de un anticuerpo;

o

- 5 en donde el inhibidor del receptor de activina tipo II es un polipéptido que comprende el dominio extracelular del receptor de activina tipo IIB unido a la porción Fc de un anticuerpo.

En lo sucesivo en la presente memoria, la referencia al inhibidor del receptor de activina tipo II en el contexto de la invención o sus realizaciones significa el inhibidor del receptor de activina tipo II como se definió anteriormente.

- 10 En un aspecto, en la presente memoria se proporciona un inhibidor del receptor de activina tipo II para uso en métodos para tratar anemia, o un trastorno sanguíneo asociado con anemia o eritropoyesis ineficaz, usando GDF11 como un indicador de la capacidad de respuesta de un paciente al tratamiento, eficacia del tratamiento, o la dosificación apropiada para el tratamiento del paciente con un inhibidor del receptor de activina tipo II.

- 15 En ciertas realizaciones, el método comprende determinar el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido de un paciente que tiene anemia, o un trastorno, p. ej., un trastorno sanguíneo asociado con anemia o eritropoyesis ineficaz. En algunas realizaciones, el método comprende determinar el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido de un paciente que tiene anemia o un trastorno, p. ej., un trastorno sanguíneo asociado con anemia o eritropoyesis ineficaz, y compararlo con el nivel y/o actividad normal de GDF11 (p. ej., el nivel y/o actividad promedio de GDF11 en una muestra del mismo tejido de un sujeto o sujetos sanos). En algunas realizaciones, el método  
20 comprende determinar el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido (tal como suero/plasma, sangre, médula ósea, bazo o hígado) de un paciente que tiene anemia o un trastorno, p. ej., un trastorno sanguíneo asociado con anemia o eritropoyesis ineficaz, y compararlo con el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de un tejido diferente del sujeto (tal como un tejido en el que el nivel de GDF11 no está elevado en pacientes que tienen anemia).

- 25 En ciertas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un inhibidor del receptor de activina tipo II para uso en un método para tratar anemia, o un trastorno sanguíneo asociado con anemia o eritropoyesis ineficaz, en donde el método comprende: (a) evaluar el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido del sujeto, y (b) si el nivel y/o actividad de GDF11 está elevado sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11, administrar un inhibidor del receptor de activina tipo II al sujeto. En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un inhibidor del receptor de activina tipo II para uso en un método para tratar anemia, o un trastorno sanguíneo asociado con anemia o eritropoyesis ineficaz, en donde el método comprende: (a) administrar un inhibidor del receptor de activina tipo II, y (b)  
30 monitorizar el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido del sujeto. En ciertas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un inhibidor del receptor de activina tipo II para uso en un método para tratar anemia, o un trastorno sanguíneo asociado con anemia o eritropoyesis ineficaz, en donde el método comprende: (a) administrar una cantidad de dosis de un inhibidor del receptor de activina tipo II, (b) evaluar el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido del sujeto, y (c) ajustar la cantidad de dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II en donde,  
35 si el nivel y/o actividad de GDF11 está elevado sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11, la cantidad de dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II se aumenta, y en donde, si el nivel y/o actividad de GDF11 está disminuido sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11, la cantidad de dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II se disminuye. Los trastornos sanguíneos asociados con anemia o eritropoyesis ineficaz tratados según los métodos

descritos en la presente memoria incluyen, sin limitación, talasemia (p. ej., beta talasemia), síndrome mielodisplásico, anemia perniciosa crónica, anemia de células falciformes, anemia de Diamond Blackfan, disminución de los niveles de glóbulos rojos, o disminución de los eritroblastos ortocromáticos (Ery-C). En una realización preferida, el sujeto que se trata según los métodos descritos en la presente memoria es un ser humano.

- 5 En ciertas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un inhibidor del receptor de activina tipo II para uso en un método para tratar anemia en un sujeto que necesita tratamiento, en donde el método comprende: (a) evaluar el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido del sujeto, y (b) si el nivel y/o actividad de GDF11 está elevado sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11, administrar un inhibidor del receptor de activina tipo II al sujeto.

10 Además, en algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un inhibidor del receptor de activina tipo II para uso en un método para tratar talasemia (p. ej., beta talasemia) en un sujeto que necesita tratamiento, en donde el método comprende: (a) evaluar el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido del sujeto, y (b) si el nivel y/o actividad de GDF11 está elevado sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11, administrar un inhibidor del receptor de activina tipo II al sujeto. En realizaciones particulares, en la presente memoria se proporciona un inhibidor del receptor de activina tipo II para uso en un método para tratar talasemia (p. ej., beta talasemia) en un sujeto que necesita  
15 tratamiento, en donde el método comprende: (a) administrar una cantidad de dosis de un inhibidor del receptor de activina tipo II, (b) evaluar el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido del sujeto, y (c) ajustar la cantidad de dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II en donde, si el nivel y/o actividad de GDF11 está elevado sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11, la cantidad de dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II se aumenta, y en donde, si el nivel y/o actividad de GDF11 está disminuido sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11, la cantidad de dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II se disminuye.

20 En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un inhibidor del receptor de activina tipo II para uso en un método para aumentar los niveles de glóbulos rojos o los niveles de eritroblastos ortocromáticos (Ery-C) en un sujeto que lo necesite, en donde el método comprende: (a) evaluar el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido del sujeto, y (b) si el nivel y/o actividad de GDF11 está elevado sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11, administrar un inhibidor del receptor de activina tipo II al sujeto. En otras realizaciones, en la presente memoria se proporciona un inhibidor del receptor de activina tipo II para uso en un método para aumentar los niveles de glóbulos rojos o los niveles de eritroblastos ortocromáticos (Ery-C) en un sujeto que lo necesite, en donde el método comprende:  
25 (a) administrar una cantidad de dosis de un inhibidor del receptor de activina tipo II, (b) evaluar el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido del sujeto, y (c) ajustar la cantidad de dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II en donde, si el nivel y/o actividad de GDF11 está elevado sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11, la cantidad de dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II se aumenta, y en donde, si el nivel y/o actividad de GDF11 está disminuido sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11, la cantidad de dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II se disminuye.

30 En realizaciones específicas, la administración de un inhibidor del receptor de activina tipo II según los métodos descritos en la presente memoria da como resultado una disminución del recuento celular de eritroblastos basófilos y policromáticos tardíos (Ery-B) en el paciente. En algunas realizaciones, dicha administración da como resultado un nivel disminuido de bilirrubina (p. ej., nivel sérico de bilirrubina) en el paciente. En algunas realizaciones, dicha administración da como resultado un nivel disminuido de lactato deshidrogenasa (p. ej., nivel sérico de lactato deshidrogenasa) en el paciente. En algunas realizaciones, dicha administración da como resultado una disminución de la celularidad de la médula ósea y/o el bazo en el paciente. En algunas realizaciones, dicha administración da como resultado una disminución de los recuentos de reticulocitos en el paciente. En algunas realizaciones, dicha administración da como resultado una disminución de la saturación de transferencia y/o una disminución de los niveles sistémicos de hierro en el paciente. En realizaciones preferidas, la administración de un inhibidor del receptor de activina tipo II según los métodos descritos en la presente memoria da como resultado un aumento en los recuentos de glóbulos rojos, niveles aumentados de hematocrito y/o niveles aumentados de hemoglobina en el paciente. En realizaciones particulares, la administración de un inhibidor del receptor de activina tipo II según los métodos descritos en la presente memoria da como resultado un aumento del volumen corpuscular medio (MCV), hemoglobina corpuscular media (MCH) y/o concentración de MCH en el paciente. En ciertas realizaciones, dichos resultados se evalúan en el sujeto además de la evaluación del nivel y/o actividad de GDF11 en el sujeto.

35 En ciertas realizaciones, el inhibidor de ActRII que puede usarse en los métodos proporcionados en la presente memoria es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 2; 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 2; 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 2; 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 3; 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 3; 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 3; 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 6; 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 6; 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 6; 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 7; 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 7; 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 7; 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 12; 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 12; 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 12; 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 17; 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 17; 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 17; 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 20; 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 20; 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 20; 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 21; 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 21; 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 21; y SEQ ID NO: 21. En algunas realizaciones, el inhibidor de ActRII es una proteína de fusión humanizada que consiste en el dominio extracelular de ActRIIA y el dominio Fc de IgG1 humana. En una realización más específica, el inhibidor

de ActRII es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7. En una realización, el inhibidor de ActRII se administra por vía parenteral.

5 En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad normal de GDF11 es un nivel y/o actividad promedio de GDF11 en una muestra de tejido de uno o más sujetos sanos (p. ej., sujetos sanos en la misma categoría de edad y/o del mismo género). En algunas realizaciones, el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido del sujeto tratado se compara con el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra del mismo tejido de uno o más sujetos sanos. En algunas realizaciones, el tejido en el que se evalúa el nivel y/o actividad de GDF11 es sangre completa, suero/plasma sanguíneo, médula ósea, hígado o bazo. En una realización, el tejido en el que se evalúa el nivel y/o actividad de GDF11 es suero.

10 El nivel y/o actividad de GDF11 se puede medir por cualquier método conocido en la técnica o descrito en la presente memoria. En una realización, el nivel y/o actividad de GDF11 es el nivel de proteína de GDF11. En una realización, el nivel y/o actividad de GDF11 es el nivel de ARNm de GDF11.

15 En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de GDF11 se considera elevado sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11 cuando está elevado al menos un 10 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 100 %, al menos un 200 %, al menos un 300 % o al menos un 500 % sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11. En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de GDF11 se considera elevado sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11 cuando está elevado al menos un 25 %, al menos un 50 %, al menos un 75 %, al menos un 100 %, o al menos un 200 % sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11. En una realización particular, el nivel y/o actividad de GDF11 se considera elevado sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11 cuando está elevado al menos un 50 % sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11. En una realización particular, el nivel y/o actividad de GDF11 se considera elevado sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11 cuando está elevado al menos un 100 % sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11. En una realización particular, el nivel y/o actividad de GDF11 se considera elevado sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11 cuando está elevado al menos un 200 % sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11. En una realización, el nivel y/o actividad de GDF11 se considera elevado sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11 cuando está elevado al menos 1,5 o 2 veces sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11. En algunas realizaciones, el nivel y/o actividad de GDF11 se considera disminuido sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11 cuando se disminuye al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 % o al menos un 90 % sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11. En algunas realizaciones, el nivel y/o actividad de GDF11 se considera disminuido sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11 cuando se disminuye al menos un 25 %, al menos un 50 %, al menos un 75 %, o al menos un 90 % sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11. En una realización, el nivel y/o actividad de GDF11 se considera disminuido sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11 cuando se disminuye al menos un 25 % sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11. En una realización, el nivel y/o actividad de GDF11 se considera disminuido sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11 cuando se disminuye al menos un 50 % sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11. En una realización, el nivel y/o actividad de GDF11 se considera disminuido sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11 cuando se disminuye al menos un 75 % sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11. En una realización, el nivel y/o actividad de GDF11 se considera disminuido sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11 cuando se disminuye al menos 1,5 o 2 veces sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11.

#### 40 **4. Breve descripción de las figuras**

La FIG. 1 ilustra que el equivalente murino de la SEQ ID NO 7 (mActRIIA-Fc) mejora los parámetros hematológicos en ratones  $\beta$ -talasémicos. Los ratones  $Hbb^{th1/th1}$  (Skow LC et al., Cell 34: 1043-52, 1983) fueron tratados con PBS o mActRIIA-Fc (10 mg/Kg de peso corporal dos veces por semana) durante 60 días. Los parámetros hematológicos se evaluaron en los días 5, 10, 30 y 60. La evaluación de (A) recuentos de glóbulos rojos, (B) hematocrito y (C) hemoglobina se asoció con una disminución de (D) reticulocitosis. El análisis de los parámetros de los glóbulos rojos circulantes (RBC) también muestra que (E) el volumen corpuscular medio (MCV), (F) la hemoglobina corpuscular media (MCH) y (G) la concentración de MCH (MCHC) aumentaron en ratones tratados con mActRIIA-Fc. (H) Estado antioxidante total. (I) El análisis morfológico mostró una reducción en anisocitosis, poiquilocitosis y células diana. (J) Los niveles sistémicos de hierro, (K) síntesis de transferrina, (L) transferrina y (M) niveles de saturación de ferritina también se evaluaron en ratones talasémicos. (N) También se evaluaron los recuentos de células inflamatorias. Efectos de mActRIIA-Fc sobre la esplenomegalia en ratones talasémicos evaluados por (O) el peso del bazo y el número total de células. (P) El número y la expansión de eritroblastos de la médula ósea (tinción con eosina/hematoxilina) también disminuyeron en ratones tratados con mActRIIA-Fc. (Q) Los eritroblastos de la médula ósea y bazo se cuantificaron mediante citometría de flujo mediante tinción con TER119. \*  $p < 0,05$ ,  $N = 3-5$  para cada experimento independiente.

La FIG. 2 ilustra que mActRIIA-Fc disminuye la eritropoyesis ineficaz en ratones talasémicos. (A-C) Se recogieron médula ósea y bazo y se evaluó la diferenciación de los eritroblastos mediante citometría de flujo mediante tinción con CD71/TER119 y distribución FSC/SSC. (D) Análisis de los niveles de bilirrubina total y directa. (E) La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la diferenciación primaria de pro-eritroblastos se evaluó mediante citometría de flujo utilizando diclorodihidrofluoresceína. (F) Análisis de la solubilidad de la hemoglobina en pro-eritroblastos

talasémicos primarios tratados durante 48 horas con mActRIIA-Fc o PBS. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,005$ , N=3-5 para cada experimento independiente.

5 La FIG. 3 ilustra el efecto de mActRIIA-Fc sobre la apoptosis de los eritroblastos de ratones talasémicos. Expresión de Fas-L en los eritroblastos de médula ósea (A) y bazo (B) de ratones tratados con mActRIIA-Fc o PBS. (C) La tinción de Tunel de los eritroblastos se incrementó en ratones tratados con mActRIIA-Fc.

10 La FIG. 4 ilustra la expresión de ligandos de ActRIIA en el bazo de ratones talasémicos. (A) Los niveles de expresión del ARNm de ActRII, activina A, activina B y GDF11 se incrementaron en animales tratados con mActRIIA-Fc. (B) Análisis por transferencia Western de los niveles de proteína GDF11, que disminuyeron en animales tratados con mActRIIA-Fc. (C) La tinción inmunohistoquímica de médula ósea para GDF11 no mostró cambios entre el tipo salvaje y los ratones tratados con mActRIIA-Fc.

15 La FIG. 5 ilustra el efecto de mActRIIA-Fc sobre la expresión de GDF11 en proeritroblastos talasémicos primarios. (A) Análisis inmunohistoquímico de la ruta de señalización de activina/GDF en ratones talasémicos tratados con PBS o mActRIIA-Fc durante 30 días, mostrando niveles incrementados de GDF11, ActRII y p-Smad2 en ratones talasémicos. (B) Análisis inmunohistoquímico de activina A, activina B y GDF11 en ratones talasémicos, en comparación con otros modelos de anemia. (C) Análisis por FACS de pro-eritroblastos talasémicos primarios tratados con PBS o mActRIIA-Fc durante 48 horas usando anticuerpos específicos frente a activina A, activina B, péptido GDF11 y péptido escindido GDF8/GDF11. La cuantificación de la tinción de GDF11 se demuestra en las barras del gráfico. (D) Análisis inmunohistoquímico de la expresión de la proforma de GDF11 en los bazos de ratones talasémicos tratados con PBS o mActRIIA-Fc. \*  $p < 0,05$ , N=4.

20 La FIG. 6 ilustra que la inhibición de GDF11 reduce la eritropoyesis ineficaz en ratones talasémicos. (A) Se recogieron médula ósea y bazo y se evaluó la diferenciación de los pro-eritroblastos primarios mediante citometría de flujo mediante tinción con CD71/TER119 y distribución FSC/SSC. (B) La generación de ROS en la diferenciación de pro-eritroblastos primarios se evaluó mediante citometría de flujo utilizando diclorodihidrofluoresceína. \*  $p < 0,05$ , N=4.

25 La FIG. 7 ilustra un ensayo ELISA en sándwich para detectar GDF11 en suero. (A) Esquema del ensayo. (B) Las placas se recubrieron con 5  $\mu\text{g/mL}$  de mActRIIA-Fc y se añadieron dosis crecientes de GDF11 recombinante (0 ng/ $\mu\text{l}$ , 0,1 ng/ $\mu\text{l}$ , 0,5 ng/ $\mu\text{l}$ , 2,5 ng/ $\mu\text{l}$ ) o sueros control (dilución 1/4 a 1/500) a las placas recubiertas con mActRIIA-Fc, las placas se lavaron y la proteína unida se detectó con anticuerpos anti-GDF8/11, seguido de detección usando una IgG anti-conejo acoplada a peroxidasa de rábano picante. La proteína GDF11 se unió a las placas de una manera dependiente de la dosis.

30 La FIG. 8 ilustra la detección de niveles aumentados de GDF11 en el suero de pacientes con  $\beta$ -talasemia. Se obtuvieron sueros de pacientes que presentaban talasemia y controles sanos.

35 La FIG. 9 ilustra un ensayo ELISA en sándwich para detectar activina A en suero. (A) Esquema del ensayo. (B) Las placas se recubrieron con 5  $\mu\text{g/mL}$  de ActRIIA-Fc (SEQ ID NO.7) y se añadieron dosis crecientes de activina A recombinante (0 ng/ $\mu\text{l}$ , 0,1 ng/ $\mu\text{l}$ , 0,5 ng/ $\mu\text{l}$ , 2,5 ng/ $\mu\text{l}$ ) o sueros control (dilución 1/4 a 1/500) a las placas ActRIIA-Fc, las placas se lavaron y la proteína unida se detectó con anticuerpos anti-activina A, seguido de detección usando una IgG anti-conejo acoplada a peroxidasa de rábano picante. La proteína activina A se unió a las placas de una manera dependiente de la dosis. (C) Detección de los niveles de activina A en el suero de pacientes con  $\beta$ -talasemia. Se obtuvieron sueros de pacientes que presentaban talasemia y controles sanos. No hubo cambios en los niveles séricos de activina A en pacientes con talasemia.

40 La FIG. 10 ilustra un ensayo ELISA en sándwich para detectar activina B en suero. (A) Esquema del ensayo. (B) Las placas se recubrieron con 5  $\mu\text{g/mL}$  de ActRIIA-Fc y se añadieron dosis crecientes de activina B recombinante (0 ng/ $\mu\text{l}$ , 0,1 ng/ $\mu\text{l}$ , 0,5 ng/ $\mu\text{l}$ , 2,5 ng/ $\mu\text{l}$ ) o sueros control (dilución 1/4 a 1/500) a las placas ActRIIA-Fc, las placas se lavaron y la proteína unida se detectó con anticuerpos anti-activina B, seguido de detección usando una IgG anti-conejo acoplada a peroxidasa de rábano picante. La proteína activina B se unió a las placas de una manera dependiente de la dosis. (C) Detección de los niveles de activina B en el suero de pacientes con  $\beta$ -talasemia. Se obtuvieron sueros de pacientes que presentaban talasemia y controles sanos. No hubo cambios en los niveles séricos de activina B en pacientes con talasemia.

50 La FIG. 11 ilustra que la administración de mActRIIA-Fc a ratones C57BL/6 de tipo salvaje no cambia sus parámetros hematológicos. La evaluación de (A) recuentos de glóbulos rojos, (B) hematocrito, (C) hemoglobina no mostró asociación con mActRIIA-Fc. Hubo una ligera disminución de la reticulocitosis (D). mActRIIA-Fc no cambió los parámetros de los glóbulos rojos (RBC) tales como (E) volumen corpuscular medio (MCV), (F) hemoglobina corpuscular media (MCH) o (G) concentración de MCH (MCHC). \*  $p < 0,05$ , N=3-5 para cada experimento independiente.

55 La FIG. 12 ilustra que la administración de mActRIIA-Fc a ratones C57BL/6 de tipo salvaje no tuvo efecto sobre el número de células de bazo y médula ósea de los ratones.

La FIG. 13 ilustra que mActRIIA-Fc estimula la diferenciación eritroide a través de la inhibición de GDF11. (A-C) La diferenciación eritroide de las células CD34+/CD36+ se realizó mediante el cultivo en medios que contenían EPO, +/-



5 50 µg/mL de mActRIIA-Fc; se analizaron (A) progenitores eritroides, (B) proliferación celular y (C) precursores eritroides. (D-F) Diferenciación eritroide de células CD34+/CD36+ cuando se cultivan conjuntamente con células de médula ósea (BM) en medios que contienen EPO, +/- 50 µg/mL de mActRIIA-Fc; se analizaron (D) progenitores eritroides, (E) proliferación celular y (F) precursores eritroides. (G-H) La diferenciación eritroide de las células CD36+ se realizó mediante cultivo en medios que contenían EPO, +/- 200 ng/mL de GDF11, +/- 100 µg/mL de mActRIIA-Fc; se analizaron (G) proliferación celular y (H) porcentaje de precursores eritroides GPA+.

**5. Descripción detallada**

**5.1 Visión global**

10 La invención proporciona un inhibidor del receptor de activina tipo II para uso en un método para el tratamiento de anemia, beta talasemia, o para aumentar los niveles de glóbulos rojos o eritroblastos ortocromáticos (Ery-C) en un sujeto que lo necesite, en donde el método comprende: (a) evaluar el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido del sujeto, y (b) si el nivel y/o actividad de GDF11 está elevado sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11, administrar un inhibidor del receptor de activina tipo II al sujeto.

15 La invención también proporciona un inhibidor del receptor de activina tipo II para uso en un método para el tratamiento de anemia, beta talasemia, o para aumentar los niveles de glóbulos rojos o eritroblastos ortocromáticos (Ery-C) en un sujeto que lo necesite, en donde el método comprende: (a) administrar un inhibidor del receptor de activina tipo II, y (b) monitorizar el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido del sujeto.

Dentro del límite de la invención, el inhibidor del receptor de activina tipo II es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

a	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 2;
b	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 2;
c	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 2;
d	SEQ ID NO:2;
e	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 3;
f	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 3;
g	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 3;
h	SEQ ID NO:3;
i	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 6;
j	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 6;
k	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 6;
l	SEQ ID NO:6;
m	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 7;
n	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 7;
o	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 7;
p	SEQ ID NO:7;
q	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 12;

ES 2 753 811 T3

r	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 12;
s	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 12;
t	SEQ ID NO:12;
u	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 17;
v	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 17;
w	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 17;
x	SEQ ID NO:17;
y	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 20;
z	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 20;
aa	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 20;
bb	SEQ ID NO:20;
cc	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 21;
dd	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 21;
ee	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 21;
ff	SEQ ID NO:21
gg	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 22;
hh	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 22;
ii	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 22;
jj	SEQ ID NO:22;
kk	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 23;
ll	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 23;
mm	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 23;
nn	SEQ ID NO:23;
oo	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 24;
pp	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 24;
qq	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 24;
rr	SEQ ID NO:24;

ss	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 25;
tt	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 25;
uu	98% idéntica a SEQ ID NO: 25; y
vv	SEQ ID NO:25;

o

en donde el inhibidor del receptor de activina tipo II es un polipéptido que comprende el dominio extracelular del receptor de activina tipo IIA unido a la porción Fc de un anticuerpo

o

5 en donde el inhibidor del receptor de activina tipo II es un polipéptido que comprende el dominio extracelular del receptor de activina tipo IIB unido a la porción Fc de un anticuerpo.

En la presente memoria se proporciona un inhibidor del receptor de activina tipo II para uso en métodos de tratamiento de anemia, o enfermedades o afecciones asociadas con anemia o eritropoyesis ineficaz, usando el nivel y/o actividad de GDF11 como un indicador de la capacidad de respuesta de un paciente al tratamiento con un inhibidor del receptor de activina tipo II, la eficacia del tratamiento con un inhibidor del receptor de activina tipo II, o la dosis adecuada para el tratamiento con un inhibidor del receptor de activina tipo II. Las enfermedades asociadas con anemia o eritropoyesis ineficaz que pueden tratarse según los métodos descritos en la presente memoria incluyen, sin limitación, talasemia (p. ej., beta talasemia), síndrome mielodisplásico, anemia perniciosa crónica, anemia de células falciformes y anemia de Diamond Blackfan. Las afecciones asociadas con anemia o eritropoyesis ineficaz que pueden tratarse según los métodos descritos en la presente memoria incluyen, sin limitación, disminución de los niveles de glóbulos rojos, disminución de los niveles de hemoglobina, disminución de los niveles de hematocrito y disminución de los eritroblastos ortocromáticos (Ery-C). En una realización, los métodos son para tratar anemia. En una realización, los métodos son para tratar talasemia (p. ej., beta talasemia). En una realización, los métodos son para tratar niveles disminuidos de glóbulos rojos o para aumentar los niveles de glóbulos rojos. Un inhibidor del receptor de activina tipo II usado en los métodos descritos en la presente memoria puede ser un inhibidor de ActRIIA y/o ActRIIB. En una realización preferida, un inhibidor del receptor de activina tipo II es una proteína de fusión humanizada que consiste en el dominio extracelular de ActRIIA y el dominio Fc de IgG1 humana ("ActRIIA-Fc", p. ej., la SEQ ID NO: 7).

Los métodos proporcionados en la presente memoria se basan, en parte, en el descubrimiento de que los niveles de GDF11 aumentan en la sangre de pacientes humanos con beta-talasemia y en un modelo de ratón de beta-talasemia, y que ActRIIA-mFc (ActRIIA fusionado con una IgG murina) reduce los niveles aumentados de GDF11 en el modelo de ratón de beta-talasemia (véanse los Ejemplos). Además, sin estar limitado por la teoría, la captura de ligando por ActRIIA-mFc corrige la eritropoyesis ineficaz y mejora la anemia en un modelo experimental de talasemia intermedia en ratones (ratones  $Hbb^{th1/th1}$ ). Como se muestra en los Ejemplos presentados en la presente memoria, el tratamiento de ratones talasémicos ( $Hbb^{th1/th1}$ ) con ActRIIA-mFc aumentó el recuento de glóbulos rojos, hematocrito, hemoglobina, volumen celular medio (MCV) y hemoglobina celular media, aumentó los eritroblastos ortocromáticos (Ery-C), redujo la celularidad de la médula ósea y el bazo, redujo los eritroblastos basófilos/policromáticos tardíos (Ery-B), en el bazo y la médula ósea, redujo los niveles de bilirrubina (indicativo de una disminución en la destrucción de los glóbulos rojos) y redujo las células apoptóticas. Además, los métodos proporcionados en la presente memoria se basan, en parte, en el descubrimiento de que en un sistema de cultivo *in vitro* GDF-11 inhibe el crecimiento de precursores eritroides derivados de la médula ósea humana y ActRIIA-mFc rescata este efecto inhibitorio (véanse los Ejemplos). Tomados en conjunto, los datos presentados en la presente memoria indican que los niveles de GDF-11, p. ej., los niveles sanguíneos y/o séricos de GDF11, pueden identificar qué pacientes pueden responder a ActRIIA-Fc y pueden usarse para monitorizar la respuesta clínica al fármaco. Los datos presentados en la presente memoria también indican que ActRIIA-Fc (p. ej., ActRIIA-mFc o ActRIIA-hFc, tal como la SEQ ID NO: 7) es útil en el tratamiento de la anemia asociada con eritropoyesis ineficaz.

Los descubrimientos descritos en la presente memoria, ilustrados en los Ejemplos, indican que la detección de los niveles y/o actividad de GDF11 se puede usar (i) como un marcador (p. ej., biomarcador sérico) del grado de eritropoyesis ineficaz en un paciente, (ii) como un marcador para medir la respuesta del paciente a un inhibidor del receptor de activina tipo II (tal como ActRIIA-Fc), o (iii) para evaluar los efectos farmacodinámicos de un inhibidor del receptor de activina tipo II (tal como ActRIIA-Fc) en un paciente después del tratamiento, en donde el paciente es un paciente con anemia o una enfermedad asociada con anemia o eritropoyesis ineficaz (tal como talasemia, p. ej., beta-talasemia). Por lo tanto, en ciertas realizaciones, GDF11 puede usarse en los métodos descritos en la presente memoria como un indicador de eficacia del tratamiento con ActRIIA-Fc (p. ej., ActRIIA-hFc tal como la SEQ ID NO: 7) y/o como un indicador de ausencia de respuesta al tratamiento con ActRIIA-Fc (p. ej., ActRIIA-hFc, tal como la SEQ ID NO: 7). Además, como se describe en la presente memoria, GDF11 puede usarse como un marcador molecular fiable para evaluar la eficacia del tratamiento en el transcurso del tiempo de ActRIIA-Fc (p. ej., ActRIIA-hFc tal como

la SEQ ID NO: 7). Además, en una realización específica, el método comprende la detección del nivel y/o actividad de GDF11 en la sangre (p. ej., detección de la expresión anormal en una enfermedad asociada con eritropoyesis ineficaz) y la administración de un inhibidor del receptor de activina tipo II, tal como ActRIIA-Fc, en una dosis dependiente del nivel y/o actividad de GDF11.

## 5 5.2 Métodos de diagnóstico/pronóstico/terapéuticos

En un aspecto, los métodos comprenden determinar el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido de un sujeto (p. ej., suero o sangre), seleccionar a los sujetos que tengan un nivel y/o actividad elevados de GDF11 sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11, y tratar a los sujetos que tienen un nivel y/o actividad elevado de GDF11 con un inhibidor del receptor de activina tipo II. Los niveles y/o actividad elevados de GDF11 en una muestra de tejido de un sujeto (p. ej., suero o sangre) pueden indicar que el paciente puede responder al tratamiento con un inhibidor del receptor de activina tipo II. En una realización, el inhibidor del receptor de activina tipo II es ActRIIA-Fc tal como ActRIIA-hFc (p. ej., la SEQ ID NO: 7).

El nivel y/o actividad de GDF11 puede usarse adicionalmente para evaluar la dosificación apropiada para un sujeto que es candidato a ser tratado con un inhibidor del receptor de activina tipo II, para evaluar si se debe ajustar la dosificación del inhibidor del receptor de activina tipo II durante el tratamiento y/o para evaluar una dosis de mantenimiento apropiada del inhibidor del receptor de activina tipo II. Si el nivel y/o actividad de GDF11 está fuera del nivel y/o actividad normal, la dosificación con un inhibidor del receptor de activina tipo II puede iniciarse, aumentarse, reducirse, retrasarse o terminarse dependiendo del nivel y/o actividad de GDF11. Por ejemplo, si el nivel y/o actividad de GDF11 está elevado sobre el nivel y/o actividad normal, se puede iniciar o aumentar la dosificación con un inhibidor del receptor de activina tipo II, y si el nivel y/o actividad de GDF11 se reduce sobre el nivel y/o actividad normal, la dosificación con un inhibidor del receptor de activina tipo II puede reducirse, retrasarse o terminarse.

En un aspecto, los métodos comprenden administrar a un sujeto un inhibidor del receptor de activina tipo II y monitorizar el nivel y/o actividad de GDF11 en el sujeto. Una disminución en el nivel y/o actividad de GDF11 después de la administración de un inhibidor del receptor de activina tipo II (en relación con el nivel y/o actividad antes de la administración del inhibidor de activina tipo II) puede indicar que el sujeto responde al tratamiento con el inhibidor del receptor de activina tipo II y/o que el tratamiento con el inhibidor del receptor de activina tipo II es eficaz. La ausencia de cambio o aumento en el nivel y/o actividad de GDF11 después de la administración de un inhibidor del receptor de activina tipo II (en relación con el nivel y/o actividad antes de la administración del inhibidor de activina tipo II) puede indicar que el sujeto no responde al tratamiento con un inhibidor del receptor de activina tipo II o que el sujeto requiere una dosis más alta del inhibidor del receptor de activina tipo II para lograr la eficacia.

En otros aspectos, el grado de cambio en el nivel y/o actividad de GDF11 después de la administración de un inhibidor del receptor de activina tipo II (en relación con el nivel y/o actividad antes de la administración del inhibidor de activina tipo II o en relación con los niveles y/o actividad normal de GDF11) pueden indicar la dosificación o el régimen de dosificación apropiados del inhibidor del receptor de activina tipo II. Por ejemplo, la ausencia de disminución o una pequeña disminución en el nivel y/o actividad de GDF11 (p. ej., menos del 5 %, menos del 10 %, menos del 15 %, menos del 20 %, o menos del 25 %, o menos del 30 % de disminución) después de la administración de una dosis de un inhibidor del receptor de activina tipo II (en relación con el nivel y/o actividad antes de la administración del inhibidor de activina tipo II) puede indicar que se requiere o es deseable una dosis más alta del inhibidor del receptor de activina tipo II deseable para lograr la eficacia. Por consiguiente, en algunas realizaciones, cuando la evaluación del nivel y/o actividad de GDF11 no muestra una disminución o muestra una disminución indeseablemente pequeña en el nivel y/o actividad de GDF11 (p. ej., menos del 5 %, menos del 10 %, menos del 15 %, menos del 20 %, o menos del 25 %, o menos del 30 % de disminución) después de la administración de una dosis de un inhibidor del receptor de activina tipo II al paciente, al paciente se le administra una dosis más alta de un inhibidor del receptor de la activina tipo II (p. ej., una dosis un 20 %, 25 %, 30 %, 50 %, 75 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, 600 %, 700 %, 800 %, 900 % o 1.000 % más alta).

En otras realizaciones, una disminución en el nivel y/o actividad de GDF11 (por ejemplo, una disminución leve o promedio, tal como menos del 10 %, menos del 15 %, menos del 20 % o menos del 25 %, menos del 30 %, menos del 50 % o menos del 75 % de disminución, o del 10 % al 75 % de disminución, o del 25 % al 50 % de disminución) después de la administración de una dosis de un inhibidor del receptor de activina tipo II (en relación con el nivel y/o actividad antes de la administración del inhibidor de activina tipo II) puede indicar que el tratamiento con el inhibidor del receptor de activina tipo II es eficaz a la dosis y/o régimen de dosificación dados. Por consiguiente, en algunas realizaciones, cuando la evaluación del nivel y/o actividad de GDF11 muestra una disminución en el nivel y/o actividad de GDF11 (por ejemplo, disminución leve o promedio, tal como menos del 10 %, menos del 15 %, menos del 20 %, o menos del 25 %, menos del 30 %, menos del 50 %, o menos del 75 % de disminución, o del 10 % al 75 % de disminución, o del 25 % al 50 % de disminución) después de la administración de una dosis de un inhibidor del receptor de activina tipo II al paciente, al paciente se le administra la misma dosis de un inhibidor del receptor de activina tipo II. En una realización particular, cuando la evaluación del nivel y/o actividad de GDF11 muestra una disminución promedio o deseable en el nivel y/o actividad de GDF11 (por ejemplo, entre el 20 % y el 75 %, entre el 25 % y el 75 %, o entre el 30 % y el 60 % de disminución) después de la administración de una dosis de un inhibidor del receptor de activina tipo II al paciente, al paciente se le administra la misma dosis de un inhibidor del receptor de activina tipo II. Una disminución grande (o indeseablemente grande) en el nivel y/o actividad de GDF11 (p. ej., más del 50 %, más

del 60 %, más del 70 %, más del 75 %, más del 80 %, más del 90 %, más del 95 % de disminución) después de la administración de una dosis de un inhibidor del receptor de activina tipo II (en relación con el nivel y/o actividad antes de la administración del inhibidor de la activina tipo II) puede indicar que una dosis más baja del inhibidor del receptor de activina tipo II es deseable (p. ej., para evitar los efectos secundarios del tratamiento, tal como la hipertensión). Por consiguiente, en algunas realizaciones, cuando la evaluación del nivel y/o actividad de GDF11 muestra una disminución grande (o indeseablemente grande) en el nivel y/o actividad de GDF11 (p. ej., más del 50 %, más del 60 %, más del 70 %, más del 75 %, más del 80 %, más del 90 %, más del 95 % de disminución) después de la administración de una dosis de un inhibidor del receptor de activina tipo II al paciente, al paciente se le administra una dosis más baja de un inhibidor del receptor de activina tipo II (p. ej., una dosis un 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 90 % o 95 % más baja).

La monitorización del nivel y/o actividad de GDF11 se puede realizar evaluando el nivel y/o actividad de GDF11 1 día, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o 1 año después de la administración de un inhibidor del receptor de activina tipo II al paciente. El nivel y/o actividad de GDF11 después de la administración de un inhibidor del receptor de activina tipo II a un paciente, también puede usarse como un indicador de la frecuencia apropiada o deseable de la administración de un inhibidor del receptor de activina tipo II al paciente. Por ejemplo, si se mantiene una disminución en el nivel y/o actividad de GDF11 después de la administración de un inhibidor del receptor de activina tipo II durante un período de tiempo (p. ej., 1 día, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 10 semanas, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o 1 año), entonces el inhibidor del receptor de activina tipo II se puede administrar una vez durante el período de tiempo (p. ej., una vez al día, una vez a la semana, una vez en 2 semanas, una vez en 3 semanas, una vez en 4 semanas, una vez en 5 semanas, una vez en 6 semanas, una vez en 7 semanas, una vez en 8 semanas, una vez en 3 meses, una vez en 4 meses, una vez en 5 meses, una vez en 6 meses o una vez al año). En una realización específica, si se mantiene una disminución en el nivel y/o actividad de GDF11 después de la administración de un inhibidor del receptor de activina tipo II durante, p. ej., 1 mes, 2 meses o 3 meses, entonces el inhibidor del receptor de activina tipo II se puede administrar una vez en 1 mes, 2 meses o 3 meses, respectivamente.

En una realización específica, los métodos comprenden (i) evaluar el nivel de GDF11 en un tejido (p. ej., sangre, suero, plasma, hígado, médula ósea y/o bazo) de un sujeto (p. ej., un sujeto que tiene anemia); (ii) administrar un inhibidor del receptor de activina tipo II al sujeto; y (iii) evaluar el nivel de GDF11 en un tejido (p. ej., sangre, suero, plasma, hígado, médula ósea y/o bazo) de un sujeto (p. ej., un sujeto que tiene anemia) después de la administración del inhibidor del receptor de activina tipo II. La administración de la etapa (ii) puede comprender una administración única de un inhibidor del receptor de activina tipo II (es decir, se administra una única dosis una vez al sujeto) o múltiples administraciones de un inhibidor del receptor de activina tipo II (p. ej., la administración puede comprender un régimen de administración completo). La evaluación de la etapa (iii) se puede realizar en cualquier punto después de la administración de la etapa (ii). Por ejemplo, la evaluación de la etapa (iii) se puede realizar 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 10 semanas, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o 1 año después de la administración de la etapa (ii). Como otro ejemplo, la evaluación de la etapa (iii) se puede realizar 1-3 días, 2-4 días, 3-5 días, 5-7 días, 1-2 semanas, 2-3 semanas, 3-4 semanas, 1-2 meses, 2-3 meses, 3-4 meses, 4-5 meses, 5-6 meses o 6-12 meses después de la administración de la etapa (ii). El régimen terapéutico se puede ajustar en función del resultado de las evaluaciones en las etapas (i) y (iii). Por ejemplo, si los niveles de GDF11 en el tejido del sujeto determinados en la evaluación de la etapa (i) disminuyen en relación con los niveles de GDF11 en el tejido del sujeto determinados en la evaluación de la etapa (iii), entonces la dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II administrado al sujeto puede mantenerse o disminuirse. Por el contrario, si los niveles de GDF11 en el tejido del sujeto determinados en la evaluación de la etapa (i) se incrementan en relación con los niveles de GDF11 en el tejido del sujeto determinados en la evaluación de la etapa (iii), entonces la dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II administrado al sujeto puede aumentarse. Las etapas del método anterior pueden repetirse/alterarse según sea necesario para determinar la dosis/régimen terapéutico apropiado que sea apropiado para el sujeto sometido a tratamiento.

En otro aspecto, los métodos comprenden (a) administrar una primera dosis de un inhibidor del receptor de activina tipo II a un paciente, (b) determinar el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido del paciente (p. ej., suero), y (c) administrar una segunda dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II, en donde si el nivel y/o actividad de GDF11 está elevado por encima de lo normal, la segunda dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II es mayor que la primera dosis (p. ej., un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, 600 %, 700 %, 800 %, 900 % o 1.000 % mayor), y en donde, si el nivel y/o actividad de GDF11 disminuye respecto a lo normal, la segunda dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II es menor que la primera dosis (p. ej., un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % menor). En estas realizaciones, el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido se compara con el nivel y/o actividad normal de GDF11 (p. ej., el nivel y/o actividad promedio de GDF11 en una muestra del mismo tejido de sujetos sanos, tales como sujetos en el mismo grupo de edad que no tienen anemia). En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de GDF11 se considera elevado sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11 cuando está elevado al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 100 %, al menos un 200 %, al menos un 300 % o al

menos un 500% sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11. En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de GDF11 se considera elevado sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11 cuando está elevado al menos un 25 %, al menos un 50 %, al menos un 75 %, al menos un 100 %, o al menos un 200 % sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11. En algunas realizaciones, el nivel y/o actividad de GDF11 se considera disminuido sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11 cuando se disminuye al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11. En algunas realizaciones, el nivel y/o actividad de GDF11 se considera disminuido sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11 cuando se disminuye al menos un 25 %, al menos un 50 %, al menos un 75 %, o al menos un 90 % sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11.

Los métodos descritos en la presente memoria se basan, en parte, en un descubrimiento de que GDF11 inhibe el crecimiento de precursores de glóbulos rojos y, por lo tanto, el nivel de GDF11 puede correlacionarse con el nivel de glóbulos rojos. Es deseable mantener un nivel óptimo de glóbulos rojos en un paciente porque, si bien la disminución de los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina o hematocrito se asocian con eritropoyesis ineficaz y anemia, los aumentos excesivos en los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina o hematocrito están asociados con un aumento de la presión arterial y otros efectos secundarios indeseables (que pueden ser causados por el tratamiento con dosis más altas que las óptimas de un inhibidor del receptor de activina tipo II). Por consiguiente, puede ser deseable administrar un inhibidor del receptor de activina tipo II en un régimen de dosificación que mantenga el nivel y/o actividad de GDF11 en un paciente en o alrededor de (p. ej., dentro del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 75 % de) el nivel y/o actividad normal de GDF11.

En ciertas realizaciones, si se determina que el nivel y/o actividad de GDF11 se reduce por debajo del nivel y/o actividad normal de GDF11, entonces la administración de un inhibidor del receptor de activina tipo II se ajusta en consecuencia, p. ej., se retrasa, hasta que el nivel y/o actividad de GDF11 vuelva a la normalidad o dentro del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 75 % del nivel y/o actividad normal de GDF11, o se termina de forma temporal o permanente. En otras realizaciones, en donde se determina que el nivel y/o actividad de GDF11 está reducido por debajo del nivel y/o actividad normal de GDF11, la administración de un inhibidor del receptor de activina tipo II no se retrasa, pero la cantidad de dosificación o frecuencia de dosificación del inhibidor se establece en una cantidad que reduciría el riesgo de un aumento inaceptable de glóbulos rojos, hemoglobina o hematocrito, o alternativamente, se desarrolla un régimen terapéutico para el paciente que combina el uso del inhibidor con un agente que aborda el aumento inaceptable de glóbulos rojos, hemoglobina o hematocrito (p. ej., un agente reductor de la presión arterial).

En ciertas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un inhibidor del receptor de activina tipo II para uso en un método para tratar la anemia en un individuo que lo necesita determinando el nivel y/o actividad de GDF11 en el individuo, y si el nivel y/o actividad de GDF11 es elevada, administrando al individuo una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor del receptor de activina tipo II, particularmente un polipéptido de ActRII (p. ej., ActRIIa-hFc), y opcionalmente, monitorizando (o determinando) adicionalmente el nivel y/o actividad de GDF11, y ajustando la dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II (en donde, por ejemplo, si GDF11 está elevado sobre el nivel y/o actividad normal, la dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II aumenta, y si el nivel y/o actividad de GDF11 es inferior al nivel y/o actividad normal se disminuye la dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II).

En ciertas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un inhibidor del receptor de activina tipo II para uso en un método para tratar beta-talasemia en un individuo que lo necesite determinando el nivel y/o actividad de GDF11 en el individuo, y si el nivel y/o actividad de GDF11 es elevada, administrando al individuo una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor del receptor de activina tipo II, particularmente un polipéptido de ActRII (p. ej., ActRIIa-hFc), y opcionalmente, monitorizando (o determinando) adicionalmente el nivel y/o actividad de GDF11 y ajustando la dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II (en donde, por ejemplo, si el nivel y/o actividad de GDF11 está elevado sobre lo normal, la dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II aumenta, y si el nivel y/o actividad de GDF11 es más baja de lo normal, la dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II se disminuye).

En ciertas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un inhibidor del receptor de activina tipo II para uso en un método para aumentar los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito o Ery-C en un individuo que lo necesite determinando el nivel y/o actividad de GDF11 en el individuo, y si el nivel y/o actividad de GDF11 es elevada, administrando al individuo una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor del receptor de activina tipo II, particularmente un polipéptido de ActRII (p. ej., ActRIIa-hFc), y opcionalmente, monitorizando (o determinando) adicionalmente el nivel y/o actividad de GDF11, y ajustando la dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II (en donde, por ejemplo, si el nivel y/o actividad de GDF11 está elevado sobre lo normal, la dosis del antagonista del receptor de activina se aumenta, y si el nivel y/o actividad de GDF11 es más bajo de lo normal, la dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II se disminuye).

En ciertas realizaciones, los métodos se utilizan en conexión con un método para tratar o mejorar la anemia, la eritropoyesis ineficaz, la disminución de los niveles de glóbulos rojos o cualquier otro trastorno sanguíneo descrito en la presente memoria. En ciertas realizaciones, los métodos se utilizan en relación con un método para aumentar los niveles de glóbulos rojos, niveles de hemoglobina, niveles de hematocrito o niveles de unidades formadoras de

colonias en un paciente con anemia, eritropoyesis ineficaz, niveles disminuidos de glóbulos rojos o cualquier otro trastorno sanguíneo descrito en la presente memoria. En ciertas realizaciones, los niveles de glóbulos rojos se incrementan en al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 125 %, 150 %, 175 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 %, o al menos en un 500 %. En ciertas realizaciones, los niveles de hemoglobina se incrementan en al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 125 %, 150 %, 175 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 %, o al menos en un 500 %. En ciertas realizaciones, los niveles de hematocrito se incrementan en al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 125 %, 150 %, 175 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 %, o al menos en un 500 %. En ciertas realizaciones, los niveles de unidades formadoras de colonias se incrementan en al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 125 %, 150 %, 175 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 %, o al menos en un 500 %. En ciertas realizaciones, los métodos se utilizan en conexión con un método para disminuir los niveles de apoptosis de progenitores y precursores eritroides.

### 5.3 Poblaciones de pacientes

Los sujetos tratados según los métodos descritos en la presente memoria pueden ser cualquier mamífero tales como roedores y primates, y en una realización preferida, seres humanos. En ciertas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para tratar la anemia o la eritropoyesis ineficaz, o para monitorizar y/o aumentar los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito o Ery-C, en cualquier mamífero tales como roedores y primates, y en una realización preferida, en pacientes humanos.

En un aspecto, los métodos se utilizan en conexión con un método de tratamiento. En algunas realizaciones, los métodos son para tratar anemia (p. ej., anemia causada por eritropoyesis ineficaz). En ciertas realizaciones, el método es para tratar una enfermedad asociada con eritropoyesis ineficaz (p. ej., talasemia, síndromes mielodisplásicos, anemia perniciosa crónica o anemia de células falciformes). En ciertas realizaciones, el método es para tratar un síndrome hereditario de insuficiencia de la médula ósea (tal como, pero no limitado a, trombocitopenia amegacariocítica, anemia de Diamond-Blackfan, disqueratosis congénita, anemia de Fanconi, síndrome de Pearson, neutropenia congénita grave, síndrome de Shwachman-Diamond, trombocitopenia con ausencia de radios). En realizaciones específicas, el método es para tratar un síndrome hereditario de insuficiencia de la médula ósea que afecta específicamente a los glóbulos rojos. En ciertas realizaciones, el método es para tratar anemia y/o trastornos óseos asociados con la enfermedad renal en estadio terminal. En algunas realizaciones, el método es para tratar talasemia (p. ej.,  $\beta$ -talasemia), síndromes mielodisplásicos, anemia perniciosa crónica, anemia de células falciformes o anemia de Diamond-Blackfan. En una realización, el método es para tratar  $\beta$ -talasemia. En una realización, el método es para tratar anemia de Diamond-Blackfan.

En ciertas realizaciones, los métodos son para tratar a un paciente que tiene anemia (p. ej., diagnosticado con anemia). En algunas realizaciones, los métodos son para tratar a un paciente que tiene (p. ej., diagnosticado con) una enfermedad asociada con eritropoyesis ineficaz, tal como talasemia, síndromes mielodisplásicos, anemia perniciosa crónica o anemia de células falciformes. En ciertas realizaciones, los métodos son para tratar a un paciente que tiene (p. ej., diagnosticado con) un síndrome hereditario de insuficiencia de la médula ósea, tal como trombocitopenia amegacariocítica, anemia de Diamond-Blackfan, disqueratosis congénita, anemia de Fanconi, síndrome de Pearson, neutropenia congénita grave, síndrome de Shwachman-Diamond, trombocitopenia con ausencia de radios o un síndrome de insuficiencia de la médula ósea que afecta específicamente a los glóbulos rojos. En realizaciones específicas, los métodos son para tratar a un paciente que tiene (p. ej., diagnosticado con) anemia y/o trastornos óseos asociados con enfermedad renal en estadio terminal. En realizaciones específicas, los métodos son para tratar a un paciente que tiene (p. ej., diagnosticado con) talasemia (p. ej.,  $\beta$ -talasemia), síndromes mielodisplásicos, anemia perniciosa crónica, anemia de células falciformes o anemia de Diamond-Blackfan. En una realización, los métodos son para tratar a un paciente que tiene (p. ej., diagnosticado con)  $\beta$ -talasemia.

La anemia está asociada con una variedad de trastornos y afecciones que incluyen, sin limitación: insuficiencia renal crónica, síndrome mielodisplásico, artritis reumatoide, trasplante de médula ósea, 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), radioterapia, quimioterapia (p. ej., regímenes que contienen platino), enfermedades inflamatorias y autoinmunes (incluidas, pero no limitado a, artritis reumatoide, otras artritis inflamatorias, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedades cutáneas agudas o crónicas (p. ej., psoriasis), enfermedad inflamatoria intestinal (p. ej., enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), enfermedad o insuficiencia renal aguda o crónica, incluyendo afecciones idiopáticas o congénitas, enfermedad hepática aguda o crónica, hemorragia aguda o crónica, situaciones donde la transfusión de glóbulos rojos no es posible debido a alo o autoanticuerpos del paciente y/o por razones religiosas, infecciones (p. ej., malaria, osteomielitis), hemoglobinopatías (incluyendo, por ejemplo, enfermedad de células falciformes, talasemias), uso o abuso de drogas (p. ej., abuso de alcohol; pacientes pediátricos con anemia por cualquier causa para evitar la transfusión), y situaciones en las que los pacientes de edad avanzada o pacientes con enfermedad cardiopulmonar subyacente con anemia no pueden recibir transfusiones debido a las preocupaciones sobre la sobrecarga circulatoria. En ciertas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria se usan para

tratar anemia, o monitorizar y/o aumentar los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito o Ery-C, en cualquier paciente que tenga uno o más de los trastornos o afecciones enumerados anteriormente.

5 En ciertas realizaciones, el método es para tratar una anemia en donde el sujeto no responde a la administración de eritropoyetina. En ciertas realizaciones, el método es para tratar una anemia en donde el sujeto no responde a la administración de hierro, vitamina B-12 y/o folato. En ciertas realizaciones, el método es para tratar una anemia resultante de progenitores y precursores eritroides que son altamente sensibles a la muerte por apoptosis.

10 En ciertas realizaciones, los sujetos tratados (p. ej., seleccionados para el tratamiento) según los métodos descritos en la presente memoria tienen niveles elevados y/o actividad elevada de GDF11 en relación con los niveles normales de GDF11. Por ejemplo, los sujetos tratados (p. ej., seleccionados para el tratamiento) según los métodos descritos en la presente memoria tienen niveles y/o actividad elevada de GDF11 es un tejido en relación con el nivel y/o actividad promedio de GDF11 en el mismo tejido de sujetos sanos en la misma categoría de edad. El nivel y/o actividad de GDF11 puede evaluarse mediante cualquier método conocido en la técnica o descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, los sujetos tratados según los métodos descritos en la presente memoria tienen el nivel y/o actividad de GDF11 que es al menos un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 125 %, 150 %, 175 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 %, 500 % o 1.000 % sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11 (p. ej., el nivel promedio en un sujeto o sujetos sanos). En realizaciones específicas, los sujetos tratados según los métodos descritos en la presente memoria tienen el nivel y/o actividad de GDF11 que es al menos un 50 %, al menos un 75 %, al menos un 100 %, al menos un 200 % o al menos un 500 % sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11. En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria se usan para monitorizar, modular o aumentar el nivel de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito o niveles de Ery-C en sujetos que se ha determinado que tienen niveles elevados de GDF11.

20 En ciertas realizaciones, los sujetos tratados (p. ej., seleccionados para el tratamiento) según los métodos descritos en la presente memoria tienen (i) niveles y/o actividad elevada de GDF11 en relación con los niveles normales de GDF11 (p. ej., en suero, médula ósea, hígado y/o bazo), y (ii) anemia o una enfermedad o afección asociada con anemia o eritropoyesis ineficaz (p. ej., sujetos diagnosticados con anemia). En ciertas realizaciones, un paciente humano tratado (p. ej., seleccionado para el tratamiento) según los métodos descritos en la presente memoria tiene niveles y/o actividad sérica elevada de GDF11 en relación con los niveles normales de GDF11, y tiene anemia (p. ej., ha sido diagnosticado con anemia).

30 En algunas realizaciones, los sujetos tratados según los métodos descritos en la presente memoria tienen un recuento de glóbulos rojos indeseablemente bajo, un nivel de hemoglobina indeseablemente bajo, un nivel de hematocrito indeseablemente bajo y/o un nivel de Ery-C indeseablemente bajo. Los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para monitorizar, modular y/o aumentar los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito o Ery-C en poblaciones de pacientes seleccionadas. En otras realizaciones, el método es para tratar a un paciente en riesgo de desarrollar niveles indeseablemente bajos de glóbulos rojos o hemoglobina, tales como aquellos pacientes que están a punto de someterse a una cirugía mayor u otros procedimientos que pueden provocar una pérdida considerable de sangre. En algunas realizaciones, los sujetos tratados según los métodos descritos en la presente memoria están a punto de someterse a una cirugía mayor u otro procedimiento que puede provocar una pérdida de sangre sustancial.

40 Cuando se determina si el nivel de hemoglobina es indeseablemente bajo, un nivel inferior a lo normal para la categoría apropiada de edad y género puede ser indicativo de anemia, aunque se tienen en cuenta las variaciones individuales. Por ejemplo, un nivel de hemoglobina de 12 g/dl generalmente se considera el límite inferior normal en humanos adultos. Las causas potenciales de niveles bajos de hemoglobina incluyen pérdida de sangre, déficit nutricional, reacción a medicamentos, diversos problemas con la médula ósea y muchas enfermedades. Los pacientes pueden ser tratados con un régimen de dosificación destinado a restaurar al paciente a un nivel de hemoglobina diana, generalmente entre aproximadamente 10 g/dl y aproximadamente 12,5 g/dl, y típicamente aproximadamente 11,0 g/dl (véase también Jacobs et al. (2000) *Nephrol Dial Transplant* 15, 15-19), aunque los niveles diana más bajos pueden causar menos efectos secundarios cardiovasculares. Óptimamente, el nivel diana de hemoglobina se puede individualizar para cada paciente. En ciertas realizaciones, un paciente que va a ser tratado con los métodos descritos en la presente memoria tiene niveles de hemoglobina de menos de 13 g/dl, menos de 12,5 g/dl, menos de 12 g/dl, menos de 11,5 g/dl, menos de 11 g/dl, menos de 10,5 g/dl, menos de 10 g/dl, menos de 9,5 g/dl, o menos de 9 g/dl.

50 Cuando se determina si el nivel de glóbulos rojos es indeseablemente bajo, se pueden usar los niveles de hematocrito (porcentaje del volumen de una muestra de sangre ocupada por las células) para evaluar la condición de los glóbulos rojos. Los niveles de hematocrito para individuos sanos varían del 41 al 51 % para hombres adultos y del 35 al 45 % para mujeres adultas. Los niveles de hematocrito diana generalmente son de alrededor del 30-33 %, aunque los niveles de hematocrito varían de persona a persona. Óptimamente, el nivel diana de hematocrito se puede individualizar para cada paciente.

60 En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria se usan para tratar anemia, o una enfermedad o afección asociada con anemia o eritropoyesis ineficaz, en pacientes que son susceptibles a efectos adversos cuando se administra una dosis superior a la óptima de un inhibidor del receptor de activina tipo II, particularmente un polipéptido de ActRII (p. ej., ActRIIa-hFc). Los efectos adversos que pueden estar asociados con la administración de una dosis superior a la óptima de un inhibidor del receptor de activina tipo II incluyen, sin limitación, un aumento



excesivo en los niveles de glóbulos rojos, niveles de hematocrito o niveles de hemoglobina, un aumento excesivo en las reservas de hierro e hiperplasia en la médula ósea o el bazo. A su vez, los aumentos excesivos en los niveles de glóbulos rojos, niveles de hemoglobina o niveles de hematocrito pueden causar un aumento en la presión arterial y/u otros efectos secundarios indeseables. En realizaciones específicas, los pacientes tratados según los métodos descritos en la presente memoria son susceptibles a la hipertensión (p. ej., aumento de la presión arterial sistólica, presión arterial diastólica y/o presión arterial media) u otra afección que puede estar relacionada con un aumento excesivo de los niveles de glóbulos rojos (p. ej., dolores de cabeza, síndrome similar a la gripe o trombosis vascular). En una realización específica, los pacientes tratados según los métodos descritos en la presente memoria son susceptibles a la hipertensión u otra afección que puede estar relacionada con un aumento excesivo de los niveles de glóbulos rojos cuando se tratan con un inhibidor del receptor de activina tipo II (p. ej., ActRIIA-hFc tal como la SEQ ID NO: 7).

Los sujetos de cualquier edad pueden tratarse según los métodos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, los sujetos tratados según los métodos descritos en la presente memoria tienen más de 55 años de edad. En algunas realizaciones, los sujetos tratados según los métodos descritos en la presente memoria tienen menos de 3 o 10 años de edad. En otras realizaciones, los sujetos tratados según los métodos descritos en la presente memoria tienen menos de 18 años de edad. En otras realizaciones adicionales, los sujetos tratados según los métodos descritos en la presente memoria tienen de 18 a 55 años de edad.

#### 5.4 Evaluación del nivel y/o actividad de GDF11

El nivel o la actividad de GDF11 se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica o descrito en la presente memoria. Por ejemplo, el nivel de GDF11 en una muestra de tejido puede determinarse evaluando (p. ej., cuantificando) el ARN transcrito de GDF11 en la muestra utilizando, p. ej., transferencia Northern, análisis por PCR, análisis por PCR en tiempo real o cualquier otra técnica conocida en el arte o descrita en la presente memoria. En una realización, el nivel de GDF11 en una muestra de tejido puede determinarse evaluando (p. ej., cuantificando) el ARNm de GDF11 en la muestra.

El nivel de GDF11 en una muestra de tejido también se puede determinar evaluando (p. ej., cuantificando) el nivel de expresión de proteínas de GDF11 en la muestra usando, p. ej., análisis inmunohistoquímico, transferencia Western, ELISA, inmunoprecipitación, análisis por citometría de flujo, o cualquier otra técnica conocida en la técnica o descrita en la presente memoria. En realizaciones particulares, el nivel de GDF11 se determina mediante un método capaz de cuantificar la cantidad de GDF11 presente en una muestra de tejido de un paciente (p. ej., en suero humano), y/o capaz de detectar la corrección del nivel de GDF11 después del tratamiento con un inhibidor del receptor de activina tipo II. En una realización, el nivel de GDF11 en una muestra de tejido se determina evaluando (p. ej., cuantificando) la expresión de proteína de GDF11 en la muestra usando ELISA. Por ejemplo, GDF11 puede identificarse y cuantificarse en el suero humano usando el método ELISA en sándwich descrito en los Ejemplos. El método ELISA en sándwich para uso en la determinación del nivel de GDF11 en una muestra de tejido puede comprender el recubrimiento con ActRIIA-Fc (usando, p. ej., ActRIIA-mFc, o ActRIIA-hFc tal como la SEQ ID NO: 7) de placas ELISA, poner en contacto las placas con la muestra de tejido (p. ej., suero humano) y detectar el ligando de ActRIIA (tal como GDF11) en la muestra de tejido (p. ej., suero humano) que se une a ActRIIA-Fc mediante anticuerpos específicos. En algunas realizaciones, el método para uso en la determinación del nivel y/o actividad de GDF11 como se describe en la presente memoria (p. ej., ELISA en sándwich) es capaz de detectar a partir de 100 pg/ml de GDF11 recombinante, Activina A y/o Activina B unidos a ActRIIA.

Los anticuerpos para uso en ensayos que miden los niveles de GDF11 en una muestra (p. ej., en una muestra de tejido, p. ej., una muestra de sangre, suero, plasma, hígado, bazo y/o médula ósea) se conocen en el arte o podrían desarrollarse fácilmente utilizando estrategias conocidas por los expertos en la técnica. Los ejemplos de anticuerpos monoclonales que pueden usarse en ensayos que miden los niveles de GDF11 en una muestra incluyen anticuerpos de LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, con números de catálogo LS-C121127, LS-C138772, LS-C105098; anticuerpos disponibles en Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, con número de catálogo (X-19): sc-81952; y anticuerpos disponibles en Sigma-Aldrich Co. LLC, con número de producto: WH0010220M3.

La actividad de GDF11 puede medirse mediante cualquier ensayo conocido en la técnica incluyendo, sin limitación, ensayo de formación de colonias, un ensayo de gen informador (p. ej., que contiene una construcción de gen informador que responde a GDF11), ensayo de fosfatasa alcalina o cualquier otro ensayo de bioactividad. Los ensayos ejemplares que se pueden usar para medir la actividad de GDF11 se describen en Souza et al., 2008, Mol. Endocrinology 22(12):2689-2702; y Bessa et al., 2009, Protein Expression and Purification 63:89-94.

El nivel y/o actividad de GDF11 se puede evaluar en cualquier muestra de tejido obtenida de un paciente tratado según los métodos descritos en la presente memoria. En ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad de GDF11 se evalúa en una muestra obtenida de suero, hígado, bazo o médula ósea de un paciente tratado según los métodos descritos en la presente memoria. En una realización, el nivel y/o actividad de GDF11 se evalúa en una muestra obtenida del suero de un paciente tratado según los métodos descritos en la presente memoria. En otra realización, el nivel y/o actividad de GDF11 se evalúa en una muestra obtenida del bazo de un paciente tratado según los métodos descritos en la presente memoria. En otra realización más, el nivel y/o actividad de GDF11 se evalúa en una muestra obtenida de la médula ósea de un paciente tratado según los métodos descritos en la presente memoria.

En algunas realizaciones, el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido de un paciente se compara con el nivel y/o actividad promedio de GDF11 en muestras de tejido (p. ej., en muestras del mismo tejido) de sujetos sanos (p. ej., sujetos que no tienen anemia), tales como sujetos del mismo grupo de edad y, opcionalmente, del mismo género. En algunas realizaciones, el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido de un paciente se compara con el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido (p. ej., en una muestra del mismo tejido) del sujeto en un punto de tiempo anterior (p. ej., antes del inicio de la enfermedad, antes del inicio del tratamiento o durante el tratamiento). En algunas realizaciones, el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido (p. ej., suero, bazo, hígado o médula sanguínea) de un paciente se compara con el nivel y/o actividad de GDF11 en otra muestra de tejido del paciente. En algunas realizaciones, el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido de un paciente se compara con el nivel y/o actividad de otro producto génico en la muestra de tejido del paciente (p. ej., b-actina, Activina A, Activina B).

En algunas realizaciones, el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido de un paciente se compara con el nivel y/o actividad normal de GDF11 en la muestra de tejido. El nivel y/o actividad normal de GDF11 en una muestra de tejido puede ser un nivel y/o actividad promedio de GDF11 en muestras de tejido (p. ej., en muestras del mismo tejido) de uno o más sujetos sanos (p. ej., sujetos que no tienen anemia), tales como sujetos en el mismo grupo de edad y, opcionalmente, del mismo género. En algunas realizaciones, la detección del nivel y/o actividad elevada de GDF11 en comparación con el nivel y/o actividad normal de GDF11 es seguida por la administración de un inhibidor del receptor de activina (tal como uno o más inhibidores del receptor de activina descritos en la presente memoria). En algunas realizaciones, la administración de un inhibidor del receptor de activina (tal como uno o más inhibidores del receptor de activina descritos en la presente memoria) es seguida de la monitorización del nivel y/o actividad de GDF11 y, opcionalmente, de la comparación del nivel y/o actividad de GDF11 con el nivel y/o actividad normal de GDF11. En algunas realizaciones, la administración de una primera dosis de inhibidor del receptor de activina tipo II (p. ej., ActRIIA-hFc tal como la SEQ ID NO: 7) es seguida de la determinación del nivel y/o actividad de GDF11, y si el nivel y/o actividad de GDF11 está elevada sobre el nivel y/o actividad normal, de la administración de una segunda dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II que es mayor (p. ej., 1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces mayor) que la primera dosis, y si el nivel y/o actividad de GDF11 está disminuido respecto al nivel y/o actividad normal, de la administración de una segunda dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II que es menor (p. ej., 1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces menor) que la primera dosis.

Tal y como se usa en la presente memoria, en ciertas realizaciones, el nivel y/o actividad normal de GDF11 es un nivel y/o actividad promedio de GDF11 en una muestra de tejido de uno o más sujetos sanos (p. ej., sujetos sanos en la misma categoría de edad y/o del mismo género). En algunas realizaciones, el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido del sujeto tratado se compara con el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra del mismo tejido de uno o más sujetos sanos. En algunas realizaciones, el tejido en el que se evalúa el nivel y/o actividad de GDF11 es sangre completa, médula ósea, hígado o bazo. En una realización, el tejido en el que se evalúa el nivel y/o actividad de GDF11 es suero.

## 5.5 Usos terapéuticos

En ciertas realizaciones, los inhibidores del receptor de activina tipo II se usan para el tratamiento de pacientes que tienen anemia, o una enfermedad o afección asociada con anemia o eritropoyesis ineficaz, en los métodos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, los inhibidores del receptor de activina tipo II se administran a un paciente que tiene anemia, o una enfermedad o afección asociada con anemia o eritropoyesis ineficaz. En algunas realizaciones, los inhibidores del receptor de activina tipo II se administran a un paciente que tiene anemia, o una enfermedad o afección asociada con anemia o eritropoyesis ineficaz, y que tiene niveles y/o actividad elevados de GDF11 (p. ej., en suero, médula ósea, hígado, y/o bazo del paciente). Los inhibidores del receptor de activina tipo II descritos en esta sección y conocidos en la técnica pueden usarse en los métodos proporcionados en la presente memoria. En ciertas realizaciones, los inhibidores del receptor de activina tipo II descritos en esta sección pueden usarse en los métodos proporcionados en la presente memoria.

Los inhibidores de los receptores ActRII incluidos en la presente memoria incluyen inhibidores de ActRIIA e inhibidores de ActRIIB (véase más adelante). En ciertas realizaciones, un inhibidor del receptor ActRII es específico de ActRIIA. En otras realizaciones, un inhibidor del receptor ActRII es específico de ActRIIB. En ciertas realizaciones, un inhibidor del receptor ActRII inhibe preferentemente ActRIIA. En otras realizaciones, un inhibidor del receptor ActRII inhibe preferentemente ActRIIB. En ciertas realizaciones, un inhibidor del receptor ActRII inhibe tanto ActRIIA como ActRIIB.

En ciertas realizaciones, los inhibidores de los receptores ActRII pueden ser polipéptidos que comprenden dominios de unión a activina de ActRII. Sin estar limitado por la teoría, dichos polipéptidos que comprenden el dominio de unión a activina secuestran activina y, por lo tanto, evitan la señalización de activina. Estos polipéptidos que comprenden dominios de unión a activina pueden comprender todo o una parte del dominio extracelular de un receptor ActRII (es decir, todo o una parte del dominio extracelular de ActRIIA o todo o una parte del dominio extracelular de ActRIIB). En realizaciones específicas, el dominio extracelular de un receptor ActRII es soluble.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos que comprenden el dominio de unión a activina se unen a una porción Fc de un anticuerpo (es decir, se genera un conjugado que comprende un polipéptido que comprende un dominio de unión a activina de un receptor de ActRII y una porción Fc de un anticuerpo). Sin estar limitado por la teoría, la porción de

anticuerpo confiere una mayor estabilidad en el conjugado. En ciertas realizaciones, el dominio de unión a activina está unido a una porción Fc de un anticuerpo mediante un conector, *p.ej.*, un conector peptídico.

Los inhibidores de los receptores ActRII usados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria comprenden moléculas que inhiben ActRIIA y/o ActRIIB, directa o indirectamente, ya sea extracelular o intracelularmente. En algunas realizaciones, los inhibidores de ActRIIA y/o ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria inhiben ActRIIA y/o ActRIIB a través de interacciones con el (los) receptor(es) en sí mismos. En otras realizaciones, los inhibidores de ActRIIA y/o ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria inhiben ActRIIA y/o ActRIIB mediante interacciones con un ligando de ActRIIA y/o ActRIIB, *p. ej.*, Activina.

### 10 5.5.1 Inhibidores de ActRIIA

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "ActRIIA" se refiere a una familia de proteínas del receptor de activina tipo IIa (ActRIIA) de cualquier especie y variantes derivadas de dichas proteínas ActRIIA por mutagénesis u otra modificación. La referencia a ActRIIA en la presente memoria se entiende como una referencia a una cualquiera de las formas identificadas actualmente. Los miembros de la familia ActRIIA son generalmente proteínas transmembrana, compuestas por un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteínas, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad de serina/treonina quinasas predicha.

Los inhibidores de ActRIIA que se usarán en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria incluyen, sin limitación, polipéptidos de ActRIIA solubles que se unen a activina; anticuerpos que se unen a activina (particularmente las subunidades de activina A o B, también denominadas  $\beta_A$  o  $\beta_B$ ) e interrumpen la unión de ActRIIA; anticuerpos que se unen a ActRIIA e interrumpen la unión de activina; proteínas distintas de anticuerpos seleccionadas para la unión a activina o ActRIIA (véanse, *p. ej.*, WO/2002/088171, WO/2006/055689, WO/2002/032925, WO/2005/037989, US 2003/0133939, y US 2005/0238646, para ejemplos de dichas proteínas y métodos para el diseño y selección de las mismas); y péptidos aleatorios seleccionados para la unión de activina o ActRIIA, que pueden conjugarse con un dominio Fc.

En ciertos aspectos, dos o más proteínas diferentes (u otros restos) con actividad de unión a activina o ActRIIA, especialmente aglutinantes de activina que bloquean los sitios de unión de tipo I (*p. ej.*, un receptor soluble de activina de tipo I) y tipo II (*p. ej.*, un receptor soluble de activina de tipo II), respectivamente, se pueden unir entre sí para crear una molécula de unión bifuncional o multifuncional que inhibe ActRIIA y, por lo tanto, se puede usar en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria. En ciertos aspectos, los antagonistas del eje de señalización de Activina-ActRIIA que inhiben ActRIIA incluyen aptámeros de ácido nucleico, se usan moléculas pequeñas y otros agentes en las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria incluyen.

#### (a) Inhibidores de ActRIIA que comprenden polipéptidos de ActRIIA

El término "polipéptido de ActRIIA" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido natural de un miembro de la familia ActRIIA, así como cualquier variante del mismo (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que retienen una actividad útil. Por ejemplo, los polipéptidos de ActRIIA incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier ActRIIA conocido que tenga una secuencia al menos aproximadamente un 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido de ActRIIA, y opcionalmente al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad. Por ejemplo, un polipéptido de ActRIIA puede unirse a e inhibir la función de una proteína ActRIIA y/o activina. Se puede seleccionar un polipéptido de ActRIIB por su capacidad para promover el crecimiento óseo y la mineralización ósea. Los ejemplos de polipéptidos de ActRIIA incluyen el polipéptido precursor ActRIIA humano (SEQ ID NO:1) y polipéptidos de ActRIIA humanos solubles (*p. ej.*, SEQ ID NOs: 2, 3, 7 y 12). Con respecto al polipéptido precursor de ActRIIA cuya secuencia de aminoácidos se representa en SEQ ID NO: 1, el péptido señal del polipéptido precursor de ActRIIA humano localizado en las posiciones de aminoácidos 1 a 20; el dominio extracelular se localiza en las posiciones de aminoácidos 21 a 135 y los sitios de glicosilación unidos a N del polipéptido precursor de ActRIIA humano (SEQ ID NO:1) se localizan en las posiciones de aminoácidos 43 y 56 de la SEQ ID NO: 1. La secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido precursor de ActRIIB humano de SEQ ID NO: 1 se describe como SEQ ID NO: 4 (nucleótidos 164-1705 de la entrada de Genbank NM\_001616). La secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de ActRIIA humano soluble de SEQ ID NO: 2 se describe como SEQ ID NO: 5. Véase la Tabla 1 para una descripción de las secuencias.

En realizaciones específicas, los polipéptidos de ActRIIA usados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria son polipéptidos de ActRIIA solubles. Un dominio extracelular de una proteína ActRIIA puede unirse a activina y generalmente es soluble, y, por lo tanto, puede denominarse un polipéptido de ActRIIA soluble que se une a activina. Por lo tanto, tal y como se usa en la presente memoria, el término "polipéptido de ActRIIA soluble" generalmente se refiere a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ActRIIA, que incluye cualquier dominio extracelular natural de una proteína ActRIIA, así como cualquier variante de la misma (incluyendo mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas). Los polipéptidos de ActRIIA solubles pueden unirse a la activina; sin embargo, la proteína ActRIIA de tipo salvaje no exhibe una selectividad significativa en la unión a activina frente a GDF8/11. Las proteínas ActRIIA nativas o alteradas pueden recibir especificidad adicional para la activina al acoplarlas con un segundo agente de unión selectivo para la activina. Los ejemplos de polipéptidos de ActRIIA solubles que se

unen a activina incluyen los polipéptidos solubles ilustrados en las SEQ ID NOs: 2, 3, 7, 12 y 13. Otros ejemplos de polipéptidos de ActRIIA solubles que se unen a activina comprenden una secuencia señal además del dominio extracelular de una proteína ActRIIA, por ejemplo, la secuencia líder de melitina de abeja de miel (SEQ ID NO:8), el líder del activador de plasminógeno tisular (TPA) (SEQ ID NO:9) o el líder de ActRIIA nativo (SEQ ID NO:10). El polipéptido de ActRIIA-hFc ilustrado en la SEQ ID NO: 13 usa un líder de TPA.

En ciertas realizaciones, los inhibidores de ActRIIA usados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria comprenden un conjugado/proteína de fusión que comprende un dominio de unión a activina de ActRIIA unido a una porción Fc de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el dominio de unión a activina está unido a una porción Fc de un anticuerpo mediante un conector, *p.ej.*, un conector peptídico. Opcionalmente, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en residuos tales como Asp-265, lisina 322 y Asn-434. En ciertos casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (*p. ej.*, una mutación Asp-265) tiene una capacidad reducida para unirse al receptor Fcγ en relación con un dominio Fc de tipo salvaje. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (*p. ej.*, una mutación Asn-434) tiene una mayor capacidad para unirse al receptor Fc relacionado con la clase I del MHC (FcRN) en relación con un dominio Fc de tipo salvaje. Las proteínas de fusión ejemplares que comprenden un dominio extracelular soluble de ActRIIA fusionado con un dominio Fc se muestran en las SEQ ID NOs: 6, 7, 12 y 13.

En una realización específica, los inhibidores de ActRIIA usados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria comprenden el dominio extracelular de ActRIIA, o una porción del mismo, unido a una porción Fc de un anticuerpo, en donde dicho inhibidor de ActRIIA comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NOs: 6, 7, 12 y 13. En otra realización específica, los inhibidores de ActRIIA usados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria comprenden el dominio extracelular de ActRIIA, o una porción del mismo, unido a una porción Fc de un anticuerpo, en donde dicho inhibidor de ActRIIA comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticos a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NOs: 6, 7, 12 y 13.

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

En ciertas realizaciones, los inhibidores de ActRIIA usados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria comprenden un dominio extracelular de ActRIIA con una o más sustituciones de aminoácidos. En ciertas realizaciones, los inhibidores de ActRIIA usados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria comprenden una forma truncada de un dominio extracelular de ActRIIA que también porta una sustitución de aminoácidos.

En una realización específica, el inhibidor de ActRIIA que se usará en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria es una proteína de fusión entre el dominio extracelular del receptor ActRIIA humano y la porción Fc de IgG1. En otra realización específica, el inhibidor de ActRIIA que se usará en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria es una proteína de fusión entre un dominio extracelular truncado del receptor ActRIIA humano y la porción Fc de IgG1. En otra realización específica, el inhibidor de ActRIIA que se usará en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria es una proteína de fusión entre un dominio extracelular truncado del receptor ActRIIA humano y la porción Fc de IgG1, en donde el dominio extracelular truncado del receptor ActRIIA humano posee una o más sustituciones de aminoácidos.

Se pueden obtener fragmentos funcionalmente activos de polipéptidos de ActRIIA, por ejemplo, cribando polipéptidos producidos recombinantemente a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica un polipéptido de ActRIIA. Además, los fragmentos se pueden sintetizar químicamente usando técnicas conocidas en la técnica, tales como la química convencional de Merrifield en fase sólida f-Moc o t-Boc. Los fragmentos pueden producirse (de forma recombinante o por síntesis química) y ensayarse para identificar aquellos fragmentos de peptidilo que pueden funcionar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRIIA o de la señalización mediada por activina.

Además, se pueden obtener variantes funcionalmente activas de los polipéptidos de ActRIIA, por ejemplo, cribando bibliotecas de polipéptidos modificados producidos de forma recombinante a partir de los ácidos nucleicos mutagenizados correspondientes que codifican un polipéptido de ActRIIA. Las variantes pueden ser producidas y ensayadas para identificar aquellas que pueden funcionar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRIIA o de

la señalización mediada por activina. En ciertos aspectos, una variante funcional de los polipéptidos de ActRIIA comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NOs: 2 o 3. En ciertos casos, la variante funcional tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NOs: 2 o 3.

Se pueden generar variantes funcionales, por ejemplo, modificando la estructura de un polipéptido de ActRIIA para fines tales como aumentar la eficacia terapéutica o la estabilidad (p. ej., la vida útil *ex vivo* y la resistencia a la degradación proteolítica *in vivo*). Dichos polipéptidos de ActRIIA modificados, cuando se seleccionan para retener la unión a activina, pueden considerarse equivalentes funcionales de los polipéptidos de ActRIIA de origen natural. Los polipéptidos de ActRIIA modificados también se pueden producir, por ejemplo, mediante sustitución, delección o adición de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado (p. ej., mutaciones conservativas) no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Los reemplazos conservativos son aquellos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados respecto a sus cadenas laterales. Se puede determinar fácilmente si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de ActRIIA da como resultado un homólogo funcional evaluando la capacidad del polipéptido de ActRIIA variante para producir una respuesta en las células de una manera similar al polipéptido de ActRIIA de tipo salvaje.

En ciertas realizaciones, el inhibidor de ActRIIA que se usará en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria puede comprender un polipéptido de ActRIIA que tiene una o más mutaciones específicas que pueden alterar la glicosilación del polipéptido. Dichas mutaciones pueden introducir o eliminar uno o más sitios de glicosilación, tales como los sitios de glicosilación unidos a O o N. Los sitios de reconocimiento de glicosilación unidos a asparagina generalmente comprenden una secuencia de tripéptido, asparagina-X-treonina (o asparaginas-X-serina) (donde "X" es cualquier aminoácido) que es reconocido específicamente por las enzimas de glicosilación celulares apropiadas. La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del polipéptido de ActRIIA de tipo salvaje (para sitios de glicosilación unidos a O). Una variedad de sustituciones o delecciones de aminoácidos en una o ambas de las posiciones de aminoácidos primera o tercera de un sitio de reconocimiento de glicosilación (y/o delección de aminoácidos en la segunda posición) da como resultado la ausencia de glicosilación en la secuencia del tripéptido modificada. Otro medio para aumentar el número de restos de carbohidratos en un polipéptido de ActRIIA es mediante el acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido de ActRIIA. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el o los azúcares se pueden unir a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres, tales como los de cisteína; (d) grupos hidroxilo libres, tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina; (e) residuos aromáticos, tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de sep., 1987, y en Aplin y Wriston (1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.*, p. 259-306. La eliminación de uno o más restos de carbohidrato presentes en un polipéptido de ActRIIA puede realizarse químicamente y/o enzimáticamente. La desglicosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido de ActRIIA al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da lugar a la escisión de la mayor parte o de todos los azúcares excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras se deja la secuencia de aminoácidos intacta. La desglicosilación química se describe adicionalmente en Hakimuddin et al. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 y en Edge et al. (1981) *Anal. Biochem.* 118:131. La escisión enzimática de los restos de carbohidrato en polipéptidos de ActRIIA se puede lograr mediante el uso de una variedad de endo y exoglicosidasas como se describe en Thotakura et al. (1987) *Meth. Enzymol.* 138:350. La secuencia de un polipéptido de ActRIIA se puede ajustar, según sea apropiado, dependiendo del tipo de sistema de expresión utilizado, ya que las células de mamíferos, levaduras, insectos y plantas pueden introducir diferentes patrones de glicosilación que pueden verse afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas ActRIIA para uso en seres humanos se pueden expresar en una línea celular de mamíferos que proporciona una glicosilación adecuada, tal como las líneas celulares HEK293 o CHO, aunque otros sistemas de expresión, tales como otras líneas celulares de expresión de mamíferos, líneas celulares de levadura con enzimas de glicosilación preparadas por ingeniería y las células de insecto, se espera que también sean útiles.

En la presente memoria se proporcionan además métodos para generar mutantes, particularmente conjuntos de mutantes combinatorios de un polipéptido de ActRIIA, así como mutantes de truncamiento; las combinaciones de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificar secuencias variantes funcionales. El propósito de cribar dichas bibliotecas combinatorias puede ser generar, por ejemplo, variantes de polipéptidos de ActRIIA que pueden actuar como agonistas o antagonistas, o alternativamente, que poseen actividades novedosas en conjunto. A continuación, se proporciona una variedad de ensayos de cribado, y dichos ensayos pueden usarse para evaluar las variantes. Por ejemplo, una variante del polipéptido de ActRIIA puede cribarse para determinar su capacidad para unirse a un ligando de ActRIIA, para evitar la unión de un ligando de ActRIIA a un polipéptido de ActRIIA o para interferir con la señalización causada por un ligando de ActRIIA.

Se pueden generar variantes derivadas de forma combinatoria que tienen una potencia selectiva o generalmente aumentada con respecto a un polipéptido de ActRIIA natural. Del mismo modo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tienen semividas intracelulares dramáticamente diferentes que el correspondiente polipéptido de ActRIIA de tipo salvaje. Por ejemplo, la proteína alterada puede volverse más estable o menos estable a la degradación

proteolítica u otros procesos celulares que provocan la destrucción de, o la inactivación de otra forma de, un polipéptido de ActRIIA nativo. Dichas variantes, y los genes que las codifican, pueden utilizarse para alterar los niveles de los polipéptidos de ActRIIA modulando la semivida de los polipéptidos de ActRIIA. Por ejemplo, una semivida corta puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y puede permitir un control más estricto de los niveles de polipéptidos de ActRIIA recombinantes en el paciente. En una proteína de fusión Fc, se pueden hacer mutaciones en el conector (si lo hay) y/o en la porción Fc para alterar la semivida de la proteína.

Se puede producir una biblioteca combinatoria por medio de una biblioteca degenerada de genes que codifican una biblioteca de polipéptidos que cada uno incluye al menos una porción de secuencias potenciales de polipéptidos de ActRIIA. Por ejemplo, una mezcla de oligonucleótidos sintéticos se puede ligar enzimáticamente en secuencias de genes de manera que el conjunto degenerado de secuencias potenciales de nucleótidos del polipéptido de ActRIIA se puedan expresar como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (p. ej., para la presentación en fagos).

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

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

En la técnica se conoce una amplia gama de técnicas para cribar productos génicos de bibliotecas combinatorias hechas por mutaciones puntuales y truncamientos, y, este caso, para cribar bibliotecas de ADNc para detectar productos génicos que tienen una determinada propiedad. Dichas técnicas serán generalmente adaptables para el cribado rápido de las bibliotecas de genes generadas por la mutagénesis combinatoria de los polipéptidos de ActRIIA. Las técnicas más ampliamente utilizadas para el cribado de bibliotecas génicas grandes típicamente comprenden clonar la biblioteca génica en vectores de expresión replicables, transformar células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante y expresar los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento relativamente fácil del vector que codifica el gen cuyo producto fue detectado. Los ensayos preferidos incluyen ensayos de unión a activina y ensayos de señalización celular mediados por activina.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de ActRIIA usados en los inhibidores de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria pueden comprender además modificaciones post-traduccionales además de cualquiera que esté naturalmente presente en los polipéptidos de ActRIIA. Dichas modificaciones pueden incluir, pero no están limitadas a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos de ActRIIA modificados pueden contener elementos que no son aminoácidos, tales como polietilenglicoles, lípidos, poli o monosacáridos y fosfatos. Los efectos de dichos elementos que no son aminoácidos sobre la funcionalidad de un polipéptido de ActRIIA pueden ensayarse mediante cualquier método conocido por el experto en la técnica. Cuando se produce un polipéptido de ActRIIA en las células al escindir una forma naciente del polipéptido de ActRIIA, el procesamiento post-traducciona también puede ser importante para el correcto plegamiento y/o función de la proteína. Las diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, W138, NIH-3T3 o HEK293) tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades post-traduccionales y pueden elegirse para garantizar la correcta modificación y procesamiento de los polipéptidos de ActRIIA.

En ciertos aspectos, las variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos de ActRIIA utilizadas en los inhibidores de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una porción de los polipéptidos de ActRIIA y uno o más dominios de fusión. Los ejemplos bien conocidos de dichos dominios de fusión incluyen, pero no están limitados a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tiorredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), proteína de unión a maltosa (MBP), o albúmina sérica humana. Se puede seleccionar un dominio de fusión para conferir una

propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión por cromatografía de afinidad. Para fines de purificación por afinidad, se utilizan matrices relevantes para la cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas con glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Muchas de esas matrices están disponibles en forma de "kit", tal como el sistema de purificación Pharmacia GST y el sistema QIAexpress.TM. (Qiagen) útil con compañeros de fusión (HIS<sub>6</sub>). Como otro ejemplo, se puede seleccionar un dominio de fusión para facilitar la detección de los polipéptidos de ActRIIA. Los ejemplos de dichos dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (p. ej., GFP), así como las "etiquetas de epítipo", que generalmente son secuencias peptídicas cortas para las que está disponible un anticuerpo específico. Las etiquetas de epítipo bien conocidas para las cuales están fácilmente disponibles anticuerpos monoclonales específicos incluyen FLAG, hemaglutinina del virus de la influenza (HA) y etiquetas c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de proteasa, tal como el Factor Xa o la Trombina, que permite que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y, por lo tanto, libere las proteínas recombinantes de las mismas. Las proteínas liberadas pueden aislarse entonces del dominio de fusión mediante separación cromatográfica posterior. En ciertas realizaciones preferidas, un polipéptido de ActRIIA se fusiona con un dominio que estabiliza el polipéptido de ActRIIA in vivo (un dominio "estabilizador"). Por "estabilizar" se entiende cualquier cosa que aumente la semivida en el suero, independientemente de si esto se debe a una disminución de la destrucción, disminución del aclaramiento por el riñón u otro efecto farmacocinético. Se sabe que las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina confieren propiedades farmacocinéticas deseables a una amplia gama de proteínas. Asimismo, las fusiones a la albúmina sérica humana pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que pueden seleccionarse incluyen dominios multimerizantes (p. ej., dimerizantes, tetramerizantes) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, tal como la estimulación adicional del crecimiento óseo o el crecimiento muscular, según se desee).

Se entiende que diferentes elementos de las proteínas de fusión se pueden disponer de cualquier manera que sea consistente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido de ActRIIA se puede colocar en C-terminal respecto a un dominio heterólogo, o, alternativamente, un dominio heterólogo se puede colocar en C-terminal respecto a un polipéptido de ActRIIA. El dominio del polipéptido de ActRIIA y el dominio heterólogo no necesitan ser adyacentes en una proteína de fusión, y se pueden incluir dominios o secuencias de aminoácidos adicionales en C- o N-terminal respecto a cualquier dominio o entre los dominios.

En ciertas realizaciones, los polipéptidos de ActRIIA utilizados en los inhibidores de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria pueden contener una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos de ActRIIA. Por ejemplo, dichas modificaciones pueden aumentar la semivida in vitro de los polipéptidos de ActRIIA, aumentar la semivida circulatoria de los polipéptidos de ActRIIA o reducir la degradación proteolítica de los polipéptidos de ActRIIA. Dichas modificaciones estabilizadoras pueden incluir, pero no están limitadas a, proteínas de fusión (que incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de ActRIIA y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glicosilación (que incluye, por ejemplo, la adición de un sitio de glicosilación a un polipéptido de ActRIIA), y modificaciones del resto de carbohidrato (que incluyen, por ejemplo, la eliminación de restos de carbohidrato de un polipéptido de ActRIIA). En el caso de las proteínas de fusión, un polipéptido de ActRIIA se fusiona a un dominio estabilizador tal como una molécula de IgG (p. ej., un dominio Fc). Tal y como se usa en la presente memoria, el término "dominio estabilizador" no solo se refiere a un dominio de fusión (p. ej., Fc) como en el caso de las proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteicas tales como un resto de carbohidrato o un polímero no proteico, tal como polietilenglicol.

En ciertas realizaciones, se pueden usar formas aisladas y/o purificadas de polipéptidos de ActRIIA, que se aíslan de otras proteínas, o de otro modo sustancialmente libres de ellas, con los métodos y composiciones descritos en la presente memoria. Los polipéptidos de ActRIIA generalmente se pueden producir por expresión a partir de ácidos nucleicos recombinantes.

En ciertos aspectos, los polipéptidos de ActRIIA usados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria, se generan usando ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican cualquiera de los polipéptidos de ActRIIA (p. ej., polipéptidos de ActRIIA solubles), incluyendo fragmentos, variantes funcionales y proteínas de fusión descritas en la presente memoria. Por ejemplo, la SEQ ID NO:4 codifica el polipéptido precursor ActRIIA humano natural, mientras que la SEQ ID NO:5 codifica el dominio extracelular procesado de ActRIIA. Dichos ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Dichos ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Estos ácidos nucleicos pueden usarse, por ejemplo, en métodos para preparar polipéptidos de ActRIIA o como agentes terapéuticos directos (p. ej., en una estrategia de terapia génica).

En ciertos aspectos, los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de ActRIIA pueden incluir ácidos nucleicos que son variantes de la SEQ ID NO:4 o 5. Las secuencias de nucleótidos variantes incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos, tales como variantes alélicas.

En ciertos aspectos, las secuencias de ácido nucleico aisladas o recombinantes que codifican los polipéptidos de ActRIIA pueden ser al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a la SEQ ID NO:4 o 5. Un experto en la técnica apreciará que las secuencias de ácido nucleico complementarias a la SEQ ID NO:4 o 5, y las variantes de la SEQ ID NO:4 o 5 pueden usarse en la producción de polipéptidos de ActRIIA adecuados para uso en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria. En realizaciones adicionales, dichas secuencias de

ácido nucleico pueden ser aisladas, recombinantes y/o fusionadas a una secuencia de nucleótidos heteróloga, o ser de una biblioteca de ADN.

En otras realizaciones, los ácidos nucleicos utilizados en la producción de polipéptidos de ActRIIA adecuados para uso en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria pueden incluir secuencias de nucleótidos que hibridan en condiciones altamente astringentes con la secuencia de nucleótidos designada en la SEQ ID NO:4 o 5, secuencia de complemento de la SEQ ID NO:4 o 5, o fragmentos de los mismos. Un experto en la técnica entenderá que las condiciones de astringencia apropiadas que promueven la hibridación de ADN pueden variarse. Por ejemplo, se puede realizar la hibridación a 6,0 veces cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 grados Celsius, seguido de un lavado de 2,0 veces SSC a 50 grados Celsius. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado se puede seleccionar desde una baja astringencia de aproximadamente 2,0 veces SSC a 50 grados Celsius hasta una alta astringencia de aproximadamente 0,2 veces SSC a 50 grados Celsius. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentarse desde condiciones de baja astringencia a temperatura ambiente, aproximadamente 22 grados Celsius, hasta condiciones de alta astringencia a aproximadamente 65 grados Celsius. Tanto la temperatura como la sal pueden variarse, o la temperatura o la concentración de sal pueden mantenerse constantes mientras se cambia la otra variable. En una realización, los ácidos nucleicos que hibridan en condiciones de baja astringencia de 6 veces SSC a temperatura ambiente seguido de un lavado a 2 veces SSC a temperatura ambiente pueden usarse con los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Los ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos como se muestra en las SEQ ID NOs:4 o 5 debido a la degeneración en el código genético también se pueden usar en la producción de polipéptidos de ActRIIA adecuados para uso en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria. Por ejemplo, varios aminoácidos están designados por más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos para histidina) pueden dar lugar a mutaciones "silenciosas" que no afectan la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que los polimorfismos de la secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas en cuestión existan entre las células de mamíferos. Un experto en la técnica apreciará que estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente el 3-5 % de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína particular pueden existir entre individuos de una especie dada debido a la variación alélica natural.

En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos recombinantes pueden unirse operativamente a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras en una construcción de expresión. Las secuencias de nucleótidos reguladoras generalmente serán apropiadas para la célula huésped utilizada para la expresión. Se conocen en la técnica numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas para una variedad de células huésped. Típicamente, dicha una o más secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, pero no están limitadas a, secuencias promotoras, secuencias líder o señal, sitios de unión ribosomal, secuencias de inicio y terminación transcripcionales, secuencias de inicio y terminación traducionales, y secuencias potenciadoras o activadoras. En la presente memoria se contemplan los promotores constitutivos o inducibles como se conocen en la técnica. Los promotores pueden ser promotores naturales o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Una construcción de expresión puede estar presente en una célula en un episoma, tal como un plásmido, o la construcción de expresión puede insertarse en un cromosoma. En una realización preferida, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de las células huésped transformadas. Los genes marcadores seleccionables son muy conocidos en la técnica y variarán dependiendo de la célula huésped utilizada.

En ciertos aspectos, el ácido nucleico utilizado en la producción de polipéptidos de ActRIIA adecuados para uso en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria puede proporcionarse en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de ActRIIA y unido operativamente al menos a una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras son reconocidas en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido de ActRIIA. Por consiguiente, el término secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores 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, Calif. (1990). Por ejemplo, cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando están unidas operativamente a ella puede usarse en estos vectores para expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido de ActRIIA. Dichas secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío de SV40, el promotor tet, el promotor temprano inmediato de adenovirus o citomegalovirus, los promotores RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión está dirigida por la ARN polimerasa T7, el operador principal y las regiones promotoras del fago lambda, las regiones de control para la proteína de la cubierta fd, el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida, p. ej., Pho5, los promotores de los factores de apareamiento alfa de levadura, el promotor poliedro del sistema de baculovirus y otras secuencias que se sabe que controlan la expresión de genes de células procariontas o eucariotas o sus virus, y varias 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 a transformar y/o el tipo de proteína que se desea expresar. Además, también se debe considerar el número de copias del vector, la capacidad de controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tales como los marcadores de antibióticos.



Un ácido nucleico recombinante utilizado en la producción de polipéptidos de ActRIIA adecuados para uso en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria puede producirse ligando el gen clonado, o una porción del mismo, en un vector adecuado para la expresión en células procariontas, eucariotas (levadura, aviar, insecto o mamífero), o ambas. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido de ActRIIA recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para la expresión en células procariontas, tales como *E. coli*.

Algunos vectores de expresión de mamíferos contienen tanto secuencias procariontas para facilitar la propagación del vector en bacterias, como una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan en células eucariotas. Los vectores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamíferos adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y la selección por resistencia a fármacos tanto en células procariontas como eucariotas. Alternativamente, los derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino (BPV-1) o el virus de Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) pueden usarse para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Los ejemplos de otros sistemas de expresión virales (incluidos los retrovirales) se pueden encontrar a continuación en la descripción de los sistemas de administración de terapia génica. Los diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos huésped son bien conocidos en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariontas como eucariotas, así como para procedimientos recombinantes generales, véase *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3ª Ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). En algunos casos, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Los ejemplos de dichos sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tales como pAcUW1) y vectores derivados de pBlueBac (tales como el pBlueBac III que contiene .beta.-gal).

Los vectores pueden diseñarse para la producción de los polipéptidos de ActRIIA objeto en células CHO, tales como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wis.). Como será evidente, las construcciones de genes objeto pueden usarse para causar la expresión de los polipéptidos de ActRIIA objeto en células propagadas en cultivo, p. ej., para producir proteínas, incluyendo proteínas de fusión o proteínas variantes, para la purificación.

Las células huésped transfectadas con un gen recombinante incluyendo una secuencia codificadora (p. ej., la SEQ ID NO: 4 o 5) para uno o más de los polipéptidos de ActRIIA objeto pueden usarse en la producción de polipéptidos de ActRIIA adecuados para uso en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria. La célula huésped puede ser cualquier célula procarionta o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido de ActRIIA proporcionado en la presente memoria puede expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insectos (p. ej., usando un sistema de expresión de baculovirus), levadura o células de mamífero. Los expertos en la técnica conocen otras células huésped adecuadas.

Por consiguiente, en la presente memoria se proporcionan métodos para producir los polipéptidos de ActRIIA. Por ejemplo, una célula huésped transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido de ActRIIA puede cultivarse en condiciones apropiadas para permitir que ocurra la expresión del polipéptido de ActRIIA. El polipéptido de ActRIIA puede secretarse y aislarse de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido de ActRIIA. Alternativamente, el polipéptido de ActRIIA puede retenerse citoplasmáticamente o en una fracción de membrana y las células se pueden recoger, lisar y aislar la proteína. Un cultivo celular incluye células huésped, medios y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular son bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos de ActRIIA objeto pueden aislarse del medio de cultivo celular, células huésped, o ambos, usando técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis, purificación por inmunoafinidad con anticuerpos específicos para epítopos particulares de los polipéptidos de ActRIIA y la purificación por afinidad con un agente que se une a un dominio fusionado con el polipéptido de ActRIIA (p. ej., se puede usar una columna de proteína A para purificar una fusión ActRIIA-Fc). En una realización preferida, el polipéptido de ActRIIA es una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación. En una realización, la purificación se logra mediante una serie de etapas de cromatografía en columna, incluyendo, por ejemplo, tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de sefarosa Q, cromatografía de fenilsefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación podría completarse con filtración viral e intercambio de tampón. Como se demuestra en la presente memoria, la proteína ActRIIA-hFc se purificó con una pureza de > 98 % según lo determinado por cromatografía de exclusión por tamaño y > 95 % según lo determinado por SDS PAGE. Este nivel de pureza fue suficiente para lograr efectos deseables sobre el hueso en ratones y un perfil de seguridad aceptable en ratones, ratas y primates no humanos.

En otra realización, un gen de fusión que codifica una secuencia líder de purificación, tal como una secuencia de sitio de escisión de poli-(His)/enteroquinasa en el extremo N de la porción deseada de un polipéptido de ActRIIA recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada por cromatografía de afinidad usando una resina metálica de Ni<sup>2+</sup>. La secuencia líder de purificación se puede eliminar posteriormente mediante tratamiento

con enteroquinasa para proporcionar el polipéptido de ActRIIA purificado (p. ej., véase Hochuli et al., (1987) J. Chromatography 411:177; y Janknecht et al., PNAS USA 88:8972).

Las técnicas para preparar genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, la unión de varios fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias de polipéptidos se realiza según técnicas convencionales, empleando extremos con terminales romos o terminales escalonados para la ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar los extremos apropiados, relleno de extremos cohesivos según corresponda, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables y ligación enzimática. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes puede llevarse a cabo utilizando cebadores de anclaje que dan lugar a protuberancias complementarias entre dos fragmentos de genes consecutivos que posteriormente pueden hibridarse para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons:1992).

La proteína de fusión ActRIIA-Fc se puede expresar en células CHO-DUKX B1 1 transfectadas de forma estable a partir de un vector pAID4 (ori/potenciador de SV40, promotor de CMV), usando una secuencia líder de plasminógeno tisular de la SEQ ID NO: 9. La porción Fc es una secuencia Fc de IgG1 humana, como se muestra en la SEQ ID NO: 7. En ciertas realizaciones, tras la expresión, la proteína contenida tiene, de promedio, entre aproximadamente 1,5 y 2,5 moles de ácido siálico por molécula de proteína de fusión ActRIIA-Fc.

En ciertas realizaciones, la larga semivida en suero de una fusión ActRIIA-Fc puede ser de 25-32 días en pacientes humanos. Además, el material expresado en células CHO puede tener una mayor afinidad por el ligando activina B que la reportada para una proteína de fusión ActRIIA-hFc expresada en células 293 humanas (del Re et al., J Biol Chem. 2004 17 dic;279(51):53126-35). Además, sin estar limitado por la teoría, el uso de la secuencia líder de TPA proporcionó una mayor producción que otras secuencias líderes y, a diferencia de ActRIIA-Fc expresada con un líder nativo, puede proporcionar una secuencia N-terminal altamente pura. El uso de la secuencia líder nativa puede dar como resultado dos especies principales de ActRIIA-Fc, cada una con una secuencia N-terminal diferente.

### 5.5.2 Inhibidores de ActRIIB

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "ActRIIB" se refiere a una familia de proteínas del receptor de activina tipo IIB (ActRIIB) de cualquier especie y variantes derivadas de dichas proteínas ActRIIB por mutagénesis u otra modificación. La referencia a ActRIIB en la presente memoria se entiende como una referencia a una cualquiera de las formas del receptor identificadas actualmente. Los miembros de la familia ActRIIB son generalmente proteínas transmembrana, compuestas por un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteínas, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad de serina/treonina quinasa predicha.

Los inhibidores de ActRIIB que se usarán en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria incluyen, sin limitación, polipéptidos de ActRIIB solubles que se unen a activina; anticuerpos que se unen a activina (particularmente las subunidades de activina A o B, también denominadas  $\beta_A$  o  $\beta_B$ ) e interrumpen la unión de ActRIIB; anticuerpos que se unen a ActRIIB e interrumpen la unión de activina; proteínas distintas de anticuerpos seleccionadas para la unión de activina o ActRIIB; y péptidos aleatorios seleccionados para la unión de activina o ActRIIB, que pueden conjugarse con un dominio Fc.

En ciertos aspectos, dos o más proteínas diferentes (u otros restos) con actividad de unión a activina o ActRIIB, especialmente aglutinantes de activina que bloquean los sitios de unión de tipo I (p. ej., un receptor soluble de activina de tipo I) y tipo II (p. ej., un receptor soluble de activina de tipo II), respectivamente, se pueden unir entre sí para crear una molécula de unión bifuncional o multifuncional que inhibe ActRIIB y, por lo tanto, se puede usar en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria. En ciertos aspectos, los antagonistas del eje de señalización de Activina-ActRIIB que inhiben ActRIIB incluyen aptámeros de ácido nucleico, se usan moléculas pequeñas y otros agentes en las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria incluyen.

#### (a) Inhibidores de ActRIIB que comprenden polipéptidos de ActRIIB

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "polipéptido de ActRIIB" se refiere a polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido natural de un miembro de la familia ActRIIB, así como cualquier variante del mismo (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que retienen una actividad útil. Por ejemplo, los polipéptidos de ActRIIB incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier receptor ActRIIB conocido que tenga una secuencia al menos aproximadamente un 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido de ActRIIB, y opcionalmente al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad. Por ejemplo, un polipéptido de ActRIIB puede unirse a e inhibir la función de una proteína ActRIIB y/o activina. Un ejemplo de un polipéptido de ActRIIB incluye el polipéptido precursor ActRIIB humano (SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28). Con respecto al polipéptido precursor de ActRIIB cuya secuencia de aminoácidos se representa como SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 (es decir, el polipéptido precursor de ActRIIB humano), el péptido señal del polipéptido precursor ActRIIB está localizado en los aminoácidos 1 a 18; el dominio extracelular está localizado en los aminoácidos 19 a 134 y los sitios potenciales de glicosilación unidos a N están localizados en las posiciones de aminoácidos 42 y 65. La secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido precursor ActRIIB humano de SEQ ID NO: 16 se describe como SEQ ID NO:

19 (la SEQ ID NO: 19 proporciona una alanina en el codón correspondiente a la posición de aminoácido 64, pero podría modificarse fácilmente por un experto en la técnica usando métodos conocidos en la técnica para proporcionar una arginina en el codón correspondiente a la posición de aminoácido 64 en su lugar). Véase la Tabla 1 para una descripción de las secuencias.

5 La numeración de los aminoácidos para todos los polipéptidos relacionados con ActRIIB descritos en la presente memoria se basa en la numeración de aminoácidos para SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 28 (que solo difieren en el aminoácido expresado en la posición 64), a menos que se designe específicamente otra cosa. Por ejemplo, si se describe que un polipéptido de ActRIIB tiene una sustitución/mutación en la posición de aminoácido 79, entonces debe entenderse que la posición 79 se refiere al aminoácido 79<sup>o</sup> en la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28, del cual se deriva el polipéptido de ActRIIB. Del mismo modo, si se describe que un polipéptido de ActRIIB tiene una alanina o una arginina en la posición de aminoácido 64, entonces debe entenderse que la posición 64 se refiere al aminoácido 64<sup>o</sup> en la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28, del cual se deriva el polipéptido de ActRIIB.

15 En ciertas realizaciones, los inhibidores de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria comprenden polipéptidos que comprenden un dominio de unión a activina de ActRIIB. En algunas realizaciones, los dominios de unión a activina de ActRIIB comprenden el dominio extracelular de ActRIIB, o una porción del mismo. En realizaciones específicas, el dominio extracelular o porción del mismo de ActRIIB es soluble. Las formas modificadas ilustrativas de polipéptidos de ActRIIB se describen en la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. Nos. 20090005308 y 20100068215.

20 En realizaciones específicas, los polipéptidos de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria son polipéptidos de ActRIIB solubles. El término "polipéptido de ActRIIB soluble" generalmente se refiere a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ActRIIB, que incluye cualquier dominio extracelular natural de una proteína ActRIIB, así como cualquier variante de la misma (incluyendo mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas). Los polipéptidos de ActRIIB solubles pueden unirse a la activina; sin embargo, la proteína ActRIIB de tipo salvaje no exhibe una selectividad significativa en la unión a activina frente a GDF8/11. En ciertas realizaciones, se pueden usar formas alteradas de ActRIIB con diferentes propiedades de unión en los métodos proporcionados en la presente memoria. Dichas formas alteradas se describen, *p.ej.*, en la publicación de solicitud de patente internacional Nos. WO 2006/012627 y WO 2010/019261. Las proteínas ActRIIB nativas o alteradas pueden recibir especificidad adicional para la activina al acoplarlas con un segundo agente de unión selectivo para la activina. Los polipéptidos de ActRIIB solubles ejemplares incluyen el dominio extracelular de un polipéptido de ActRIIB humano (*p. ej.*, las SEQ ID NOS: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42, y 43).

Una proteína de fusión Fc que tiene la secuencia extracelular de ActRIIB descrita por Hilden et al. (Blood, 1994, 83(8):2163-70), que tiene una alanina en la posición correspondiente al aminoácido 64 de la secuencia de aminoácidos del precursor de ActRIIB, es decir, la SEQ ID NO:16 (en la presente memoria denominado "A64"), se ha demostrado que posee una afinidad relativamente baja por la activina y el GDF-11. Por el contrario, una proteína de fusión Fc con una arginina en la posición 64 de la secuencia de aminoácidos del precursor de ActRIIB (denominada en la presente memoria "R64") tiene una afinidad por la activina y el GDF-11 en el rango nanomolar bajo a picomolar alto (véase *p. ej.*, Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. No. 20100068215). Una secuencia de aminoácidos del precursor de ActRIIB con una arginina en la posición 64 se presenta en la SEQ ID NO: 28. Como tales, en ciertas realizaciones, los polipéptidos de ActRIIB usados según las composiciones y métodos descritos en la presente memoria pueden comprender bien (i) una alanina en la posición correspondiente al aminoácido 64 de la secuencia de aminoácidos del precursor de ActRIIB, es decir, SEQ ID NO: 16; o (ii) una arginina en la posición 64 de la secuencia de aminoácidos del precursor de ActRIIB, es decir, SEQ ID NO:28. En otras realizaciones, los polipéptidos de ActRIIB usados según las composiciones y métodos descritos en la presente memoria pueden comprender un aminoácido que no es alanina o arginina en la posición correspondiente al aminoácido 64 de la secuencia de aminoácidos del precursor de ActRIIB, es decir, SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28.

Se ha mostrado que una delección del nudo de prolina en el extremo C del dominio extracelular de ActRIIB reduce la afinidad del receptor por la activina (véase, *p. ej.*, Attisano et al., Cell, 1992, 68(1):97-108). Una proteína de fusión ActRIIB-Fc que contiene los aminoácidos 20-119 de la SEQ ID NO: 28 (es decir, SEQ ID NO: 32), "ActRIIB(20-119) - Fc" tiene una unión reducida a GDF-11 y activina en relación con una proteína de fusión ActRIIB-Fc que contiene los aminoácidos 20-134 de la SEQ ID NO: 28 (es decir, SEQ ID NO: 31), "ActRIIB(20-134) -Fc", que incluye la región del nudo prolina y el dominio completo de la yuxtamembrana. Sin embargo, una proteína de fusión ActRIIB-Fc que contiene los aminoácidos 20-129 de la SEQ ID NO: 28, "ActRIIB(20-129)-Fc" retiene una actividad similar pero algo reducida en relación con el dominio extracelular no truncado de ActRIIB, a pesar de que la región del nudo prolina está interrumpida. Por lo tanto, los polipéptidos de ActRIIB que comprenden dominios extracelulares que se detienen en los aminoácidos 134, 133, 132, 131, 130 y 129 de la SEQ ID NO: 28 (o SEQ ID NO: 16) se espera que todos sean activos, pero las construcciones que se detienen en el aminoácido 134 o 133 pueden ser las más activas. De manera similar, no se espera que las mutaciones en ninguno de los residuos 129-134 alteren la afinidad de unión al ligando por márgenes grandes, como lo indica el hecho de que las mutaciones de P129 y P130 de la SEQ ID NO: 28 no disminuyen sustancialmente la unión del ligando. Por lo tanto, los polipéptidos de ActRIIB utilizados según los métodos y composiciones descritos en la presente memoria pueden terminar tan pronto como en el aminoácido 109 (es decir, la cisteína final) de la SEQ ID NO: 28 (o SEQ ID NO: 16), sin embargo, las formas que terminan en o entre las

posiciones de aminoácidos 109 y 119 de la SEQ ID NO: 28 (o SEQ ID NO: 16) se espera que tengan una capacidad de unión a ligando reducida.

El aminoácido 29 de la SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 28 representa la cisteína inicial en la secuencia del precursor de ActRIIB. Se espera que un polipéptido de ActRIIB que comienza en el aminoácido 29 del extremo N de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28, o antes de estas posiciones de aminoácidos, retendrá la actividad de unión del ligando. Una mutación de alanina a asparagina en la posición 24 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 introduce una secuencia de glicosilación ligada a N sin afectar sustancialmente la unión del ligando. Esto confirma que las mutaciones en la región entre el péptido de escisión señal y la región reticulada por cisteína, correspondiente a los aminoácidos 20-29 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28, se toleran bien. En particular, los polipéptidos de ActRIIB que comienzan en las posiciones de aminoácidos 20, 21, 22, 23 y 24 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 retendrán la actividad, y los polipéptidos de ActRIIB que comienzan en las posiciones de aminoácidos 25, 26, 27, 28 y 29 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 también se espera que retengan la actividad. Un polipéptido de ActRIIB que comienza en la posición de aminoácido 22, 23, 24 o 25 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 tendrá la mayor actividad.

En conjunto, las porciones activas (es decir, polipéptidos de ActRIIB) de la proteína precursora de ActRIIB (es decir, la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28) que se utilizarán según los métodos y composiciones descritos en la presente memoria comprenderán generalmente los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28, y dichos polipéptidos de ActRIIB pueden, por ejemplo, comenzar en un residuo correspondiente a uno cualquiera de los aminoácidos 19-29 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y terminar en una posición correspondiente a uno cualquiera de los aminoácidos 109-134 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28. Los ejemplos específicos de polipéptidos de ActRIIB englobados en la presente memoria incluyen aquellos que comienzan en una posición de aminoácidos del 19-29, 20-29 o 21-29 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y terminan en una posición de aminoácidos 119-134, 119-133 o 129-134, 129-133 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28. Otros ejemplos específicos de polipéptidos de ActRIIB englobados en la presente memoria incluyen aquellos que comienzan en una posición de aminoácidos de 20-24 (o 21-24, o 22-25) de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y terminan en una posición de aminoácidos de 109-134 (o 109-133), 119-134 (o 119-133) o 129-134 (o 129-133) de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28. También se contemplan los polipéptidos de ActRIIB variantes que se encuentran dentro de estos intervalos, particularmente aquellos que tienen al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la porción correspondiente de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28.

En ciertas realizaciones, los inhibidores de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria comprenden una forma truncada de un dominio extracelular de ActRIIB. El truncamiento puede estar en el extremo carboxi y/o en el extremo amino del polipéptido de ActRIIB. En ciertas realizaciones, el truncamiento puede tener una longitud de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 aminoácidos en relación con el dominio extracelular del polipéptido de ActRIIB maduro. En ciertas realizaciones, el truncamiento puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 aminoácidos N-terminales del dominio extracelular del polipéptido de ActRIIB maduro. En ciertas realizaciones, el truncamiento puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 aminoácidos C-terminales del dominio extracelular del polipéptido de ActRIIB maduro. Por ejemplo, las formas truncadas de ActRIIB incluyen polipéptidos con aminoácidos 20-119; 20-128; 20-129; 20-130; 20-131; 20-132; 20-133; 20-134; 20-131; 21-131; 22-131; 23-131; 24-131; y 25-131, en donde las posiciones de aminoácidos se refieren a las posiciones de aminoácidos en la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28.

Las formas truncadas ejemplares adicionales de ActRIIB incluyen (i) polipéptidos que comienzan en aminoácidos en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 (opcionalmente comienzan en 22-25 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28) y que terminan en cualquiera de los aminoácidos 109-134 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28; (ii) polipéptidos que comienzan en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 (opcionalmente comienzan en 22-25 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28) y terminan en cualquiera de los aminoácidos 109-133 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28; (iii) polipéptidos que comienzan en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 (opcionalmente comienzan en 22-25 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28) y terminan en cualquiera de los aminoácidos 109-133 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28; (iv) polipéptidos que comienzan en cualquiera de los aminoácidos 21-24 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y terminan en cualquiera de los aminoácidos 109-134 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28; (v) polipéptidos que comienzan en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y terminan en cualquiera de los aminoácidos 118-133 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28; (vi) polipéptidos que comienzan en cualquiera de los aminoácidos 21-24 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y terminan en cualquiera de los aminoácidos 118-134 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28; (vii) polipéptidos que comienzan en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y terminan en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28; (viii) polipéptidos que comienzan en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y terminan en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28; (ix) polipéptidos que comienzan en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y terminan en cualquiera de los aminoácidos 118-134 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28; (x) polipéptidos que comienzan en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y terminan en cualquiera de los aminoácidos 118-133 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28; (xi) polipéptidos que comienzan en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y terminan en cualquiera de los aminoácidos 128-134 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28; y (xii) polipéptidos que comienzan en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28.

NO: 28 y terminan en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28. En un ejemplo específico, un polipéptido de ActRIIB comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que comienza en la posición de aminoácido 25 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y termina en la posición de aminoácido 131 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28. En otro ejemplo específico, un polipéptido de ActRIIB consiste en, o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42, o 43.

Cualquiera de los polipéptidos de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria puede producirse como un homodímero. Cualquiera de los polipéptidos de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria puede formularse como una proteína de fusión que tiene una porción heteróloga que comprende una región constante de una cadena pesada de IgG, tal como un dominio Fc. Cualquiera de los polipéptidos de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria puede comprender un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28, opcionalmente en combinación con una o más sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos adicionales, en relación con la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28.

En realizaciones específicas, los inhibidores de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria comprenden un dominio extracelular de ActRIIB con una o más sustituciones/mutaciones de aminoácidos. Dicha sustitución/mutación de aminoácidos puede ser, por ejemplo, un intercambio de la leucina en la posición de aminoácido 79 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 a un aminoácido ácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico. Por ejemplo, la posición L79 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 puede alterarse en polipéptidos del dominio extracelular de ActRIIB para conferir propiedades de unión a activina-miostatina (GDF-11) alteradas. Las mutaciones L79A y L79P reducen la unión a GDF-11 en mayor medida que la unión a activina. Las mutaciones L79E y L79D retienen la unión a GDF-11, mientras que demuestran una unión a activina muy reducida.

En ciertas realizaciones, los inhibidores de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria comprenden una forma truncada de un dominio extracelular de ActRIIB que también porta una sustitución de aminoácidos, p. ej., un intercambio de la leucina en la posición de aminoácido 79 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 a un aminoácido ácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico. En una realización específica, la forma truncada de un dominio extracelular del polipéptido de ActRIIB que también porta una sustitución de aminoácidos usada en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria es la SEQ ID NO: 23. Las formas de ActRIIB que se truncan y/o portan una o más sustituciones de aminoácidos se pueden unir a un dominio Fc de un anticuerpo como se discutió anteriormente.

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

Además, se pueden obtener variantes funcionalmente activas de los polipéptidos de ActRIIB, por ejemplo, cribando bibliotecas de polipéptidos modificados producidos de forma recombinante a partir de los ácidos nucleicos mutagenizados correspondientes que codifican un polipéptido de ActRIIB. Las variantes pueden ser producidas y ensayadas para identificar aquellas que pueden funcionar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRIIB o de la señalización mediada por activina. En ciertos aspectos, una variante funcional de los polipéptidos de ActRIIB comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42, y 43. En ciertos aspectos, la variante funcional tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42, y 43.

Se pueden generar variantes funcionales, por ejemplo, modificando la estructura de un polipéptido de ActRIIB para fines tales como aumentar la eficacia terapéutica o la estabilidad (p. ej., la vida útil ex vivo y la resistencia a la degradación proteolítica in vivo). Dichos polipéptidos de ActRIIB modificados cuando se seleccionan para retener la unión a activina, se consideran equivalentes funcionales de los polipéptidos de ActRIIB de origen natural. Los polipéptidos de ActRIIB modificados también se pueden producir, por ejemplo, mediante sustitución, deleción o adición de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado (p. ej., mutaciones conservativas) no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Los reemplazos conservativos son aquellos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados respecto a sus cadenas laterales. Se puede determinar fácilmente si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de ActRIIB da como resultado un homólogo funcional evaluando la capacidad del polipéptido de ActRIIB variante para producir una respuesta en las células de una manera similar al polipéptido de ActRIIB de tipo salvaje.

Los mutantes del polipéptido de ActRIIB, particularmente conjuntos de mutantes combinatorios de un polipéptido de ActRIIB, así como mutantes de truncamiento; las combinaciones de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificar secuencias variantes funcionales que pueden usarse en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria. El propósito de cribar dichas bibliotecas combinatorias puede ser generar, por ejemplo, variantes de polipéptidos de ActRIIB que pueden actuar como agonistas o antagonistas, o alternativamente, que poseen actividades novedosas en conjunto.

Se ha demostrado que el bolsillo de unión a ligando de ActRIIB 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 de la SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO: 28. En estas posiciones, se espera que se toleren mutaciones conservativas, aunque una mutación K74A se tolera bien, al igual que R40A, K55A, F82A y mutaciones en la posición L79. R40 es una K en *Xenopus*, lo que indica que los aminoácidos básicos en esta posición serán tolerados. Q53 es R en ActRIIB bovino y K en ActRIIB de *Xenopus*, y por lo tanto, los aminoácidos que incluyen R, K, Q, N y H serán tolerados en esta posición. Por lo tanto, una fórmula general para un polipéptido de ActRIIB para su uso en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria es una que comprende los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28, pero opcionalmente comienza en una posición de aminoácidos que varía de 20-24 o 22-25 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 y termina en una posición de aminoácido que varía de 129-134 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28, y que comprende no más de 1, 2, 5 o 15 cambios conservativos de aminoácidos en el bolsillo de unión al ligando, y cero, una o más alteraciones no conservativas en las posiciones de aminoácidos 40, 53, 55, 74, 79 y/u 82 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 en el bolsillo de unión al ligando. Dicho polipéptido de ActRIIB puede retener más del 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia u homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28. Los sitios fuera del bolsillo de unión, en los que la variabilidad puede tolerarse particularmente bien, incluyen los extremos amino y carboxi del dominio extracelular de ActRIIB, y las posiciones 42-46 y 65-73. Una alteración de asparagina a alanina en la posición 65 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 (N65A) en realidad mejora la unión del ligando en el fondo de A64 y, por lo tanto, se espera que no tenga un efecto perjudicial sobre la unión del ligando en el fondo de R64. Este cambio probablemente elimina la glicosilación en N65 en el fondo de A64, lo que demuestra que es probable que se tolere un cambio significativo en esta región. Mientras que un cambio R64A se tolera mal, R64K se tolera bien y, por lo tanto, se puede tolerar otro residuo básico, tal como H, en la posición 64.

Como un ejemplo específico de un polipéptido de ActRIIB con una mutación en el dominio de unión al ligando, el residuo de aminoácido cargado positivamente Asp (D80) del dominio de unión al ligando de ActRIIB puede mutarse a un residuo de aminoácido diferente de modo que el polipéptido de ActRIIB variante se une preferentemente a GDF8, pero no a la activina. En una realización específica, el residuo D80 se cambia a un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: un residuo de aminoácido no cargado, un residuo de aminoácido negativo y un residuo de aminoácido hidrófobo. Como un ejemplo específico adicional, el residuo hidrófobo L79 se puede alterar a los aminoácidos ácido aspártico o ácido glutámico para reducir en gran medida la unión a activina mientras se retiene la unión a GDF11. Como reconocerá un experto en la técnica, la mayoría de las mutaciones, variantes o modificaciones descritas pueden realizarse a nivel de ácido nucleico o, en algunos casos, mediante modificación postraducciona l o síntesis química. Muchas de dichas técnicas son muy conocidas en la técnica.

En realizaciones específicas, los inhibidores de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria comprenden un conjugado/proteína de fusión que comprende un dominio extracelular (p. ej., un dominio de unión a activina) de un receptor de ActRIIB unido a una porción Fc de un anticuerpo. Dichos conjugados/proteínas de fusión pueden comprender cualquiera de los polipéptidos de ActRIIB descritos en la presente memoria (p. ej., cualquiera de las SEQ ID NOs: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42, o 43), cualquier polipéptido de ActRIIB conocido en la técnica, o cualquier polipéptido de ActRIIB generado usando métodos conocidos en la técnica y/o proporcionados en la presente memoria .

En ciertas realizaciones, el dominio extracelular está unido a una porción Fc de un anticuerpo a través de un conector, p.ej., un conector peptídico. Los conectores ejemplares incluyen secuencias de polipéptidos cortas tales como 2-10, 2-5, 2-4, 2-3 residuos de aminoácidos (p. ej., residuos de glicina), tales como, por ejemplo, un conector Gly-Gly-Gly. En una realización específica, el conector comprende la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly (GGG). En otra realización específica, el conector comprende la secuencia de aminoácidos Thr-Gly-Gly-Gly (TGGG). Opcionalmente, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en residuos tales como Asp-265, lisina 322 y Asn-434. En ciertos casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (p. ej., una mutación Asp-265) tiene una capacidad reducida para unirse al receptor Fc $\gamma$  en relación con un dominio Fc de tipo salvaje. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (p. ej., una mutación Asn-434) tiene una mayor capacidad para unirse al receptor Fc relacionado con la clase I del MHC (FcRN) en relación con un dominio Fc de tipo salvaje. Las proteínas de fusión ejemplares que comprenden un dominio extracelular soluble de ActRIIB fusionado con un dominio Fc se muestran en las SEQ ID NOs: 20, 21, 24, 25, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 44, 46, y 47.

En una realización específica, los inhibidores de ActRIIB usados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria comprenden el dominio extracelular de ActRIIB, o una porción del mismo, unido a una porción Fc de un anticuerpo, en donde dicho inhibidor de ActRIIB comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NOs: 20, 21, 24, 25, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 44, 46, y 47. En otra realización específica, los inhibidores de ActRIIB usados en las composiciones y métodos

descritos en la presente memoria comprenden el dominio extracelular de ActRIIB, o una porción del mismo, unido a una porción Fc de un anticuerpo, en donde dicho inhibidor de ActRIIB comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticos a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NOs: 20, 21, 24, 25, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 44, 46, y 47.

- 5 En una realización específica, el inhibidor de ActRIIB que se usará en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria es una proteína de fusión entre el dominio extracelular del receptor ActRIIB humano y la porción Fc de IgG1. En otra realización específica, el inhibidor de ActRIIB que se usará en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria es una proteína de fusión entre un dominio extracelular truncado del receptor ActRIIB humano y la porción Fc de IgG1. En otra realización específica, el inhibidor de ActRIIB que se usará en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria es una proteína de fusión entre un dominio extracelular truncado del receptor ActRIIB humano y la porción Fc de IgG1, en donde el dominio extracelular truncado del receptor ActRIIB humano posee una sustitución de aminoácidos en la posición de aminoácidos correspondiente al aminoácido 79 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28. En una realización, la sustitución de aminoácidos en la posición de aminoácidos correspondiente al aminoácido 79 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 es la sustitución de Leucina por Ácido aspártico (es decir, una mutación L79D).

En una realización específica, el inhibidor de ActRIIB que se usará en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria es la SEQ ID NO: 24 o 25, que representa una proteína de fusión entre el dominio extracelular del receptor ActRIIB humano y la porción Fc de IgG1, en donde dicho dominio extracelular de ActRIIB comprende los aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 28 con una mutación L79D. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión ActRIIB-Fc de la SEQ ID NO: 24 se presenta en la SEQ ID NO: 45.

En otra realización específica, el inhibidor de ActRIIB que se usará en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria es la SEQ ID NO: 34 o 35, que representa una proteína de fusión entre el dominio extracelular del receptor ActRIIB humano y la porción Fc de IgG1, en donde dicho dominio extracelular de ActRIIB comprende los aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 16 con una mutación L79D.

- 25 Los sitios de reconocimiento de glicosilación unidos a asparagina generalmente comprenden una secuencia de tripéptido, asparagina-X-treonina (o asparagina-X-serina) (donde "X" es cualquier aminoácido) que es reconocido específicamente por las enzimas de glicosilación celulares apropiadas. La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del polipéptido de ActRIIB de tipo salvaje (para sitios de glicosilación unidos a O). Una variedad de sustituciones o deleciones de aminoácidos en una o ambas de las posiciones de aminoácidos primera o tercera de un sitio de reconocimiento de glicosilación (y/o deleción de aminoácidos en la segunda posición) da como resultado la ausencia de glicosilación en la secuencia del tripéptido modificada. Otro medio para aumentar el número de restos de carbohidrato en un polipéptido de ActRIIB es mediante el acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido de ActRIIB. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el o los azúcares se pueden unir a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres, tales como los de cisteína; (d) grupos hidroxilo libres, tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina; (e) residuos aromáticos, tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en la Solicitud de Patente Internacional No. WO 87/05330 publicada el 11 de sep., 1987, y en Aplin y Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., p. 259-306. La eliminación de uno o más restos de carbohidrato presentes en un polipéptido de ActRIIB puede realizarse químicamente y/o enzimáticamente. La desglicosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido de ActRIIB al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da lugar a la escisión de la mayor parte o de todos los azúcares excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras se deja la secuencia de aminoácidos intacta. La desglicosilación química se describe adicionalmente en Hakimuddin et al. (1987) Arch.Biochem.Biophys. 259:52 y en Edge et al. (1981) Anal.Biochem.118:131. La escisión enzimática de los restos de carbohidrato en polipéptidos de ActRIIB se puede lograr mediante el uso de una variedad de endo y exoglicosidasas como se describe en Thotakura et al. (1987) Meth.Enzymol.138:350. La secuencia de un polipéptido de ActRIIB se puede ajustar, según sea apropiado, dependiendo del tipo de sistema de expresión usado, ya que las células de mamíferos, levaduras, insectos y plantas pueden introducir diferentes patrones de glicosilación que pueden verse afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas ActRIIB para uso en seres humanos se pueden expresar en una línea celular de mamíferos que proporciona una glicosilación adecuada, tal como las líneas celulares HEK293 o CHO, aunque otros sistemas de expresión, tales como otras líneas celulares de expresión de mamíferos, líneas celulares de levadura con enzimas de glicosilación preparadas por ingeniería y las células de insecto, se espera que también sean útiles.

- En realizaciones específicas, los polipéptidos de ActRIIB mutados que comprenden la adición de un sitio de glicosilación unido a N adicional (N-X-S/T) que aumenta la semivida en suero de una proteína de fusión ActRIIB-Fc, en relación con la forma ActRIIB(R64)-Fc se puede usar en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria. En una realización específica, la introducción de una asparagina en la posición 24 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28 (A24N) da como resultado la creación de una secuencia NXT que confiere una semivida más larga. Se pueden encontrar otras secuencias NX(T/S) en 42-44 (NQS) y 65-67 (NSS), aunque esta última puede no estar glicosilada de manera eficiente con la R en la posición 64 (es decir, en polipéptidos R64). Las secuencias N-X-S/T pueden introducirse generalmente en posiciones fuera del bolsillo de unión al ligando de ActRIIB, lo que se ha detallado anteriormente. Los sitios particularmente adecuados para la introducción de secuencias N-X-S/T no endógenas

incluyen los aminoácidos 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 o 129-134 de la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28. Las secuencias N-X-S/T también pueden introducirse en el conector entre la secuencia de ActRIIB y el Fc u otro componente de fusión. Dicho sitio puede introducirse con un esfuerzo mínimo introduciendo un N en la posición correcta con respecto a una S o T preexistente, o introduciendo una S o T en una posición correspondiente a un N preexistente. Por lo tanto, las alteraciones deseables que crearían un sitio de glicosilación unido a N son: A24N, R64N, S67N (posiblemente combinado con una alteración N65A), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S y R112T (con todas las posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones que se pueden encontrar en la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 28). Cualquier S que se predice que esté glicosilado puede alterarse a T sin crear un sitio inmunogénico, debido a la protección que proporciona la glicosilación. Del mismo modo, cualquier T que se predice que esté glicosilado puede alterarse a una S. Por lo tanto, las alteraciones S67T y S44T están englobadas en la presente memoria. Asimismo, en una variante A24N, se puede usar una alteración S26T. Por consiguiente, un polipéptido de ActRIIB puede incluir una o más secuencias consenso de glicosilación ligadas a N no endógenas adicionales.

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

Se pueden generar variantes derivadas de forma combinatoria que tienen una potencia selectiva o generalmente aumentada en relación con un polipéptido de ActRIIB natural. Del mismo modo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tienen semividas intracelulares dramáticamente diferentes que el correspondiente polipéptido de ActRIIB de tipo salvaje. Por ejemplo, la proteína alterada puede volverse más estable o menos estable a la degradación proteolítica u otros procesos celulares que provocan la destrucción de, o la inactivación de otra forma de, un polipéptido de ActRIIB nativo. Dichas variantes, y los genes que las codifican, pueden utilizarse para alterar los niveles de los polipéptidos de ActRIIB modulando la semivida de los polipéptidos de ActRIIB. Por ejemplo, una semivida corta puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y puede permitir un control más estricto de los niveles de polipéptidos de ActRIIB recombinantes en el paciente. En una proteína de fusión Fc, se pueden hacer mutaciones en el conector (si lo hay) y/o en la porción Fc para alterar la semivida de la proteína.

Se puede producir una biblioteca combinatoria por medio de una biblioteca degenerada de genes que codifican una biblioteca de polipéptidos que cada uno incluye al menos una porción de secuencias potenciales de polipéptidos de ActRIIB. Por ejemplo, una mezcla de oligonucleótidos sintéticos se puede ligar enzimáticamente en secuencias de genes de manera que el conjunto degenerado de secuencias potenciales de nucleótidos del polipéptido de ActRIIB se puedan expresar como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (p. ej., para la presentación en fagos).

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

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

Se conoce una amplia gama de técnicas en la técnica para cribar productos génicos de bibliotecas combinatorias hechas por mutaciones puntuales y truncamientos, y, en este caso, para cribar bibliotecas de ADNc para detectar productos génicos que tienen una determinada propiedad. Dichas técnicas serán generalmente adaptables para el cribado rápido de las bibliotecas de genes generadas por la mutagénesis combinatoria de los polipéptidos de ActRIIB. Las técnicas más ampliamente utilizadas para el cribado de bibliotecas génicas grandes típicamente comprenden



clonar la biblioteca génica en vectores de expresión replicables, transformar células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante y expresar los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento relativamente fácil del vector que codifica el gen cuyo producto fue detectado. Los ensayos preferidos incluyen ensayos de unión a activina y ensayos de señalización celular mediados por activina.

5 En ciertas realizaciones, los polipéptidos de ActRIIB usados en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria pueden comprender además modificaciones post-traduccionales además de cualquiera que esté naturalmente presente en los polipéptidos de ActRIIB. Dichas modificaciones incluyen, pero no están limitadas a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos de ActRIIB modificados pueden contener elementos que no son aminoácidos, tales como polietilenglicoles, lípidos, poli o  
10 monosacáridos y fosfatos. Los efectos de dichos elementos que no son aminoácidos sobre la funcionalidad de un polipéptido de ActRIIB pueden ensayarse mediante cualquier método conocido por el experto en la técnica. Cuando se produce un polipéptido de ActRIIB en las células al escindir una forma naciente del polipéptido de ActRIIB, el procesamiento post-traduccionales también puede ser importante para el correcto plegamiento y/o función de la proteína. Las diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, W138, NIH-3T3 o HEK293) tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades post-traduccionales y pueden elegirse para garantizar la correcta modificación y procesamiento de los polipéptidos de ActRIIB.

En ciertos aspectos, las variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos de ActRIIB incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una porción de los polipéptidos de ActRIIB y uno o más dominios de fusión. Los ejemplos bien conocidos de dichos dominios de fusión incluyen, pero no están limitados a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), proteína de unión a maltosa (MBP), o albúmina sérica humana. Se puede seleccionar un dominio de fusión para conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión por cromatografía de afinidad. Para fines de purificación por afinidad, se utilizan matrices relevantes para la cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas con glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Muchas de esas matrices están disponibles en forma de "kit", tal como el sistema de purificación Pharmacia GST y el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil como compañeros de fusión (HIS<sub>6</sub>). Como otro ejemplo, se puede seleccionar un dominio de fusión para facilitar la detección de los polipéptidos de ActRIIB. Los ejemplos de dichos dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (p. ej., GFP), así como las "etiquetas de epítipo", que generalmente son secuencias peptídicas cortas para las que está disponible un anticuerpo específico. Las etiquetas de epítipo bien conocidas para las cuales están fácilmente disponibles anticuerpos monoclonales específicos incluyen FLAG, hemaglutinina del virus de la influenza (HA) y etiquetas c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de proteasa, tal como el Factor Xa o la Trombina, que permite que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y, por lo tanto, libere las proteínas recombinantes de las mismas. Las proteínas liberadas pueden aislarse entonces del dominio de fusión mediante separación cromatográfica posterior. En ciertas realizaciones preferidas, un polipéptido de ActRIIB se fusiona con un dominio que estabiliza el polipéptido de ActRIIB in vivo (un dominio "estabilizador"). Por "estabilizar" se entiende cualquier cosa que aumente la semivida en el suero, independientemente de si esto se debe a una disminución de la destrucción, disminución del aclaramiento por el riñón u otro efecto farmacocinético. Se sabe que las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina confieren propiedades farmacocinéticas deseables a una amplia gama de proteínas. Asimismo, las fusiones a la albúmina sérica humana pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que pueden seleccionarse incluyen dominios multimerizantes (p. ej., dimerizantes, tetramerizantes) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, tal como la estimulación adicional del crecimiento óseo o el crecimiento muscular, según se desee).

Se entiende que diferentes elementos de las proteínas de fusión se pueden disponer de cualquier manera que sea consistente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido de ActRIIB se puede colocar en C-terminal respecto a un dominio heterólogo, o, alternativamente, un dominio heterólogo se puede colocar en C-terminal respecto a un polipéptido de ActRIIB. El dominio del polipéptido de ActRIIB y el dominio heterólogo no necesitan ser adyacentes en una proteína de fusión, y se pueden incluir dominios o secuencias de aminoácidos adicionales en C o N-terminal respecto a cualquier dominio o entre los dominios.

50 En ciertas realizaciones, los polipéptidos de ActRIIB usados en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria contienen una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos de ActRIIB. Por ejemplo, dichas modificaciones aumentan la semivida in vitro de los polipéptidos de ActRIIB, aumentan la semivida circulatoria de los polipéptidos de ActRIIB o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos de ActRIIB. Dichas modificaciones estabilizadoras incluyen, pero no están limitadas a, proteínas de fusión (que incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de ActRIIB y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glicosilación (que incluye, por ejemplo, la adición de un sitio de glicosilación a un polipéptido de ActRIIB), y modificaciones del resto de carbohidrato (que incluyen, por ejemplo, la eliminación de restos de carbohidrato de un polipéptido de ActRIIB). En el caso de las proteínas de fusión, un polipéptido de ActRIIB se fusiona a un dominio estabilizador tal como una molécula de IgG (p. ej., un dominio Fc). Tal y como se usa en la presente memoria, el término "dominio estabilizador" no solo se refiere a un dominio de fusión (p. ej., Fc) como en el caso de las proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteicas tales como un resto de carbohidrato o un polímero no proteico, tal como polietilenglicol.

En ciertas realizaciones, los métodos y composiciones descritos en la presente memoria usan polipéptidos de ActRIIB aislados o purificados, es decir, los polipéptidos de ActRIIB que se aíslan de, o que carecen de otra manera sustancialmente de, otras proteínas se pueden usar con los métodos y composiciones descritos en la presente memoria. Los polipéptidos de ActRIIB generalmente se pueden producir por expresión a partir de ácidos nucleicos recombinantes.

En ciertos aspectos, los polipéptidos de ActRIIB usados en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria están codificados por ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes, que incluyen fragmentos, variantes funcionales y proteínas de fusión descritas en la presente memoria. Por ejemplo, la SEQ ID NO: 19 codifica el polipéptido precursor de ActRIIB humano natural. Los ácidos nucleicos objeto pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Dichos ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Estos ácidos nucleicos pueden usarse, por ejemplo, en métodos para preparar polipéptidos de ActRIIB o como agentes terapéuticos directos (p. ej., en una estrategia de terapia génica).

En ciertos aspectos, los ácidos nucleicos que se pueden usar para producir polipéptidos de ActRIIB adecuados para uso en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria se entiende además que incluyen ácidos nucleicos que son variantes de la SEQ ID NO: 19 así como variantes de aquellas secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de ActRIIB solubles (p. ej., ácidos nucleicos que codifican las SEQ ID NOs: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42, y 43). Las secuencias de nucleótidos variantes incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos, tales como variantes alélicas.

En ciertos aspectos, las secuencias de ácido nucleico aisladas o recombinantes que pueden usarse para producir polipéptidos de ActRIIB adecuados para uso en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a la SEQ ID NO: 19 o aquellas secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos de ActRIIB solubles (p. ej., ácidos nucleicos que codifican las SEQ ID NOs: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42, y 43). Un experto en la técnica apreciará que las secuencias de ácido nucleico complementarias a la SEQ ID NO: 19 o aquellas secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos de ActRIIB solubles (p. ej., ácidos nucleicos que codifican las SEQ ID NOs: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42, y 43), y variantes de la SEQ ID NO: 19 o aquellas secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos de ActRIIB solubles (p. ej., ácidos nucleicos que codifican las SEQ ID NOs: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 y 43) pueden usarse con los métodos y composiciones descritos en la presente memoria. En realizaciones adicionales, las secuencias de ácido nucleico pueden ser aisladas, recombinantes y/o fusionadas a una secuencia de nucleótidos heteróloga, o estar en una biblioteca de ADN.

En otras realizaciones, los ácidos nucleicos que pueden usarse para producir polipéptidos de ActRIIB adecuados para uso en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria incluyen secuencias de nucleótidos que hibridan en condiciones altamente astringentes con la secuencia de nucleótidos designada en la SEQ ID NO: 19 o aquellas secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos de ActRIIB solubles (p. ej., ácidos nucleicos que codifican las SEQ ID NOs: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42, y 43), secuencia complemento de la SEQ ID NO: 19 o aquellas secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos de ActRIIB solubles (p. ej., ácidos nucleicos que codifican las SEQ ID NOs: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42, y 43), o fragmentos de las mismas. Un experto en la técnica entenderá que las condiciones de astringencia apropiadas que promueven la hibridación de ADN pueden variarse. Por ejemplo, se puede realizar la hibridación a 6,0 veces cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 grados Celsius, seguido de un lavado de 2,0 veces SSC a 50 grados Celsius. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado se puede seleccionar desde una baja astringencia de aproximadamente 2,0 veces SSC a 50 grados Celsius hasta una alta astringencia de aproximadamente 0,2 veces SSC a 50 grados Celsius. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede aumentarse desde condiciones de baja astringencia a temperatura ambiente, aproximadamente 22 grados Celsius, hasta condiciones de alta astringencia a aproximadamente 65 grados Celsius. Tanto la temperatura como la sal pueden variarse, o la temperatura o la concentración de sal pueden mantenerse constantes mientras se cambia la otra variable. En una realización, los ácidos nucleicos que hibridan en condiciones de baja astringencia de 6 veces SSC a temperatura ambiente seguido de un lavado a 2 veces SSC a temperatura ambiente pueden usarse con los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Los ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos como se muestra en la SEQ ID NO: 19 o aquellas secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos de ActRIIB solubles (p. ej., ácidos nucleicos que codifican las SEQ ID NOs: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 y 43) debido a la degeneración en el código genético también se pueden usar para producir polipéptidos de ActRIIB adecuados para uso en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria. Por ejemplo, varios aminoácidos están designados por más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos para histidina) pueden dar lugar a mutaciones "silenciosas" que no afectan la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que los polimorfismos de la secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas en cuestión existan entre las células de mamíferos. Un experto en la técnica apreciará que estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente el 3-5 % de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína particular pueden existir entre individuos de una especie dada debido a la variación alélica natural. Cualquiera y todas de dichas variaciones de nucleótidos y polimorfismos de aminoácidos resultantes pueden usarse con los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos recombinantes que pueden usarse para producir polipéptidos de ActRIIB adecuados para uso en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria pueden unirse operativamente a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras en una construcción de expresión. Las secuencias de nucleótidos reguladoras generalmente serán apropiadas para la célula huésped utilizada para la expresión. Se conocen en la técnica numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas para una variedad de células huésped. Típicamente, dicha una o más secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, pero no están limitadas a, secuencias promotoras, secuencias líder o señal, sitios de unión ribosomal, secuencias de inicio y terminación transcripcionales, secuencias de inicio y terminación traduccionales, y secuencias potenciadoras o activadoras. Los promotores constitutivos o inducibles como se conocen en la técnica pueden usarse con los métodos y composiciones descritos en la presente memoria. Los promotores pueden ser promotores naturales o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Una construcción de expresión puede estar presente en una célula en un episoma, tal como un plásmido, o la construcción de expresión puede insertarse en un cromosoma. En una realización preferida, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de las células huésped transformadas. Los genes marcadores seleccionables son muy conocidos en la técnica y variarán dependiendo de la célula huésped utilizada.

En ciertos aspectos, los ácidos nucleicos que pueden usarse para producir polipéptidos de ActRIIB adecuados para uso en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria se proporcionan en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de ActRIIB y operativamente unida al menos a una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras son reconocidas en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido de ActRIIB. Por consiguiente, el término secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores 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, Calif. (1990). Por ejemplo, cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando están unidas operativamente a ella puede usarse en estos vectores para expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido de ActRIIB. Dichas secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío de SV40, el promotor tet, el promotor temprano inmediato de adenovirus o citomegalovirus, los promotores RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión está dirigida por la ARN polimerasa T7, el operador principal y las regiones promotoras del fago lambda, las regiones de control para la proteína de la cubierta fd, el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida, p. ej., Pho5, los promotores de los factores de apareamiento alfa de levadura, el promotor poliedro del sistema de baculovirus y otras secuencias que se sabe que controlan la expresión de genes de células procariontas o eucariotas o sus virus, y varias 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 a transformar y/o el tipo de proteína que se desea expresar. Además, también se debe considerar el número de copias del vector, la capacidad de controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tales como los marcadores de antibióticos.

Se puede producir un ácido nucleico recombinante ligando el gen clonado, o una porción del mismo, en un vector adecuado para la expresión en células procariontas, células eucariotas (levadura, ave, insecto o mamífero), o en ambas. Los vehículos de expresión para la producción de un polipéptido de ActRIIB recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para la expresión en células procariontas, tales como *E. coli*.

Algunos vectores de expresión de mamíferos contienen tanto secuencias procariontas para facilitar la propagación del vector en bacterias, como una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan en células eucariotas. Los vectores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamíferos adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y la selección por resistencia a fármacos tanto en células procariontas como eucariotas. Alternativamente, los derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino (BPV-1) o el virus de Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) pueden usarse para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Los ejemplos de otros sistemas de expresión virales (incluidos los retrovirales) se pueden encontrar a continuación en la descripción de los sistemas de administración de terapia génica. Los diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos huésped son bien conocidos en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariontas como eucariotas, así como para procedimientos recombinantes generales, véase *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3ª Ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). En algunos casos, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Los ejemplos de dichos sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tales como pAcUW1) y vectores derivados de pBlueBac (tales como el pBlueBac III que contiene .beta.-gal).

En una realización, se puede diseñar un vector para la producción de los polipéptidos de ActRIIB usados en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria en células CHO, tales como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y vectores pCl-neo (Promega, Madison,

Wis.) Como será evidente, las construcciones de genes objeto pueden usarse para causar la expresión de los polipéptidos de ActRIIB objeto en células propagadas en cultivo, p. ej., para producir proteínas, incluyendo proteínas de fusión o proteínas variantes, para la purificación.

Se pueden usar células huésped transfectadas con un gen recombinante que incluye una secuencia codificadora (p. ej., la SEQ ID NO: 19 o aquellas secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos de ActRIIB solubles (p. ej., ácidos nucleicos que codifican las SEQ ID NOs: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 42 y 43)) para uno o más de los polipéptidos de ActRIIB objeto para producir polipéptidos de ActRIIB adecuados para uso en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido de ActRIIB puede expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insectos (p. ej., usando un sistema de expresión de baculovirus), levadura o células de mamífero. Los expertos en la técnica conocen otras células huésped adecuadas.

Por consiguiente, en la presente memoria se proporcionan métodos para producir los polipéptidos de ActRIIB usados en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria. Por ejemplo, una célula huésped transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido de ActRIIB puede cultivarse en condiciones apropiadas para permitir que ocurra la expresión del polipéptido de ActRIIB. El polipéptido de ActRIIB puede secretarse y aislarse de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido de ActRIIB. Alternativamente, el polipéptido de ActRIIB puede retenerse citoplasmáticamente o en una fracción de membrana y las células se pueden recoger, lisar y aislar la proteína. Un cultivo celular incluye células huésped, medios y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular son bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos de ActRIIB objeto pueden aislarse del medio de cultivo celular, células huésped, o ambos, usando técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis, purificación por inmunofinidad con anticuerpos específicos para epítopos particulares de los polipéptidos de ActRIIB y la purificación por afinidad con un agente que se une a un dominio fusionado con el polipéptido de ActRIIB (p. ej., se puede usar una columna de proteína A para purificar una fusión ActRIIB-Fc). En una realización preferida, el polipéptido de ActRIIB es una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación. En una realización preferida, la purificación se logra mediante una serie de etapas de cromatografía en columna, incluyendo, por ejemplo, tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de sefarosa Q, cromatografía de fenilsefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación podría completarse con filtración viral e intercambio de tampón. Como se demuestra en la presente memoria, la proteína ActRIIB-hFc se purificó con una pureza de > 98 % según lo determinado por cromatografía de exclusión por tamaño y > 95 % según lo determinado por SDS PAGE. Este nivel de pureza fue suficiente para lograr efectos deseables sobre el hueso en ratones y un perfil de seguridad aceptable en ratones, ratas y primates no humanos.

En otra realización, un gen de fusión que codifica una secuencia líder de purificación, tal como una secuencia de sitio de escisión de poli-(His)/enteroquinasa en el extremo N de la porción deseada de un polipéptido de ActRIIB recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada por cromatografía de afinidad usando una resina metálica de Ni<sup>2+</sup>. La secuencia líder de purificación se puede eliminar posteriormente mediante tratamiento con enteroquinasa para proporcionar el polipéptido de ActRIIB purificado (p. ej., véase Hochuli et al., (1987) *J. Chromatography* 411:177; y Janknecht et al., *PNAS USA* 88:8972).

Las técnicas para preparar genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, la unión de varios fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias de polipéptidos se realiza según técnicas convencionales, empleando extremos con terminales romos o terminales escalonados para la ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar los extremos apropiados, relleno de extremos cohesivos según corresponda, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables y ligación enzimática. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes puede llevarse a cabo utilizando cebadores de anclaje que dan lugar a protuberancias complementarias entre dos fragmentos de genes consecutivos que posteriormente pueden hibridarse para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons:1992).

La proteína de fusión ActRIIB-Fc se puede expresar en células CHO-DUKX B1 1 transfectadas de forma estable a partir de un vector pAID4 (ori/potenciador de SV40, promotor de CMV), usando una secuencia líder de plasminógeno tisular de la SEQ ID NO: 8. La porción Fc puede comprender una secuencia de Fc de IgG1 humana, como se muestra en la SEQ ID NO: 7. En ciertas realizaciones, tras la expresión, la proteína contenida tiene, de promedio, entre aproximadamente 1,5 y 2,5 moles de ácido siálico por molécula de proteína de fusión ActRIIB-Fc.

En ciertas realizaciones, la larga semivida en suero de una fusión ActRIIB-Fc puede ser de 25-32 días en pacientes humanos. Además, el material expresado en células CHO puede tener una mayor afinidad por el ligando activina B que la reportada para una proteína de fusión ActRIIB-hFc expresada en células 293 humanas (del Re et al., *J Biol Chem.* 2004 17 dic;279(51):53126-35). Además, sin estar limitado por la teoría, el uso de la secuencia líder de TPA proporcionó una mayor producción que otras secuencias líderes y, a diferencia de ActRIIB-Fc expresada con un líder nativo, puede proporcionar una secuencia N-terminal altamente pura. El uso de la secuencia líder nativa puede dar como resultado dos especies principales de ActRIIB-Fc, cada una con una secuencia N-terminal diferente.

### 5.5.3 Otros inhibidores del receptor ActRII

En ciertos aspectos, los inhibidores de los receptores ActRII usados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria son compuestos de ácido nucleico.

5 Los ejemplos de categorías de compuestos de ácido nucleico que inhiben los receptores ActRII incluyen ácidos nucleicos antisentido, construcciones de ARNs<sub>i</sub> o ARNs<sub>i</sub> y construcciones de ácido nucleico catalítico. Un compuesto de ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario. Un compuesto bicatenario también puede incluir regiones de protuberancia o no complementariedad, donde una u otra de las cadenas es monocatenaria. Un compuesto monocatenario puede incluir regiones de auto-complementariedad, lo que significa que el compuesto puede formar una estructura denominada "horquilla" o "tallo-bucle", con una región de estructura helicoidal doble.

10 Los compuestos de ácido nucleico que inhiben los receptores ActRII pueden comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una región que consiste en no más de 1.000, no más de 500, no más de 250, no más de 100 o no más de 50, 35, 30, 25, 22, 20 o 18 nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico del receptor ActRII de longitud completa o secuencia de ácido nucleico de activina (p. ej., la secuencia de ácido nucleico de una subunidad de activina A o activina B, también denominada  $\beta_A$  o  $\beta_B$ ). En aspectos específicos, la región de complementariedad será al menos de 8 nucleótidos, y opcionalmente al menos de 10 o al menos de 15 nucleótidos, y opcionalmente entre 15 y 25 nucleótidos. Una región de complementariedad puede encontrarse dentro de un intrón, una secuencia codificadora o una secuencia no codificadora del transcrito diana, tal como la porción de secuencia codificadora. Generalmente, un compuesto de ácido nucleico que inhibe un receptor ActRII tendrá una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 500 nucleótidos o pares de bases de longitud, y opcionalmente la longitud será de aproximadamente 14 a aproximadamente 50 nucleótidos. Un compuesto de ácido nucleico que inhibe un receptor ActRII puede ser un ADN (particularmente para uso como un antisentido), un ARN o un híbrido de ARN:ADN. Cualquier cadena puede incluir una mezcla de ADN y ARN, así como formas modificadas que no pueden clasificarse fácilmente como ADN o ARN. Del mismo modo, un compuesto de ácido nucleico bicatenario puede ser ADN:ADN, ADN:ARN o ARN:ARN, y cualquier cadena también puede incluir una mezcla de ADN y ARN, así como formas modificadas que no pueden clasificarse fácilmente como ADN o ARN.

Los compuestos de ácido nucleico que inhiben un receptor ActRII pueden incluir cualquiera de una variedad de modificaciones, que incluyen una o modificaciones en la parte central (la porción de azúcar-fosfato en un ácido nucleico natural, que incluye enlaces internucleotídicos) o la porción de base (la porción de purina o pirimidina de un ácido nucleico natural). En ciertos aspectos, un compuesto de ácido nucleico antisentido tendrá una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos y a menudo contendrá una o más modificaciones para mejorar ciertas características, tales como la estabilidad en el suero, la estabilidad en una célula o la estabilidad en un lugar donde es probable que se administre el compuesto, tal como, p. ej., el estómago en el caso de los compuestos administrados por vía oral y el pulmón para los compuestos inhalados. En el caso de una construcción de ARNs<sub>i</sub>, la cadena complementaria al transcrito diana generalmente será ARN o modificaciones del mismo. La otra cadena puede ser ARN, ADN o cualquier otra variación. La porción dúplex de la construcción de ARNs<sub>i</sub> de "horquilla" bicatenaria o monocatenaria puede, en ciertos aspectos, tener una longitud de 18 a 40 nucleótidos de longitud y opcionalmente de aproximadamente 21 a 23 nucleótidos de longitud, siempre que sirva como sustrato de Dicer. Los ácidos nucleicos catalíticos o enzimáticos pueden ser ribozimas o enzimas de ADN y también pueden contener formas modificadas. En ciertos aspectos, los compuestos de ácido nucleico que inhiben los receptores ActRII pueden inhibir la expresión de su diana en aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o más en condiciones fisiológicas y en una concentración donde un control sin sentido o con sentido tiene poco o ningún efecto. Las concentraciones para ensayar el efecto de los compuestos de ácido nucleico incluyen 1,5, 10 micromolar o más.

En otros aspectos, los inhibidores de los receptores ActRII usados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria son anticuerpos. Dichos anticuerpos incluyen anticuerpos que se unen a activina (particularmente, a las subunidades de activina A o B, también denominadas  $\beta_A$  o  $\beta_B$ ) e interrumpen la unión al receptor ActRII; y anticuerpos que se unen a los polipéptidos del receptor ActRII (p. ej., un polipéptido de ActRIIA soluble o ActRIIB soluble) e interrumpen la unión a activina.

Mediante el uso de inmunógenos derivados de un polipéptido del receptor ActRII o un polipéptido de activina, pueden prepararse antisueros antiproteína/antipéptido o anticuerpos monoclonales mediante protocolos estándar (véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. por Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press:1988)). Un mamífero, tal como un ratón, un hámster o un conejo puede inmunizarse con una forma inmunogénica del polipéptido del receptor ActRII, un fragmento antigénico que es capaz de incitar una respuesta de anticuerpos o una proteína de fusión. Las técnicas para conferir inmunogenicidad a una proteína o péptido incluyen la conjugación con vehículos u otras técnicas bien conocidas en la técnica. Se puede administrar una porción inmunogénica de un receptor ActRII o polipéptido de activina en presencia de adyuvante. El progreso de la inmunización puede monitorizarse mediante la detección de titulaciones de anticuerpos en el plasma o suero. Puede usarse ELISA estándar u otros inmunoensayos con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos.

Después de la inmunización de un animal con una preparación antigénica de un polipéptido de receptor ActRII, se pueden obtener antisueros y, si se desea, se pueden aislar anticuerpos policlonales del suero. Para producir anticuerpos monoclonales, las células productoras de anticuerpos (linfocitos) se pueden recoger de un animal

5 inmunizado y fusionarse mediante procedimientos estándar de fusión de células somáticas con células inmortalizantes tales como las células de mieloma para producir células de hibridoma. Dichas técnicas son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, la técnica de hibridoma (desarrollada originalmente por Kohler y Milstein, (1975) Nature, 256:495-497), la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbar et al., (1983) Immunology Today, 4:72), y la técnica del hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. p. 77-96). Las células de hibridoma pueden cribarse inmunológicamente para la producción de anticuerpos específicamente reactivos con un polipéptido de receptor ActRII y anticuerpos monoclonales aislados de un cultivo que comprende dichas células de hibridoma.

10 El término "anticuerpo" tal y como se usa en la presente memoria pretende incluir fragmentos del mismo que también son específicamente reactivos con un polipéptido objeto. Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales y los fragmentos pueden cribarse respecto a su utilidad de la misma manera que se ha descrito anteriormente para anticuerpos completos. Por ejemplo, los fragmentos F(ab)<sub>2</sub> pueden generarse tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab)<sub>2</sub> resultante se puede tratar para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab. Se pretende además que un anticuerpo incluya moléculas biespecíficas, de cadena única, quiméricas, humanizadas y completamente humanas que tienen afinidad por un receptor ActRII o polipéptido de activina conferida por al menos una región CDR del anticuerpo. Un anticuerpo puede comprender además un marcador unido al mismo y capaz de ser detectado (p. ej., el marcador puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático).

20 En ciertos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante, término que engloba cualquier anticuerpo generado en parte por técnicas de biología molecular, incluyendo los anticuerpos quiméricos o injertados con CDR, anticuerpos humanos u otros ensamblados a partir de dominios de anticuerpos seleccionados de bibliotecas, anticuerpos de cadena única y anticuerpos de dominio único (p. ej., proteínas V<sub>H</sub> humanas o proteínas V<sub>HH</sub> de camélido). En ciertos aspectos, un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. Por ejemplo, un método para generar un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido de receptor de ActRII o polipéptido de activina puede comprender administrar a un ratón una cantidad de una composición inmunogénica que comprende el polipéptido antigénico efectivo para estimular una respuesta inmune detectable, obtener células productoras de anticuerpos (p. ej., células del bazo) del ratón y fusionar las células productoras de anticuerpos con células de mieloma para obtener hibridomas productores de anticuerpos, y ensayar los hibridomas productores de anticuerpos para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno. Una vez obtenido, un hibridoma puede propagarse en un cultivo celular, opcionalmente en condiciones de cultivo donde las células derivadas de hibridoma producen el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno. El anticuerpo monoclonal puede purificarse del cultivo celular.

35 El adjetivo "específicamente reactivo con" tal y como se usa en referencia a un anticuerpo pretende significar, como se entiende generalmente en la técnica, que el anticuerpo es suficientemente selectivo entre el antígeno de interés (p. ej., un polipéptido de receptor ActRII) y otros antígenos que no son de interés que el anticuerpo es útil para, como mínimo, detectar la presencia del antígeno de interés en un tipo particular de muestra biológica. En ciertos métodos que emplean el anticuerpo, tales como aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable un mayor grado de especificidad en la unión. Los anticuerpos monoclonales generalmente tienen una mayor tendencia (en comparación con los anticuerpos policlonales) a discriminar eficazmente entre los antígenos deseados y los polipéptidos de reacción cruzada. Una característica que influye en la especificidad de una interacción anticuerpo:antígeno es la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Aunque la especificidad deseada se puede alcanzar con un rango de afinidades diferentes, los anticuerpos generalmente preferidos tendrán una afinidad (una constante de disociación) de aproximadamente 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-9</sup> o menos. Dada la unión extraordinariamente estrecha entre la activina y un receptor ActRII, se espera que un anticuerpo neutralizante anti-activina o anti-receptor ActRII generalmente tenga una constante de disociación de 10<sup>-10</sup> o menos.

50 Además, las técnicas usadas para cribar anticuerpos con el fin de identificar un anticuerpo deseable pueden influir en las propiedades del anticuerpo obtenido. Por ejemplo, si se va a usar un anticuerpo para unir un antígeno en disolución, puede ser deseable ensayar la unión en disolución. Una variedad de técnicas diferentes está disponible para ensayar la interacción entre anticuerpos y antígenos para identificar anticuerpos particularmente deseables. Dichas técnicas incluyen ELISA, ensayos de unión de resonancia de plasmones superficiales (p. ej., el ensayo de unión Biacore.TM, Biacore AB, Uppsala, Suecia), ensayos tipo sándwich (p. ej., el sistema de cuentas paramagnéticas de IGEN International, Inc., Gaithersburg, Md.), transferencias Western, ensayos de inmunoprecipitación e inmunohistoquímica.

55 En ciertos aspectos, los inhibidores del receptor ActRII que se usarán en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria incluyen formas alternativas de activina, particularmente aquellas con alteraciones en el dominio de unión al receptor de tipo I pueden unirse a receptores de tipo II y no pueden formar un ternario activo complejo. En ciertos aspectos, los ácidos nucleicos, tales como moléculas antisentido, ARNs i o ribozimas que inhiben la activina A, B, C o E, o, particularmente, la expresión del receptor ActRII, pueden usarse en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria. En ciertas realizaciones, los inhibidores del receptor ActRII que se usarán en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria exhiben selectividad para inhibir la señalización mediada por GDF11 frente a otros miembros de la familia TGF-beta, particularmente con respecto a GDF8 y activina.

60

En otros aspectos, los inhibidores de los receptores ActRII usados en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria son proteínas distintas de anticuerpos con actividad antagonista del receptor ActRII, que incluyen inhibina (es decir, subunidad alfa de inhibina), folistatina (p. ej., folistatina-288 y folistatina-315), Cerberus, proteína relacionada con la folistatina ("FSRP"), endoglina, activina C, alfa(2)-macroglobulina y una activina A mutante M108A (cambio de metionina a alanina en la posición 108).

En aspectos específicos, el inhibidor del receptor ActRII que se usará en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria es un polipéptido de folistatina que antagoniza la bioactividad de la activina y/o se une a la activina. El término "polipéptido de folistatina" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de folistatina natural, así como cualquier variante del mismo (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que retienen una actividad útil, e incluye además cualquier monómero funcional o multímero de folistatina. Las variantes de los polipéptidos de folistatina que retienen las propiedades de unión a activina se pueden identificar sobre la base de estudios previos que implican interacciones de folistatina y activina. Por ejemplo, WO2008/030367, que se incluye por referencia en la presente memoria en su totalidad, describe dominios específicos de folistatina ("FSD") que se ha mostrado que son importantes para la unión de activina. Por ejemplo, los polipéptidos de folistatina incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier folistatina conocida que tenga una secuencia al menos aproximadamente un 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido de folistatina, y opcionalmente al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad. Los ejemplos de polipéptidos de folistatina incluyen el polipéptido de folistatina maduro o isoformas más cortas u otras variantes del polipéptido del precursor de folistatina humano como se describe, por ejemplo, en el documento WO2005/025601, que se incluye por referencia en la presente memoria en su totalidad.

En un aspecto específico, el inhibidor del receptor ActRII que se usará en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria es un gen relacionado similar a la folistatina (FLRG) que antagoniza la bioactividad de la activina y/o se une a la activina. El término "polipéptido FLRG" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido natural de FLRG, así como cualquier variante del mismo (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que retienen una actividad útil. Las variantes de los polipéptidos FLRG que retienen las propiedades de unión a activina se pueden identificar usando métodos rutinarios para ensayar las interacciones de FLRG y activina. Véase, por ejemplo, la Pat. de EE. UU. No. 6.537.966, que se incluye por referencia en la presente memoria en su totalidad. Los polipéptidos FLRG incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier FLRG conocido que tenga una secuencia al menos aproximadamente un 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido FLRG, y opcionalmente al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad.

En cierto aspecto, las variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos de folistatina y los polipéptidos FLRG incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una porción de los polipéptidos de folistatina o polipéptidos FLRG y uno o más dominios de fusión, tales como, por ejemplo, dominios que facilitan el aislamiento, detección, estabilización o multimerización del polipéptido. Los dominios de fusión adecuados se analizan en detalle anteriormente con referencia a los polipéptidos de ActRIIA y ActRIIB. En un aspecto, un inhibidor del receptor ActRII es una proteína de fusión que comprende una porción de unión a activina de un polipéptido de folistatina fusionada a un dominio Fc. En otro aspecto, un inhibidor del receptor ActRII es una proteína de fusión que comprende una porción de unión a activina de un polipéptido FLRG fusionada a un dominio Fc.

## 5.6 Ensayos

Diversas variantes de polipéptidos de ActRII, o variantes de polipéptidos de ActRII solubles, pueden ensayarse para determinar su capacidad para inhibir ActRII. Además, los compuestos se pueden ensayar para determinar su capacidad para inhibir ActRII. Una vez que se confirman los inhibidores de la actividad de ActRII, estos compuestos pueden usarse con los métodos proporcionados en la presente memoria. ActRII puede ser ActRIIA o ActRIIB. Los ensayos siguientes se describen para ActRIIA pero se pueden realizar de manera análoga para ActRIIB.

### 5.6.1 Niveles de glóbulos rojos

El recuento de RBC es un recuento del número real de glóbulos rojos por volumen de sangre y puede incluirse como parte de un recuento sanguíneo completo estándar. Normalmente, los hombres tienen un recuento de RBC de entre 4,7 a 6,1 millones de células por microlitro y las mujeres tienen un recuento de RBC de entre 4,2 a 5,4 millones de células por microlitro. Sin embargo, los pacientes con talasemia pueden tener un recuento de RBC inferior al que se observa normalmente. Por lo tanto, la determinación del recuento de RBC en un paciente con anemia (p. ej., talasemia) que se está tratando según los métodos proporcionados en la presente memoria permite la determinación de la eficacia de dicho tratamiento.

### 5.6.2 Unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-e)

Las CFU-e se pueden ensayar e identificar, p. ej., en un ensayo de formación de colonias por el número y la morfología de las células y por la presencia o ausencia de ciertos marcadores de la superficie celular. Los niveles de las unidades formadoras de colonias eritroides se pueden medir usando, p. ej., tinción por anticuerpos seguida de análisis por citometría de flujo (FAC) para evaluar la expresión de marcadores, tales como marcadores del estado de diferenciación, p. ej., receptor de Epo, c-Kit (receptor del factor de células madre), receptor de transferencia (CD71+),

CD36 y Ter119 (antígeno asociado a glicoforina A) (las células CFU-e son negativas para Ter119 (antígeno asociado a glicoforina A) (véase, p. ej., Terszowsky et al., 2005). Las células en el estadio CFU-e expresan el receptor de eritropoyetina (EpoR) y pueden inducirse para diferenciarse terminalmente *in vitro* en 2-3 días en presencia solo de eritropoyetina en un medio de cultivo. Las células CFU-e pueden sembrarse en placas sobre metilcelulosa y teñirse con reactivo de diaminobencidina para la hemoglobina, y luego pueden contarse las colonias de CFU-e. Sobre el día 2 desde el momento de la siembra en placas, cada colonia CFU-e puede producir entre 8 y 64 células hemoglobinizadas, la mayoría de las cuales se encuentran en su estadio final de diferenciación eritroide.

Los ensayos de unidades formadoras de colonias son conocidos en la técnica (p. ej., medio MesenCult™, Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, Columbia Británica; véase también Wu et al. (Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF (1995). "Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor". *Cell* 83 (1):59-67; Marley SB, Lewis JL, Goldman JM, Gordon MY (1996)).

### 5.6.3 Unidades formadoras en estallido eritroides (BFU-e)

De forma similar a la CFU-e, se pueden ensayar e identificar las BFU-e, p. ej., en un ensayo de formación de colonias por el número y la morfología de las células y por la presencia o ausencia de ciertos marcadores de la superficie celular. Específicamente, las BFU-e pueden identificarse mediante la expresión de varios marcadores de la superficie celular tales como CD33, CD34 y HLA-DR, y la falta de expresión de glicoforina-A. Por ejemplo, pueden utilizarse los ensayos de BFU-e descritos en Wu et al. (Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF (1995). "Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor". *Cell* 83 (1):59-67).

### 5.6.4 Hematocrito

Un hematocrito mide el porcentaje de glóbulos rojos en un volumen dado de sangre completa y puede incluirse como parte de un recuento sanguíneo completo estándar. El hematocrito es normalmente aproximadamente del 45 % para los hombres y aproximadamente del 40 % para las mujeres. Sin embargo, los pacientes con talasemia tienen típicamente un hematocrito más bajo que el que se observa normalmente. Por lo tanto, la determinación del hematocrito en un paciente con talasemia que se está tratando según los métodos proporcionados en la presente memoria permite la determinación de la eficacia de dicho tratamiento.

### 5.6.5 N-telopéptido urinario (uNTX)

El N-telopéptido urinario de colágeno tipo 1 (NTx) se puede medir usando, p. ej., un inmunoensayo automatizado (Vitros ECI; Ortho Clinical., Rochester, NT, EE. UU.).

### 5.6.6 Fosfatasa alcalina sérica específica del hueso (BSAP)

Los niveles de fosfatasa alcalina sérica específica del hueso (BSAP) se pueden medir usando, p. ej., un inmunoensayo enzimático.

### 5.6.7 Apoptosis de los progenitores eritroides

La apoptosis de los progenitores eritroides puede determinarse, p. ej., mediante el uso de tinción de marcaje de extremos mellados con dUTP mediada por la desoxinucleotidiltransferasa terminal (TUNEL). La tinción de TUNEL se puede realizar utilizando un kit de detección de apoptosis *in situ* (Takara Bio, Otsu, Japón).

### 5.6.8 Sistema de co-cultivo eritroide

Para ensayar el efecto de un agente sobre la diferenciación eritroide en un entorno *in vitro* más análogo al entorno *in vivo*, se puede usar un sistema de co-cultivo de células de la médula ósea y células CD36+ humanas. Las células CD36+ humanas, que están altamente enriquecidas para las células progenitoras eritroides, se co-cultivan con cultivos de médula ósea a largo plazo en medios suplementados con eritropoyetina (EPO) (2U/mL). Después de 6 días, la producción celular (p. ej., tipo de célula) del cultivo puede evaluarse mediante, por ejemplo, análisis por citometría de flujo (p. ej., FACS). El número de células eritroides en los diversos niveles de diferenciación eritroide (p. ej., proeritroblastos, basófilos/policromáticos tardíos, ortocromáticos/reticulocitos, células de glicoproteína A+) indica la capacidad del agente que se está ensayando para modular la diferenciación eritroide.

### 5.6.9 Ensayo de respuesta transcripcional

En ciertas realizaciones, se puede usar un ensayo de respuesta de transcripción para ensayar un inhibidor del receptor de activina tipo II o la actividad de GDF11. Tras la señalización de ActRII y GDF11, la transcripción de ciertos genes se regula al alza o a la baja. Se usa un sistema de cultivo celular y se puede medir la respuesta transcripcional (p. ej., mediante RT-PCT). El efecto de un agente sobre la respuesta transcripcional es una medida de su efectividad o actividad. En ciertas realizaciones, la región promotora que se sabe que responde a la señalización de ActRII o GDF11 puede clonarse en 5' de un gen informador. De esta manera, el ensayo puede simplificarse de tal manera que solo sea necesario ensayar la actividad del gen informador.



### 5.7 Dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II

Un inhibidor de ActRII en el contexto de la invención se especifica al comienzo de la Sección 3 del Resumen.

En ciertas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII es suficiente para mejorar un síntoma de anemia. En ciertas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII es suficiente para evitar que empeore al menos un síntoma de anemia. En ciertas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de ActRII aumenta el nivel de glóbulos rojos, los niveles de hemoglobina, los niveles de hematocrito y/o Ery-C en el paciente.

En ciertas realizaciones, el inhibidor de ActRII se dosifica a intervalos y cantidades suficientes para alcanzar concentraciones séricas de 0,2 microgramos/kg o mayores, y son deseables niveles séricos de 1 microgramo/kg o 2 microgramos/kg o mayores para lograr efectos significativos en densidad y resistencia ósea. Los regímenes de dosificación pueden diseñarse para alcanzar concentraciones séricas de entre 0,2 y 15 microgramos/kg, y opcionalmente entre 1 y 5 microgramos/kg. En los seres humanos, se pueden alcanzar niveles séricos de 0,2 microgramos/kg con una dosis única de 0,1 mg/kg o mayor y se pueden alcanzar niveles séricos de 1 microgramo/kg con una dosis única de 0,3 mg/kg o mayor. La semivida en suero observada de la molécula es de aproximadamente 20 y 30 días, sustancialmente más larga que la mayoría de las proteínas de fusión de Fc, y, por lo tanto, se puede lograr un nivel sérico efectivo sostenido, por ejemplo, dosificando con 0,2-0,4 mg/kg en una base semanal o quincenal, o se pueden usar dosis más altas con intervalos más largos entre las dosificaciones. Por ejemplo, podrían usarse dosis de 1-3 mg/kg en una base mensual o bimensual, y el efecto sobre el hueso puede ser lo suficientemente duradero como para que la dosificación sea necesaria solo una vez cada 3, 4, 5, 6, 9, 12 o más meses. Los niveles séricos del inhibidor de ActRII se pueden medir por cualquier medio conocido por el experto en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos frente al inhibidor de ActRII para determinar los niveles séricos del inhibidor de ActRII usando, p. ej., un ELISA.

En ciertas realizaciones, la dosis del inhibidor de ActRII varía de 0,01 a 3,0 mg/kg por vía intravenosa o de 0,03 a 0,1 mg/kg por vía subcutánea. En ciertas realizaciones, la dosis del inhibidor de ActRII es de aproximadamente 0,01 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1,0 mg/kg, aproximadamente 1,5 mg/kg, aproximadamente 2,0 mg/kg, aproximadamente 2,5 mg/kg, aproximadamente 3,0 mg/kg, aproximadamente 3,5 mg/kg, aproximadamente 4,0 mg/kg, aproximadamente 4,5 mg/kg, o aproximadamente 5,0 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis de inhibidor de ActRII es de aproximadamente 10,0 mg/kg, aproximadamente 15,0 mg/kg, aproximadamente 20,0 mg/kg, aproximadamente 25,0 mg/kg, o aproximadamente 30,0 mg/kg. En ciertas realizaciones, la dosis del inhibidor de ActRII es entre 0,01 mg/kg y 0,1 mg/kg, entre 0,1 mg/kg y 0,3 mg/kg, entre 0,3 mg/kg y 0,5 mg/kg, entre 0,5 mg/kg y 1,0 mg/kg, entre 1,0 mg/kg y 2,0 mg/kg, entre 1,0 mg/kg y 3,0 mg/kg, entre 2,0 mg/kg y 3,0 mg/kg, entre 2,0 mg/kg y 4,0 mg/kg, entre 3,0 mg/kg y 5,0 mg/kg, entre 5,0 mg/kg y 10,0 mg/kg, entre 10,0 mg/kg y 15,0 mg/kg, entre 10,0 mg/kg y 20,0 mg/kg, entre 15,0 mg/kg y 20,0 mg/kg, o entre 20,0 mg/kg y 30,0 mg/kg. Cuando se usa junto con una dosis proporcionada en la presente memoria (p. ej., una dosis de un inhibidor de ActRII o una dosis de un segundo agente activo), la palabra "aproximadamente" se refiere a cualquier número dentro del 1, 5 o 10 % del número de referencia.

### 5.8 Composiciones farmacéuticas

En ciertas realizaciones, los antagonistas de activina-ActRII (p. ej., polipéptidos de ActRII) se formulan con un vehículo farmacéuticamente aceptable para uso con los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, un polipéptido de ActRII puede administrarse solo o como un componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Los compuestos objeto se pueden formular para la administración de cualquier manera conveniente para uso en medicina humana o veterinaria. ActRII puede ser ActRIIa o ActRIIb.

En ciertas realizaciones, los métodos terapéuticos proporcionados en la presente memoria incluyen administrar la composición (que comprende un inhibidor de ActRII) sistémicamente o localmente como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para los usos proporcionados en la presente memoria está en una forma fisiológicamente aceptable libre de pirógenos. Los agentes terapéuticamente útiles distintos de los antagonistas de ActRII que también pueden incluirse opcionalmente en la composición como se describe anteriormente, pueden administrarse simultánea o secuencialmente con los compuestos objeto (p. ej., polipéptidos de ActRII, tales como polipéptidos de ActRIIa y/o ActRIIb (véase la Sección 5.2)).

Típicamente, los antagonistas de ActRII se administrarán por vía parenteral. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden comprender uno o más polipéptidos de ActRII en combinación con una o más disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas, estériles y farmacéuticamente aceptables o polvos estériles que pueden reconstituirse en disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes del uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas para uso en los métodos descritos en la presente memoria 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 adecuada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

5 Además, la composición puede encapsularse o inyectarse en una forma para la administración a un sitio de tejido diana (p. ej., hueso). En ciertas realizaciones, las composiciones para uso en los métodos descritos en la presente memoria pueden incluir una matriz capaz de administrar uno o más compuestos terapéuticos (p. ej., polipéptidos de ActR11a) a un sitio de tejido diana (p. ej., hueso), proporcionando una estructura para el tejido en desarrollo y óptimamente capaz de ser reabsorbido en el cuerpo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar una liberación lenta de los polipéptidos de ActR11a. Dichas matrices pueden estar formadas por materiales actualmente en uso para otras  
10 aplicaciones médicas implantadas.

La elección del material de la matriz está basada en la biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, apariencia cosmética y propiedades de interfase. La aplicación particular de las composiciones objeto definirá la formulación apropiada. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser sulfato de calcio, fosfato de tricalcio, hidroxiapatito, ácido poliláctico y polianhídridos biodegradables y químicamente definidos. Otros materiales  
15 potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, tales como hueso o colágeno dérmico. Las matrices adicionales están comprendidas por proteínas puras o componentes de la matriz extracelular. Otras matrices potenciales son no biodegradables y químicamente definidas, tales como hidroxiapatito sinterizado, biovidrio, aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden estar comprendidas por combinaciones de cualquiera de los tipos de material anteriormente mencionados, tales como ácido poliláctico e hidroxiapatito o colágeno y fosfato tricálcico.  
20 Puede alterarse la composición de las biocerámicas, tal como en aluminato-fosfato de calcio, y procesarse para alterar el tamaño de poro, tamaño de partícula, forma de partícula y biodegradabilidad.

En ciertas realizaciones, las composiciones para uso en los métodos descritos en la presente memoria (que comprenden el inhibidor de ActR11) se pueden administrar por vía oral, p. ej., en la forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas (usando una base aromatizada, generalmente sacarosa y goma arábiga o de tragacanto),  
25 polvos, gránulos, o como una disolución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga) y/o como enjuagues bucales y similares, cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada de un agente como un ingrediente activo. Un agente también se puede administrar como un bolo, electuario o pasta.

30 En las formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), uno o más compuestos terapéuticos descritos en la presente memoria pueden mezclarse con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes: (1) rellenos o expansores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico;  
35 (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; (3) humectantes, tal como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de la disolución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario;  
40 (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como arcilla de caolín y bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de las cápsulas, comprimidos y pastillas, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponadores. Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden empear como rellenos en cápsulas de gelatina rellenas duras y blandas usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

45 Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes que se usan comúnmente en la técnica, tales como agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular,  
50 aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol de tetrahidrofurilo, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de los mismos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

55 Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión tales como alcoholes isostearílicos etoxilados, polioxietilen sorbitol, y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y goma de tragacanto y mezclas de los mismos.

Las composiciones descritas en la presente memoria también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse por la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno,  
60 clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir en las composiciones agentes

isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede provocarse mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

5 Se entiende que el régimen de dosificación será determinado por el médico responsable considerando varios factores que modifican la acción de los compuestos descritos en la presente memoria (p. ej., polipéptidos de ActRII, tales como los polipéptidos de ActRIIa y/o ActRIIb (véase la Sección 5.2)). Los diversos factores incluyen, pero no están limitados a, la cantidad de peso óseo que se desea formar, el grado de pérdida de densidad ósea, el sitio del daño óseo, la condición del hueso dañado, la edad, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de cualquier enfermedad que pueda estar contribuyendo a la pérdida ósea, el tiempo de administración y otros factores clínicos. Opcionalmente, la dosificación puede variar con el tipo de matriz usada en la reconstitución y los tipos de compuestos en la composición. La adición de otros factores de crecimiento conocidos a la composición final, también puede afectar la dosificación. El progreso se puede monitorizar mediante la evaluación periódica del crecimiento y/o reparación ósea, por ejemplo, rayos X (incluido DEXA), determinaciones histomorfométricas y marcaje con tetraciclina.

15 En ciertas realizaciones, en la presente memoria se proporciona terapia génica para la producción in vivo de polipéptidos de ActRII. Dicha terapia lograría su efecto terapéutico mediante la introducción de las secuencias de polinucleótidos de ActRII en células o tejidos que tienen los trastornos enumerados anteriormente. La administración de secuencias de polinucleótidos de ActRII se puede lograr usando un vector de expresión recombinante tal como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. Para la administración terapéutica de secuencias de polinucleótidos de ActRII se prefiere el uso de liposomas dirigidos. Los polipéptidos de ActRII pueden ser polipéptidos de ActRIIa y/o ActRIIb (véase la Sección 5.2)).

20 Varios vectores virales que pueden utilizarse para la terapia génica como se enseña en la presente memoria incluyen adenovirus, virus del herpes, vaccinia o, preferiblemente, un virus de ARN tal como un retrovirus. Preferiblemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o aviar. Los ejemplos de vectores retrovirales en los que se puede insertar un solo gen extraño incluyen, pero están limitados a: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV) y virus del sarcoma de Rous (RSV). Varios vectores retrovirales adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable para que las células transducidas puedan identificarse y generarse. Los vectores retrovirales pueden hacerse específicos de diana uniendo, por ejemplo, un azúcar, un glicolípido o una proteína. El direccionamiento preferido se logra mediante el uso de un anticuerpo. Los expertos en la técnica reconocerán que pueden insertarse secuencias de polinucleótidos específicas en el genoma retroviral o unirse a una envoltura viral para permitir la administración específica dirigida del vector retroviral que contiene el polinucleótido de ActRII. En una realización preferida, el vector está dirigido a hueso o cartílago.

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

35 Otro sistema de administración dirigida para los polinucleótidos de ActRII es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, microperlas y sistemas a base de lípidos, que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferido para uso en los métodos descritos en la presente memoria es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificiales 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 administrarse a las células en una forma biológicamente activa (véase, p. ej., Fraley et al., Trends Biochem.Sci., 6:77, 1981). Los métodos para la transferencia eficiente de genes usando un vehículo liposómico son conocidos en la técnica, véase, p. ej., Mannino, et al., Biotechniques, 6: 682, 1988. La composición del liposoma es habitualmente una combinación de fosfolípidos, habitualmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También se pueden usar otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

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

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

## 6. Ejemplo

El ejemplo presentado en la presente memoria demuestra que los niveles de la proteína GDF11 están elevados en la talasemia y que la inhibición de GDF11 puede tratar la anemia en un modelo de beta-talasemia en ratones. Por consiguiente, el ejemplo proporcionado en la presente memoria demuestra que GDF11 puede usarse como un biomarcador para la talasemia, y que pueden evaluarse los métodos de tratamiento de la anemia como la talasemia.

## 5 6.1 Un señuelo de ActRIIA trata la beta-talasemia

La beta-talasemia está asociada con eritropoyesis ineficaz, diferenciación eritroide acelerada y apoptosis, lo que resulta en anemia y sobrecarga de hierro. El mecanismo molecular subyacente a los efectos de la eritropoyesis ineficaz no se entiende completamente. Aunque los miembros de la superfamilia TGF-beta están implicados tanto en la proliferación como en la diferenciación de las células progenitoras eritroides, se desconoce el papel de los numerosos miembros de la familia TGF-beta en la eritropoyesis ineficaz observada en la beta-talasemia.

Para evaluar el papel de los miembros de la familia TGF-beta en la eritropoyesis ineficaz de la beta-talasemia, se usó una proteína de fusión recombinante que se une a varios ligandos de la superfamilia TGF-beta en un modelo de ratón de beta-talasemia humana. La proteína de fusión ActRIIA-Fc (es decir, la contrapartida murina de la SEQ ID NO: 7) consiste en el dominio extracelular del receptor de activina IIA (ActRIIA) unido a un dominio Fc de inmunoglobulina 1 humana (IgG1) y la proteína actúa como una trampa de ligando para miembros de la familia TGF-beta como activina A, activina B, factor de diferenciación de crecimiento-11 (GDF11) y proteína morfogenética ósea-10 (BMP-10). Hbbth1/th1 es un modelo de ratón de beta-talasemia humana, teniendo los ratones una delección natural del gen beta-mayor (Skow et al., 1983). Los ratones Hbbth1/th1 tienen hemoglobina (Hgb), hemocrito (Hct) y volumen celular medio (MCV) anormalmente bajos, así como hiperplasia de la médula ósea (BM) y niveles anormalmente altos de bilirrubina, un subproducto de la degradación de la hemoglobina que representa una destrucción intensa de los glóbulos rojos.

## 6.2 Materiales y métodos

### 6.2.1 Ratones

Los C57BL/6 fueron criados y estabulados en las instalaciones libres de patógenos de INSERM U699. Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité de Cuidado Animal de INSERM. El modelo Hbbth1/th1 se originó a partir de una delección natural del gen  $\beta$  mayor (Skow LC et al; Cell 1983). Los ratones Hbbth1/th1 constituyen un modelo de  $\beta$ -talasemia intermedia. Estos ratones tienen varios parámetros clínicos que reproducen la  $\beta$ -talasemia humana, tales como la eritropoyesis de la médula ósea ineficaz, la apoptosis de precursores, la distribución de hierro parenquimatoso, la disminución de la expresión de hepcidina y los niveles más bajos de hierro de la médula ósea, mientras que los niveles en el hígado y el bazo aumentan.

### 6.2.2 Recuentos sanguíneos completos

Se recogieron muestras de sangre en tubos recubiertos con EDTA y se midieron los recuentos sanguíneos completos en un analizador de sangre MS9-5 (Melet Schloesing Laboratories) según las instrucciones del fabricante. Los parámetros seleccionados fueron glóbulos rojos (RBC), hematocrito (Ht), volumen corpuscular medio (MCV), hemoglobina (Hb). Los números de reticulocitos se determinaron con el reactivo retic-count (BD Biosciences Retic-Count™ Kit).

### 6.2.3 RT-PCR cuantitativa en tiempo real

Se extrajo ARN de progenitores eritroides usando el Mini Kit RNeasy Plus (Qiagen). Se usó un microgramo de ARN total para la transcripción inversa usando la Supermix iScript de transcripción inversa (Bio-rad) durante 30 minutos a 42 °C. La enzima se inactivó entonces a 85 °C durante 5 minutos. Para la qPCR, las muestras de ADNc se amplificaron en un sistema de PCR CFX96 (Bio-rad). Los productos de PCR se cuantificaron usando SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-rad).

### 6.2.4 Cultivos de eritroblastos in vitro

Las células de cada tejido se resuspendieron en "medios de expansión eritroide" libres de suero que consistían en un suplemento de nutrientes StemPro34 plus (Life Technologies Gibco-BRL) suplementado con 2 U/mL de Epo recombinante humano (Roche), 100 ng/mL de SCF (PeproTech), dexametasona 10<sup>-6</sup> M (D2915; Sigma), 40 y penicilina/estreptomina (Pen/Strep; Invitrogen). Después de 5 días de cultivo, las células no adherentes se transfirieron al medio de diferenciación (StemPro-34 suplementado con 1U/ml de Epo y 1 mg/ml de ferro-transferrina (Sigma)) durante dos a tres días suplementados o no con 10 $\mu$ g/ml de mActRIIA-Fc. Los números de células vivas y muertas se determinaron diariamente mediante exclusión con azul de Tripán (Gibco/BRL), y la concentración celular se ajustó a 2 x 10<sup>6</sup> células totales/mL diariamente a través de cambios parciales del medio.

### 6.2.5 Ensayos de metilcelulosa

Las suspensiones de células individuales de BM o bazo de ratón adulto se mezclaron con medio Methocult M3434 (Stem Cell Technologies), se sembraron en placas de 35 mm y se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada

con 5% CO<sub>2</sub>. Las colonias de BFU-E se puntuaron el día 10 (en algunos experimentos se puntuaron las BFU-E de ratón desde el día 7 en adelante hasta el día 10 y no hubo diferencia entre los números de colonias en el día 7 y en el día 10).

### 6.2.6 Análisis estadísticos

5 Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism (versión 5.0; GraphPad Software). Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM de N determinaciones a menos que se indique otra cosa. Se usaron el ensayo de la t de Student o el ensayo de Mann-Whitney para comparar dos grupos, mientras que las comparaciones multigrupo se realizaron usando el ensayo ANOVA de dos vías seguido de un análisis post-hoc (ensayo de Bonferroni). Las diferencias se consideraron significativas a un valor de P menor de 0,05 (\*), menor de 0,01 (\*\*) o menor de 0,001 (\*\*\*).

### 10 6.2.7 Análisis de inmunofluorescencia por citometría de flujo

Para las suspensiones de médula ósea (BM) y esplenocitos de ratones, el bloqueo de los receptores de IgG se realizó con mAb 2.4G2 anti-Fc $\gamma$ 1R. Las células (1 x 10<sup>6</sup>) se tiñeron entonces con anticuerpo anti-TER-119 y anticuerpo anti-TfR1 de ratón. Las células teñidas se analizaron adicionalmente por citometría de flujo (FACScalibur; Becton Dickinson) usando el software FlowJo (Tree Star).

### 15 6.2.8 Recogida de tejidos e histología

Se recogieron médula ósea y bazo y se fijaron en formalina al 10 %, se incluyeron en parafina y se seccionaron a 3-6  $\mu$ m para la tinción con hematoxilina y eosina (H&E).

### 6.2.9 Cuantificación de hierro, ferritina, bilirrubina y transferrina.

20 Se extrajo sangre en tubos heparinizados y se centrifugó (5 min, 4 °C, 1.100 g). El plasma se centrifugó de novo (5 min, 4 °C, 1.100 g) para eliminar los glóbulos rojos contaminantes. Los parámetros bioquímicos se cuantificaron con un Olympus AU400 automático según las instrucciones del fabricante.

## 6.3 Resultados

### 6.3.1 mActRIIA-Fc mejora los parámetros hematológicos en ratones talasémicos.

25 La beta-talasemia es una enfermedad caracterizada por un defecto en la síntesis de hemoglobina que conduce a una maduración y producción de eritrocitos alterada. Se cree que la disminución de los eritrocitos se debe principalmente a la diferenciación eritroide acelerada anormalmente y a la apoptosis en el estadio tardío de eritroblastos basófilos/policromáticos de la diferenciación de glóbulos rojos que da lugar a una disminución general en la producción de glóbulos rojos maduros. La enfermedad se caracteriza por un compartimento hiper celular de la médula ósea en el que se acumulan eritroblastos anormales y sufren apoptosis, lo que resulta en anemia sistémica.

30 Para examinar el papel de los ligandos de TGF-BETA en el mecanismo de la enfermedad de la beta-talasemia, los ratones Hbbth1/th1 se trataron por vía subcutánea con mActRIIA-Fc (la contrapartida murina de la SEQ ID NO: 7) o PBS durante 0, 5, 10, 30 o 60 días (10 mg/kg de peso corporal) dos veces por semana (\*p <0,05, N=3-5 para cada experimento independiente). En comparación con los animales tratados con PBS, el tratamiento con mActRIIA-Fc aumentó significativamente los recuentos de glóbulos rojos (FIG 1A) y los niveles de hemocrito (FIG 1B) y hemoglobina (FIG 1C), con una disminución concomitante en los recuentos de reticulocitos (FIG 1D) (desde 10 días después del tratamiento hasta el día 60). El análisis de los parámetros de glóbulos rojos circulantes (RBC) también mostró que el volumen corpuscular medio (MCV) (FIG 1E), la hemoglobina corpuscular media (MCH) (FIG 1F) y la concentración de MCH (MCHC) (FIG 1G) aumentaron en todos los ratones tratados con mActRIIA-Fc, lo que sugiere que mActRIIA-Fc mejoró la anemia microcítica de la talasemia y restauró el contenido de hemoglobina por RBC. Además, la celularidad de la médula ósea y el bazo y los eritroblastos basófilos/policromáticos tardíos se redujeron significativamente después del tratamiento con mActRIIA-Fc. El análisis morfológico de los eritrocitos se evaluó mediante la tinción de May-Grünwald (MGG) y mostró una reducción en la anisocitosis, la poiquilocitosis y las células diana (FIG. 1I). Para determinar el efecto de mActRIIA-Fc en la anemia asociada con beta-talasemia, se evaluaron los niveles sistémicos de hierro (FIG. 1J), la síntesis de transferrina (FIG. 1K), la saturación de transferrina (FIG. 1L) y los niveles de ferritina (FIG. 1M) en los ratones talasémicos. La saturación de transferrina se redujo con la inducción de la síntesis de transferrina o la disminución de los niveles sistémicos de hierro (Figura 1L). También se evaluaron los niveles de plaquetas, monocitos, linfocitos y neutrófilos (FIG 1N).

50 Los efectos de mActRIIA-Fc sobre la esplenomegalia en ratones talasémicos se evaluaron por el peso del bazo y midiendo el número total de células del bazo. El número de células del bazo y el peso del bazo se redujeron en los animales tratados con mActRIIA-Fc en comparación con los ratones talasémicos tratados con PBS (FIG 1O). De manera similar, el número y la expansión de los eritroblastos de la médula ósea (según lo determinado por la tinción con eosina/hematoxilina) (FIG 1P) también disminuyeron en los ratones tratados con mActRIIA-Fc. Se recogieron la médula ósea y bazo y los eritroblastos se cuantificaron mediante citometría de flujo mediante tinción con TER119. El tratamiento con mActRIIA-Fc redujo significativamente el número de eritrocitos en los ratones talasémicos (Figura 1Q), lo que indica que corrigió la eritropoyesis ineficaz en los ratones.

55

### 6.3.2 mActRIIA-Fc reduce la eritropoyesis ineficaz en ratones talasémicos.

Para explorar más a fondo el papel de los ligandos de la superfamilia TGF-BETA en la eritropoyesis ineficaz en la beta-talasemia, se recogieron el bazo (FIG 2A, FIG 2C) y la médula ósea (FIG 2B, FIG 2C) y se evaluó la diferenciación de eritroblastos mediante citometría de flujo mediante tinción de CD71/TER119 y distribución de dispersión frontal/dispersión lateral (FSC/SSC). Un análisis del curso temporal del porcentaje de células en estadios progresivos en la diferenciación eritropoyética, proeritroblastos (Pro-E), eritroblastos basófilos (Ery-A), basófilos tardíos (Ery-B) y eritroblastos policromáticos y eritroblastos ortocromáticos (Ery-C), mostró que los ratones tratados con mActRIIA-Fc presentaban células TER119/CD71 inmaduras significativamente disminuidas (eritroblastos basófilos y policromáticos tardíos, Ery-B) en el bazo con un aumento concomitante en el porcentaje de eritroblastos ortocromáticos (Ery-C) (FIG 2A). Estos resultados estuvieron de acuerdo con la reducción por mActRIIA-Fc de la eritropoyesis ineficaz. Aunque hubo una disminución en los eritroblastos TER-199+ y en los números de Ery-B en la médula ósea de los ratones tratados con mActRIIA-Fc (FIG 2B), no hubo un aumento en la cantidad de eritroblastos maduros, lo que sugiere que la eritropoyesis ineficaz en la médula ósea de los ratones talasémicos no se corrige mediante el tratamiento de los ratones con mActRIIA-Fc.

La anemia crónica de la talasemia induce respuestas compensatorias de eritropoyesis por estrés. Sin embargo, estas respuestas son improductivas debido a la eritropoyesis ineficaz. La eritropoyesis ineficaz se caracteriza por un requerimiento de producción de RBC que no puede compensarse por una proliferación y diferenciación aceleradas de eritroblastos inmaduros debido a la muerte celular prematura por apoptosis de las células en maduración. Por lo tanto, la relación desequilibrada de eritroblastos inmaduros/maduros es una característica de la eritropoyesis ineficaz de la talasemia. Para estudiar más a fondo el impacto de mActRIIA-Fc en la diferenciación eritroide y en la eritropoyesis ineficaz, se marcaron suspensiones celulares de ratones tratados con mActRIIA-Fc y sus respectivos controles con anticuerpos frente a TfR1 y TER119. La diferenciación de los precursores eritroides fue analizada por citometría de flujo en la selección alta de TER119 como se ha descrito previamente (Liu et al., Blood 2006). Por consiguiente, los ratones tratados con mActRIIA-Fc presentaron una relación disminuida de la relación de eritroblastos inmaduros/maduros en el bazo, lo que indica la corrección de la eritropoyesis por estrés ineficaz. En la médula ósea, la relación de eritroblastos inmaduros/maduros no difirió entre el control y los ratones tratados con mActRIIA-Fc, lo que sugiere adicionalmente que la eritropoyesis ineficaz en la médula ósea de los ratones talasémicos no se corrigió por el tratamiento con mActRIIA-Fc. Estos resultados sugieren que los ligandos de ActRIIa contribuyen a la diferenciación de eritroblastos pero también a la eritropoyesis del bazo ineficaz en la  $\beta$ -talasemia.

La bilirrubina es un producto de la degradación de la hemoglobina y el aumento de la bilirrubina plasmática resultante de la hemólisis es una característica de la eritropoyesis ineficaz en la  $\beta$ -talasemia. En el análisis del curso temporal, los niveles séricos de bilirrubina total y directa disminuyeron en los ratones talasémicos tratados con mActRIIA-Fc a partir de los 5 días de tratamiento, lo que sugiere que la administración de mActRIIA-Fc afectó a la hemólisis resultante de la eritropoyesis ineficaz (FIG 2D). De acuerdo con los valores de bilirrubina, los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) sérica también se redujeron en animales tratados con mActRIIA-Fc en comparación con los controles después de 60 días de tratamiento (FIG 2D), lo que confirma adicionalmente que la hemólisis de tejido se redujo en los ratones tratados con mActRIIA-Fc.

La eritropoyesis en estadio tardío está comprometida en gran medida con la producción de la hemoglobina (Hb) transportadora de oxígeno, una proteína tetramérica compuesta por dos subunidades de  $\alpha$ -globina y dos de  $\beta$ -globina. La  $\beta$ -talasemia es una hemoglobinopatía hereditaria común caracterizada por la producción alterada o ausente del gen de la  $\beta$ -globina con la acumulación posterior de subunidades  $\alpha$  no apareadas. El exceso de  $\alpha$ -globina libre no unida en las células eritroides en maduración precipita y conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y al daño celular por estrés oxidativo que induce la muerte prematura de los precursores eritroides. El impacto de mActRIIA-Fc en la generación de precipitados de globina se investigó más a fondo. La generación de ROS en la diferenciación de pro-eritroblastos primarios se evaluó mediante citometría de flujo usando diclorodihidrofluoresceína (FIG 2E). Análisis de la solubilidad de la hemoglobina en pro-eritroblastos talasémicos primarios tratados durante 48 horas con mActRIIA-Fc o PBS (FIG 2F).

Para obtener información sobre los mecanismos celulares asociados con el tratamiento con mActRIIA-Fc, se cultivaron y recuperaron proeritroblastos derivados del bazo de ratones Hbbth1/th1 en presencia o en ausencia de mActRIIA-Fc. Se usó un modelo in vitro bien establecido de diferenciación de pro-eritroblastos (se cultivaron precursores del bazo durante 5 días en medio de expansión de células madre sin suero suplementado con factor de células madre de ratón, epo y dexametasona). Estos cultivos enriquecidos con pro-eritroblastos se diferenciaron entonces en presencia de 1U/ml de Epo y 1 mg/ml de Fe-Tf durante tres días. De manera similar a las observaciones in vivo, el tratamiento con mActRIIA-Fc aumentó las cantidades totales de hemoglobina en los eritroblastos talasémicos. Sin embargo, esas células presentaron cantidades disminuidas de hemoglobina precipitada asociada a la membrana en comparación con las células tratadas control (FIG 2F). Por consiguiente, la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) detectadas en esas células disminuyó en las células tratadas con mActRIIA-Fc (FIG 2E). Por lo tanto, el tratamiento con mActRIIA-Fc provocó una disminución de la precipitación de globina citotóxica y su producción de ROS asociada, lo que contribuyó a la eritropoyesis ineficaz. En conjunto, estos datos sugirieron que la toma como diana de la señalización de ActRIIa moduló la diferenciación de eritroblastos y la captura de ligandos de ActRIIa por mActRIIA-Fc corrigió la eritropoyesis ineficaz al favorecer la formación de eritroblastos maduros y reducir los precipitados de hemoglobina asociados a la membrana.

### 6.3.3 mActRIIA-Fc modula la apoptosis en ratones talasémicos.

La implicación de los miembros de la familia TGF-beta en el proceso apoptótico en la eritropoyesis ineficaz asociada a la beta-talasemia se investigó analizando la expresión de proteínas pro-apoptóticas en los eritrocitos usando citometría de flujo. Aunque no hubo cambios significativos en la expresión de las proteínas apoptóticas en los eritroblastos de la médula ósea (FIG 3A), el análisis de los eritroblastos del bazo mostró que Fas-L aumentó en la población de células Ery-B (FIG 3B). El análisis comparativo de citometría de flujo multiparamétrico en células del bazo de ratones tratados con PBS y mActRIIA-Fc mostró que la expresión de Fas-L aumentó en los eritroblastos basófilos y policromáticos tardíos inmaduros (Ery-B) y disminuyó en los eritroblastos ortocromáticos (Ery-C) (FIG 3B). Por el contrario, la expresión de Fas-L no fue modulada en los eritroblastos de BM (FIG 3A). Conjuntamente, estos resultados mostraron que la señalización de ActRIIa moduló la vía Fas/Fas-L en los eritroblastos en maduración. En conjunto, estos datos sugirieron que la señalización de ActRIIa indujo la muerte celular prematura de los eritroblastos en maduración comprometidos con la eritropoyesis ineficaz. Sorprendentemente, la expresión de Fas-L disminuyó en los subconjuntos de células Ery-A y Ery-C, lo que muestra que el impacto de la señalización de ActRIIa fue más pronunciado en los eritroblastos en maduración (FIG 3B). El número de células positivas para tunel también aumentó en animales tratados con mActRIIA-Fc (FIG 3C). La eritropoyesis ineficaz de la talasemia se caracteriza por una apoptosis masiva de eritroblastos en maduración. El estudio del impacto del tratamiento de mActRIIA-Fc en la apoptosis indicó que el tratamiento de ratones con mActRIIA-Fc presentó una disminución en el número de células positivas para tunel en comparación con sus respectivos controles (FIG 3C), lo que sugiere que la señalización de ActRIIa a través de la activación de Smad-2,3 podría controlar la eritropoyesis ineficaz al modular los niveles de apoptosis de los eritroblastos en maduración.

### 6.3.4 Los ligandos activina/GDF11 están sobreexpresados en el bazo de ratones talasémicos.

Los niveles de expresión de ARN (ARNm) de ActRII, activina A, activina B y GDF11 se evaluaron en el bazo de ratones de tipo salvaje y talasémicos mediante qPCR. Los niveles de ARNm de ActRII, activina A, activina B y GDF11 aumentaron, lo que sugiere que mActRIIA-Fc podría estar actuando a través de uno de sus ligandos en su mejora de la eritropoyesis ineficaz (FIG 4A). El análisis por transferencia Western de la proteína obtenida del bazo de ratones talasémicos tratados con mActRIIA-Fc mostró una disminución significativa en los niveles de proteína GDF11 en comparación con los ratones tratados con PBS (FIG 4B), lo que implica adicionalmente a GDF11 como el ligando de ActRIIa responsable de la eritropoyesis ineficaz. Un análisis inmunohistoquímico adicional reveló que los niveles de la proteína GDF11 (y en mucho menor medida activina A o activina B) aumentaron considerablemente en las biopsias de bazo de ratones talasémicos y se suprimieron en animales tratados con mActRIIA-Fc (FIG 3A). Estos resultados se confirmaron adicionalmente por inmunotransferencia (FIG 4B). A diferencia de las secciones de bazo, el análisis de los ligandos de ActRIIa en BM no mostró acumulación de GDF11 en ratones talasémicos (FIG 4B). Por lo tanto, la sobreexpresión de GDF11 en la sección del bazo de ratones talasémicos podría estar asociada con eritropoyesis ineficaz.

### 6.3.5 mActRIIA-Fc reduce el aumento de los niveles de expresión de GDF11 observados en pro-eritroblastos talasémicos primarios.

Para determinar qué miembros de la familia de TGF-beta podrían estar implicados en el tratamiento de la beta-talasemia con mActRIIA-Fc, se realizó un análisis inmunohistoquímico de proteínas en la ruta de señalización de activina/GDF. Los ratones talasémicos se trataron con PBS o mActRIIA-Fc durante 30 días y el bazo se recogió, se fijó y se tiñó para activina A, activina B, GDF8, GDF11, ActRII y p-Smad2 (FIG 5A). La tinción inmunohistoquímica mostró niveles aumentados de GDF11, ActRII y p-Smad2 en ratones talasémicos. Para explorar si las proteínas en la ruta de señalización de activina/GDF estaban sobreexpresadas en otros modelos de anemia en ratones, se comparó la expresión de activina A, activina B y GDF11 en ratones talasémicos con ratones en normoxia, hipoxia y alfaRBC (FIG 5B). El análisis FACS de pro-eritroblastos talasémicos primarios tratados con PBS o mActRIIA-Fc durante 48 horas y luego incubados con anticuerpos específicos frente a activina A, activina B, el péptido GDF11 y el péptido escindido GDF8/GDF11 indicó que el tratamiento con mActRIIA-Fc normalizó la expresión de GDF11. La cuantificación de la tinción de GDF11 indicó que el tratamiento de los ratones con mActRIIA-Fc redujo significativamente los niveles de GDF11 (FIG 5C). Esta reducción en la expresión de GDF11 tras el tratamiento de ratones talasémicos con mActRIIA-Fc se confirmó por análisis inmunohistoquímico de los bazo de los ratones (FIG. 5D). \*  $p < 0,05$ ,  $N=4$ . Por lo tanto, el hecho de que mActRIIA-Fc disminuyera la sobreexpresión de GDF11 en tejidos talasémicos fue una evidencia adicional de que mActRIIA-Fc corrigió la eritropoyesis ineficaz tomando como diana GDF11.

### 6.3.6 La neutralización de GDF11 restaura la diferenciación de eritroblastos.

Para determinar si el aumento de la expresión de GDF11 era responsable de la eritropoyesis ineficaz, se cultivaron pro-eritroblastos talasémicos en presencia de anticuerpos bloqueantes dirigidos frente a las activinas A y B y GDF11. Los anticuerpos anti-GDF1 1 (pero no los anticuerpos frente a activina A y B) promovieron la eritropoyesis, lo que confirma adicionalmente que la GDF11 regulaba negativamente la eritropoyesis induciendo eritropoyesis ineficaz como se cuantifica por citometría de flujo después de la tinción de CD71/TER119 (FIG. 6A). La generación de ROS en la diferenciación de pro-eritroblastos primarios se evaluó mediante citometría de flujo usando diclorodihidrofluoresceína (FIG. 6B). \*  $p < 0,05$ ,  $N=4$ . Por lo tanto, los anticuerpos bloqueantes anti-GDF11 restauraron la diferenciación celular y redujeron los agregados de hemoglobina en los eritroblastos talasémicos.

### 6.3.7 Un ensayo de detección de ligandos de ActRIIA

Se desarrolló un ensayo para detectar, identificar y cuantificar los ligandos de ActRIIA presentes en el suero sanguíneo y, específicamente, su expresión anormal en enfermedades asociadas con eritropoyesis ineficaz (p. ej., talasemia, síndromes mielodisplásicos, anemia perniciosa crónica y anemia de células falciformes). El ensayo consiste en un ELISA en sándwich basado en un recubrimiento de ActRIIA-Fc seguido de la detección de ligandos de ActRIIA presentes en el suero. El ensayo ELISA de ActRIIA se puede usar experimentalmente (p. ej., para animales) o clínicamente (p. ej., para pacientes humanos) para identificar, detectar y/o cuantificar los niveles de ligando o receptor en el suero sanguíneo con el fin de asistir en las decisiones sobre el tratamiento y/o determinar la efectividad de un tratamiento diseñado para modular los niveles de ligando o receptor de TGF-beta.

### 6.3.8 Los niveles de GDF11 están elevados en el suero de pacientes con talasemia.

El ensayo ELISA en sándwich descrito anteriormente se desarrolló para medir los niveles de GDF11 en suero. Las placas de ELISA se recubrieron con 5 microg/mL de mActRIIA-Fc (FIG 7A). Se añadieron dosis crecientes de GDF11 recombinante a las placas (0,1 ng/microlitro, 0,5 ng/microlitro, 2,5 ng/microlitro). Las placas se lavaron con PBS Tween al 0,1% y las proteínas unidas se detectaron usando anticuerpos anti-GDF8/11, seguido de la detección usando una IgG anti-conejo acoplada a peroxidasa de rábano picante. GDF11 se unió a las placas recubiertas con mActRIIA-Fc de una manera dependiente de la dosis, lo que indica que el ensayo podría usarse efectivamente para detectar y cuantificar los niveles de GDF11 (FIG 7B). El ELISA usando mActRIIA-Fc detectó tan poco como 100 pg/mL de GDF11 recombinante.

El suero de pacientes con talasemia se ensayó para determinar la expresión de GDF11 usando el ELISA en sándwich con mActRIIA-Fc. Como se muestra en la FIG 8, los niveles de GDF11 estaban elevados 3 veces en pacientes con talasemia en comparación con los niveles en controles sanos.

Para determinar si los niveles de otros ligandos de ActRIIA también estaban elevados en pacientes con talasemia, también se midieron los niveles de expresión de activina A y activina B en el suero de esos pacientes. También se desarrolló un ensayo ELISA para detectar activina A y activina B. Las placas de ELISA se recubrieron con 5 microgramos/mL de ActRIIA-Fc. Se añadieron dosis crecientes de activina A y activina B recombinantes a las placas (0,1 ng/microlitro, 0,5 ng/microlitro, 2,5 ng/microlitro). Las placas se lavaron con PBS Tween al 0,1%, y las proteínas unidas se detectaron con anticuerpos anti-activina A (FIG 9A) y anti-activina B (FIG 10A) (R&D systems), seguido de la detección usando una IgG anti-conejo acoplada a peroxidasa de rábano picante. Tanto la activina A (FIG 9B) como la activina B (FIG 10B) se unieron a las placas recubiertas con ActRIIA-Fc de una manera dependiente de la dosis, lo que indica que el ensayo podría usarse efectivamente para detectar y cuantificar ambas proteínas. Al igual que GDF11, la activina A y la activina B también se detectaron a niveles tan bajos como 100 pg/mL.

El ELISA de ActRIIA-Fc se usó para determinar los niveles de expresión de activina A y activina B en el suero de pacientes con talasemia. A diferencia de GDF11, ni los niveles de proteína activina A (FIG 9C) ni activina B (FIG 10C) estaban elevados en pacientes talasémicos, lo que indica que el ligando de ActRIIA GDF11 estuvo implicado de manera única en el proceso de la enfermedad de la talasemia.

### 6.3.9 mActRIIA-Fc no cambia los parámetros hematológicos en ratones de tipo salvaje.

Los ratones C57BL/6 de tipo salvaje se trataron durante 30 días con mActRIIA-Fc (10 mg/kg de BW dos veces por semana) o PBS. La evaluación de los recuentos de glóbulos rojos (FIG 11A), hematocrito (FIG 11B), hemoglobina (FIG 11C) indicaron ausencia de cambios en los niveles de los parámetros como resultado del tratamiento de los ratones con mActRIIA-Fc. Solo se observó una ligera disminución de la reticulocitosis (FIG 11D). mActRIIA-Fc tampoco alteró los parámetros de los glóbulos rojos (RBC) tales como MCV (FIG 11E), MCH (FIG 11F) y MCHC (FIG 12G). \* $p < 0,05$ ,  $N = 3-5$  para cada experimento independiente.

El efecto de mActRIIA-Fc sobre el bazo y la médula ósea también se evaluó en ratones C57BL/6 de tipo salvaje. mActRIIA-Fc aumentó el peso del bazo en ratones de tipo salvaje, pero no tuvo un efecto significativo sobre el número de células del bazo. mActRIIA-Fc tampoco tuvo efecto sobre el número de células de la médula ósea (FIG 12).

### 6.3.10 mActRIIA-Fc estimula la diferenciación eritropoyética a través de la inhibición de GDF11

Con el fin de investigar el mecanismo celular por el cual mActRIIA-Fc aumentó los parámetros de los glóbulos rojos, se realizó una serie de experimentos in vitro en los que no se encontró evidencia que respalde los efectos directos de mActRIIA-Fc sobre las células CD34+ humanas como se evaluó en ensayos de formación de colonias (FIG 13A) y en la diferenciación eritroide en cultivo líquido (FIG 13B y 13C). Como tanto los hallazgos clínicos como farmacológicos apuntaban a un papel claro para mActRIIA-Fc en la estimulación de los parámetros de los RBC, se planteó la hipótesis de que los efectos de mActRIIA-Fc podrían estar mediados por células auxiliares en el microentorno de la médula ósea (BM). Las células CD36+ humanas, que están altamente enriquecidas para los progenitores eritroides, se co-cultivaron con cultivos de BM a largo plazo y se evaluó entonces su diferenciación eritroide después de 6 días de cultivo en medios complementados con EPO (2U/mL). En el día 6, la producción de los cultivos se caracterizó predominantemente como EryA (~eritroblastos basófilos) pero con la adición de mActRIIA-Fc (50  $\mu$ M), una fracción significativa de células CD36+ maduró en células EryB/C (eritroblastos policromáticos/ortocromáticos), lo que sugiere



5 que los factores producidos por las células auxiliares de la BM mediaron los efectos eritropoyéticos de mActRIIA-Fc y que, a diferencia de la EPO, mActRIIA-Fc podría desempeñar un papel en los últimos estadios o la maduración de los eritroblastos (FIG 13D - 13F). Para identificar las citoquinas que podrían mediar los efectos de mActRIIA-Fc, las células CD36+ se trataron con varios ligandos de ActRIIA. El tratamiento con GDF11 disminuyó significativamente la proliferación de células positivas para la glicoproteína A (GPA+) durante el proceso de diferenciación y mActRIIA-Fc revirtió efectivamente este efecto, sin tener consecuencias en las células no tratadas (FIG 13G y 13H). Estos datos muestran que la inhibición de GDF11 media los efectos estimulantes eritropoyéticos de mActRIIA-Fc.

#### 6.4 Conclusión

10 En conjunto, los datos demuestran que la señalización de activina/BMP controla la diferenciación de eritroblastos y que el tomar como diana los receptores de BMP tipo II/activina tipo II puede disminuir la eritropoyesis ineficaz y mejorar la anemia en la beta-talasemia. En particular, los datos muestran la implicación de GDF11 en la anemia asociada a la beta-talasemia e indican que los niveles de GDF11 son importantes como biomarcadores en sujetos que tienen anemia.

7.Descripción de las secuencias

Tabla 1: Información de las secuencias

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
1	polipéptido precursor de ActRIIA humano	MGAAAKLAFVFLISCSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVVTQPTSNPVTPKPPYYNILLYSLVPLMLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLVPTQDPGPPPPSPLLGLKPLQLLEVKARGRFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKHENILQFIGAEKRGTSDVDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVVSWNELCHIAETMARGLAYLHEDIPLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFGALAKFEAGKSAGDTHGQVGTTRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELASRCTAADGPVDEYMLPFEFEEIGQHPSELDMQEVVVHKKRPRVLRDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMORLTNIITTEDIVTVVTMVTNVDFPPKESL
2	ActRIIA humano soluble (extracelular), secuencia de polipéptido procesado	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVVTQPTSNPVTPKPP
3	ActRIIA humano soluble (extracelular), secuencia de polipéptido procesado con los 15 aminoácidos C-terminales deletados	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVVTQPTSNPVTPKPP
4	secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína precursora de ActRIIA humana	ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGCCTTTCTTATCTCCTGTTC TTCAGGTGCTATACCTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTCTTTA ATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAAGTGTGTAACCGTGT TATGGTGACAAAGATAAACCGCGGCATTGTTTGTCTACCTGGAAGAATAT TTCTGTTCCATTGAAATAGTGAAACAAGTTGTTGGCTGGATGATATCA ACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTA TATTTTGTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTCTTATTT
		TCCAGAGATGGAAGTCAACAGCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGC CACCCATTACAACATCCTGCTCTATTCTTGGTGCCACTTATGTAAAT GCGGGGATTGTCAATTTGTGCATTTTGGGTGTACAGGCATCAAGATGGC CTACCCTCCTGTACTTGTTCCAACTCAAGACCCAGGACCAACCCCACTT CTCCATTAAGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAAGTGAAGCAAGG GGAAGATTTGGTTGTCTGGAAGGCCAGTTGCTTAACGAATATGTGGC TGTCAAAATATTTCCAATACAGGACAAAACAGTCATGGCAAAATGAATACG AAGTCTACAGTTTGCCTGGAATGAAGCATGAGAACATATTACAGTTCATT GGTGCAGAAAAACGAGGCACCAAGTGTGATGTGGATCTTTGGCTGATCAC AGCATTTTCAATGAAAAGGTTCACTATCAGACTTTCTTAAGGCTAATGTGG TCTCTGGAATGAACTGTGTCAATTTGCAGAAACCATGGCTAGAGGATTG GCATATTTACATGAGGATATACCTGGCTAAAAGATGGCCACAAACCTGC CATATCTCACAGGGACATCAAAGTAAAATGTGCTGTTGAAAAACAACC TGACAGCTTGCATTGCTGACTTTGGGTTGGCCTTAAAATTTGAGGCTGGC AAGTCTGCAGGCATACCCATGGACAGGTTGGTACCCGGAGGTACATGGC TCCAGAGGTATTAGAGGGTGCTATAAACTTCGAAAGGGATGCATTTTTGA GGATAGATATGTATGCCATGGGATTAGTCTATGGGAACCTGGCTTCTCGC TGTACTGCTGCAGATGGACCTGTAGATGAATACATGTTGCCATTTGAGGA GAAATTTGGCCAGCATCCATCTCTTGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGTGC ATAAAAAAGAGGGCTGTTTTAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGA ATGGCAATGCTCTGTGAAACCAATTGAAGAATGTTGGGATCAGGACGCAGA AGCCAGGTATCAGCTGGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCAGATGCAGA GACTAACAAATATTATTACCACAGAGGACATTGTAACAGTGGTACAATG GTGACAAATGTTGACTTTCTCCCAAAGAATCTAGTCTATGA

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
5	secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de ActRIIA humano soluble (extracelular)	ATACTTGGTAGATCAGAAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTG GGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCGTGTATGGTGACA AAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCC ATTGAAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGA CAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTTTGTT GCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCAGAGATG GAAGTCACACAGCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCC
6	proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIA fusionado a un dominio Fc	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCK (A) VSNKALPVPVIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT  CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGPFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHN (A) HYTQKLSLSLSPGK*
7	Dominio extracelular de ActRIIA humano fusionado a un dominio Fc humano	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGS IEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP EVTQPTSNPVTPKPPPTGGGHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPVIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
8	Secuencia líder de melitina de la abeja de la miel (HBML)	MKFLVNVAVLFMVVYISYIYA
9	Secuencia líder del activador de plasminógeno tisular (TPA)	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP
10	Líder de ActRIIA nativo	MGAAAKLFAVFLISCSGA
11	Secuencia N-terminal de ActRIIA-hFc y ActRIIA-mFc	ILGRSETQE
12	Proteína ActRIIA-Fc con delección de los 15 aminoácidos C-terminales del dominio extracelular de ActRIIA	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGS IEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP EVTQPTSNPVTPKPPPTGGGHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPVIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
13	ActRIIA-hFc sin procesar con secuencia líder de TPA	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQT GVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEK KDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVETQPTSNPVTPKPPPTGGGHTHTCP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL  PVVIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKLSLSLSPGK

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
14	Secuencia de ácido nucleico que codifica ActRIIA-hFc sin procesar con secuencia líder de TPA	ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGC AGTCTTCGTTTTCGCCCGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAAACTCAGG AGTGTCTTTTTTAAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAAC TG GTGTTGAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCCGCATTTGTTTTGCT ACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCCATTGAATAGTGAAACAAGGTTGTTGG CTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGA CAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAA AGTTTTCTTATTTCCGGAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCA GTTACACCTAAGCCACCACCGGTGGTGGAACTCACACATGCCCAACCGTG CCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAA AACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGCGGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGAC TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCC AGTCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGGAGAAC CACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAATGAGAATTC
15	ActRIIB humano soluble (extracelular), secuencia de polipéptido procesado con los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC delecionados y los 4 aminoácidos C-terminales del dominio EC delecionados (aminoácidos 25-130 de la SEQ ID NO: 28) y con una mutación L79D	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELV KKGWDDDFNICYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGP EVTYEPFP
16	secuencia de proteína precursora de ActRIIB humano (A64)	MTAPWVALALLWGSLW PGRGAEETRECIYY NANWELERTNQSLER CEGEQDKRLHCYASWA NSSGTIELVKKGCWLD DFNICYDRQECVATEEN PQVYFCCCEGNFCNER FTHLPEAGGPVETIYEP PPTAPTLTTLVLAISLL PIGGLSLIVLLAFWY RHRKPPYGHVDIHEDP GPPPPSLVGLKPLQL LEIKARGRFVGVKKAQ LMNDFVAVKIFPLQDK QSWQSEREIFSTPGMK HENLLQFIAAEKRGSN LEVELWLITAFHDKGS LTDYLNKNIITWNELC HVAETMSRGLSYLHED VPWCRGEGHKPSIAHR DFKSKNVLLKSDLTAV LADFGLA VRFE PGKPP GDTHGQVGTTRYMAPE VLEGAINFQDRAFLRI DMYAMGLVWLWELVSRV KAADGPVDEYMLPFEE EIGQHP SLEELQEVVV HKKMRPTIKDHWLKHG GLAQLCVTIEECWDHD AEARLSAGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSL VTSVTNVDLPPKESSI
17	ActRIIB humano soluble (extracelular), secuencia de polipéptido procesado (aminoácidos 19-134 de la SEQ ID NO: 16)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWLD DFNICYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTIYEPPTAPT
18	ActRIIB humano soluble (extracelular), secuencia de polipéptido procesado con los 15 aminoácidos C-terminales delecionados (aminoácidos 19-119 de la SEQ ID NO: 16)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWLD DFNICYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE A

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
19	secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína precursora de ActRIIB humano (A64)	ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGGCC
		<p>CGGCTCTGGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACG          CCAACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAA          GCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACAGCTC          TGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACT          GCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTAC          TTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTTGCC          AGAGGCTGGGGGCCCGAAGTCACGTACGAGCCACCCCGACAGCCCCCA          CCCTGCTCACGGTGTGGCCCTACTCACTGCTGCCCATCGGGGCCCTTTCC          CTCATCGTCTGCTGGCCTTTTGGATGTACCGGCATCGCAAGCCCCCTA          CGGTCATGTGGACATCCATGAGGACCCCTGGGCCTCCACCACCATCCCCCT          TGGTGGGCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAAGGCTCGGGGGCGC          TTTGGCTGTGTCTGGAAGGCCAGCTCATGAATGACTTTGTAGCTGTCAA          GATCTTCCCACTCCAGGACAAGCAGTCTGTCGAGAGTGAACGGGAGATCT          TCAGCACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCCTGCTACAGTTCATTGCTGCC          GAGAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAGCTGTGGCTCATCAGGCCTT          CCATGACAAGGGCTCCCTCACGGATTACCTCAAGGGGAACATCATCACAT          GGAACGAACTGTGTATGTAGCAGAGACGATGTACAGGCGCTCTCATA          CTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGGCCTGGCGAGGGCCACAAGCCGTCTAT          TGCCACAGGGACTTTAAAAGTAAGAATGTATTGCTGAAGAGCGACCTCA          CAGCCGTGCTGGCTGACTTTGGCTTGGCTGTTTCGATTTGAGCCAGGAAA          CCTCCAGGGGACACCCACGGACAGGTAGGCACGAGACGGTACATGGCTCC          TGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTTCCAGAGAGATGCCTTCTGCGCA          TTGACATGTATGCCATGGGGTGGTGTGTGGGAGCTTGTGTCTCGCTGC          AAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATGAGTACATGCTGCCCTTTGAGGAAGA          GATTGGCCAGCACCCCTTCGTTGGAGGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTGCACA          AGAAGATGAGGGCCACATTAAAGATCACTGGTTGAAACACCCGGGCTTG          GCCAGCTTTGTGTGACCATCGAGGAGTGTGGGACCATGATGCAGAGGC          TCGCTTGTCCGCGGGCTGTGTGGAGGAGCGGGTGTCCCTGATTGCGAGGT          CGGTCAACGGCACTACCTCGGACTGTCTCGTTTCCCTGGTGACCTCTGTC          ACCAATGTGGACCTGCCCCCTAAAGAGTCAAGCATCTAA</p>
20	proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIB (A64; SEQ ID NO: 17) fusionado a un dominio Fc	<p>SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG          TIELVKKGCWLDFFNFCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE          AGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI          SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV</p>
		<p><input type="checkbox"/> No se puede mostrar la imagen vinculada. Puede que se haya movido, cambiado de nombre o eliminado el archivo. Compruebe que el vínculo apunte al archivo y utilice las opciones correctas.</p>
21	proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIB (A64) con los 15 aminoácidos C-terminales delecionados (SEQ ID NO: 18) fusionado a un dominio Fc	<p>SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG          TIELVKKGCWLDFFNFCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE          AGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSH          EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE          YKCKVSNKALPVIIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL          VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ          QGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
22	ActRIIB humano soluble (extracelular), secuencia de polipéptido procesado con los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC delecionados y los 5 aminoácidos C-terminales del dominio EC delecionados (aminoácidos 25-129 de la SEQ ID NO: 28) y con una mutación L79D	<p>ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELV          KKGWDDFFNFCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGP          EVTYEPP</p>

ES 2 753 811 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
23	ActRIIB humano soluble (extracelular), secuencia de polipéptido procesado con los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC delecionados y los 3 aminoácidos C-terminales del dominio EC delecionados (aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 28) y con una mutación L79D	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELV KKGWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGP EVTYEPPT
24	Proteína de fusión ActRIIB-Fc sin procesar con los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC delecionados y los 3 aminoácidos C-terminales del dominio EC delecionados (aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 28) y con una mutación L79D y con secuencia líder de TPA	MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSPGAAETRECIYYNANWELERTNQSLERC EGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTGGGHTCPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
25	Proteína de fusión ActRIIB-Fc procesada con los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC delecionados y los 3 aminoácidos C-terminales del dominio EC delecionados (aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 28) y con una mutación L79D	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELV KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEV TYEPPTGGGHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
26	ActRIIB humano soluble (extracelular), secuencia de polipéptido procesado (aminoácidos 20-134 de la SEQ ID NO: 16)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWLDFFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPT
27	ActRIIB humano soluble (extracelular), secuencia de polipéptido procesado con los 15 aminoácidos C-terminales delecionados (aminoácidos 20-119 de la SEQ ID NO: 16)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWLDFFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE A
28	secuencia de proteína precursora de ActRIIB humano (R64)	MTAPWVALALLWGSW PGSGRGEAETRECIYY NANWELERTNQSLER CEGEQDKRLHCYASWR NSSGTIELVKKGCWLD DFNCYDRQECVATEEN PQVYFCCCEGNFCNER FTHLPEAGGPEVTYEP PPTAPTLTTLVLA YSLLP IGGLSLIVLLAFWY RHRKPPYGHVDIHEDP GPPPSPLVGLKPLQL LEIKARGRFVWKAQ LMNDFVAVKIFPLQDK QSWQSEREIFSTPGMK HENLLQFIAAEKRGSN LEVELWLITAFHDKGS LTDYLGNIITWNELC HVAETMSRGLSYLHED VPWCRGEGHKPSIAHR DFKSKNVLLKSDLTAV LADFGAVRFEPGKPP GDTHGQVCTRYMAPE VLEGAINFQRDAFLRI DMYAMGLVWELVSRV KAADGPVDEYMLPFEE EIGQHPSELELQEVVV HKKMRPTIKDHWLKHP GLAQLCVTIEECWDHD AEARLSAGCVEERVSL IRRSVNGTTSDCVLSL VTSVTNVDLPPKESSI
29	ActRIIB humano soluble (extracelular), secuencia de polipéptido procesado	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDFFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPT

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
	(aminoácidos 19-134 de la SEQ ID NO: 28)	
30	ActRIIB humano soluble (extracelular), secuencia de polipéptido procesado con los 15 aminoácidos C-terminales delecionados (aminoácidos 19-119 de la SEQ ID NO: 28)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE A
31	ActRIIB humano soluble (extracelular), secuencia de polipéptido procesado (aminoácidos 20-134 de la SEQ ID NO: 28)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPT
32	ActRIIB humano soluble (extracelular), secuencia de polipéptido procesado con los 15 aminoácidos C-terminales delecionados (aminoácidos 20-119 de la SEQ ID NO: 28)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE A
33	ActRIIB humano soluble (extracelular), secuencia de polipéptido procesado con los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC delecionados y los 3 aminoácidos C-terminales del dominio EC delecionados (aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 16) y con una mutación L79D	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELV KKGCVDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGP EVTYEPPT
34	Proteína de fusión ActRIIB-Fc sin procesar con los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC delecionados y los 3 aminoácidos C-terminales del dominio EC delecionados (aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 16) y con una mutación L79D y con secuencia líder de TPA	MDAMKRG LCCVLLLCGAVFVSPGAAETRECIYYNANWELERTNQSLERC EGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTGGGHTCPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMSRTPTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYT  QKSLSLSPGK*
35	Proteína de fusión ActRIIB-Fc procesada con los 6 aminoácidos N-terminales del dominio EC delecionados y los 3 aminoácidos C-terminales del dominio EC delecionados (aminoácidos 25-131 de la SEQ ID NO: 16) y con una mutación L79D	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVK KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEV TYEPPTGGGHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPTEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
36	ActRIIB humano soluble (extracelular), secuencia de polipéptido procesado (aminoácidos 20-134 de la SEQ ID NO: 28) con mutación L79D	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPT

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
37	ActRIIB humano soluble (extracelular), secuencia de polipéptido procesado (aminoácidos 20-134 de la SEQ ID NO: 16) con mutación L79D	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGG
38	ActRIIB humano soluble (extracelular), secuencia de polipéptido procesado (aminoácidos 20-134 de la SEQ ID NO: 28) con mutación L79D fusionado a un dominio Fc con un conector GGG	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMSRTPTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHT QKSLSLSPGK*
39	ActRIIB humano soluble (extracelular), secuencia de polipéptido procesado (aminoácidos 20-134 de la SEQ ID NO: 16) con mutación L79D fusionado a un dominio Fc	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMSRTPTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHT QKSLSLSPGK*
40	ActRIIB humano soluble (extracelular), secuencia de polipéptido procesado (aminoácidos 20-134 de la SEQ ID NO: 28) con mutación L79D fusionado a un dominio Fc y con una secuencia líder de TPA	MDAMKRGLCVLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSG LERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMSRTPTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHT QKSLSLSPGK*
41	ActRIIB humano soluble (extracelular), secuencia de polipéptido procesado (aminoácidos 20-134 de la SEQ ID NO: 16) con mutación L79D fusionado a un dominio Fc y con una secuencia líder de TPA	MDAMKRGLCVLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSG LERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMSRTPTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHT QKSLSLSPGK*
42	ActRIIB humano soluble (extracelular), secuencia de polipéptido procesado que tiene una secuencia C-terminal variante (descrita en WO2007/053775)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGT IELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQGGALWLCLEGPAHE
43	ActRIIB humano soluble (extracelular), secuencia de polipéptido procesado que tiene una secuencia C-terminal variante (descrita en WO2007/053775) que tiene una mutación L79D	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGT IELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQGGALWLCLEGPAHE



ES 2 753 811 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
44	ActRIIB humano soluble (extracelular), secuencia de polipéptido procesado que tiene una secuencia C-terminal variante (descrita en WO2007/053775) que tiene una mutación L79D fusionado a un dominio Fc con un conector TGGG	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGT IELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQGS GALWLCLEGP AHE TGGGTHTCP PPAPELLGG PSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
45	Secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 24	ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTTGGGAGC AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCCGAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA ATGCTAATTG GGAACCGAA CGGACGAACC AATCCGGGCT CGAACGGTGT GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTCTGT GGAGGAACTC CTCCGGGACG ATTGAACTGG TCAAGAAAAG GTGCTGGGAC GACGATTTCA ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTCCGCA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC TATTTCTGTT GTTGCAGAGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT CCCC GAAGCG GGCGGGCCCG AGGTGACCTA TGAACCCCG CCCACCGGTG GTGGA ACTCA CACATGCCCA CCGTGCC CAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC
		AAGGACACC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTC AA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAGCC CTCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACACAG GTGTACACCC TGCCCCATC CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACA ACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCTTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACAG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA
46	proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIB (R64; SEQ ID NO: 29) fusionado a un dominio Fc	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCP PPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMIS SRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVP I EKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
47	proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIB (R64) con los 15 aminoácidos C-terminales delecionados (SEQ ID NO: 30) fusionado a un dominio Fc	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGTHTCP PPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCV VVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPVP I EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQ QGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ES 2 753 811 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
48	proteína precursora sin procesar de longitud completa GDF11, es decir, preproteína GDF11	<p>MVLAAPLLLGFLLLALELRPRGEAAEGPAAAAAAAAA  AAAAGVGGERSRPPAPSVAPEPDGCPVCVWRQHSREL  RLESIKSQILSKLRLKEAPNISREVVKQLLPKAPPLQIL  DLHDFQGDALQPEDFLEEDEYHATTETVISMAQETDPA  VQTDGSPLCCHFHFSPKVMFTKVLKAQLWVYLRPVP  PATVYLQILRLKPLTGEGTAGGGGGRRHIRIRSLKIEL  HSRSGHWQSIDFKQVLHSWFRQPQSNWGIEINAFDPSG  TDLAVTSLGPGAEGLHPFELRVLENTKRSRRNLGLDC  DEHSSESRCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCS  GQCEYFMQKYPHTHLVQQANPRGSAGPCCTPTKMSP  INMLYFNDKQQIYGKIPGMVVDRCGCS</p>
49	Secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO:48	<p>ATGGTGCTCGCGGCCCGCTGCTGCTGGGCTTCCTGC  TCCTCGCCCTGGAGCTGCGGCCCGGGGGAGGCGG  CCGAGGGCCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGGCG  GCGGCGGACGCGCGGGGGTTCGGGGGGAGCGCTC  CAGCCGGCCAGCCCGTCCGTGGCGCCCGAGCCGGA  CGGCTGCCCGTGTGCGTTTGGCGGCAGCACAGCCG  CGAGCTGCGCCTAGAGAGCATCAAGTCGCAGATCTT  GAGCAAACCTGCGGCTCAAGGAGGCGCCCAACATCAG  CCGCGAGGTGGTGAAGCAGCTGCTGCCAAGGCGCC  GGCGTGCAGCAGATCCTGGACCTACAGACTTCCA  GGCGCAGCGCTGACGCCGAGGACTTCCTGGAGGA  GGACGAGTACCACGCCACCACCGAGACCGTCATTAG  CATGGCCAGGAGACGGACCCAGCAGTACAGACAGA  TGGCAGCCCTCTCTGCTGCCATTTTCACTTCAGCCCC  AAGGTGATGTTCAAAAAGGTACTGAAGGCCAGCTG  TGGGTGTACCTACGGCCTGTACCCCGCCAGCCACA  GTCTACCTGCAGATCTTGGACTAAAACCCCTAACTG  GGGAAGGGACCGCAGGGGGAGGGGGCGGAGGCCGG  CGTCACATCCGATCCGCTCACTGAAGATTGAGCTGC  ACTCACGCTCAGGCCATTGGCAGAGCATCGACTTCA  AGCAAGTGCTACACAGCTGGTTCCGCCAGCCACAGA  GCAACTGGGGCATCGAGATCAACGCCTTTGATCCCA  GTGGCACAGACCTGGCTGTACCTCCCTGGGGCCGG  GAGCCGAGGGGCTGCATCCATTATGGAGCTTCGAG  TCCTAGAGAACACAAAACGTTCCCGCGGAACCTGG  GTCTGGACTGCGACGAGCACTCAAGCGAGTCCCGCT  GCTGCCGATATCCCTCACAGTGGACTTTGAGGCTTT  CGGCTGGGACTGGATCATCGCACCTAAGCGCTACAA  GGCCAACTACTGCTCCGGCCAGTGGAGTACATGTT  ATGCAAAAATATCCGCATACCCATTTGGTGCAGCAG  GCCAATCCAAGAGGCTCTGCTGGGCCCTGTTGTACCC  CCACCAAGATGTCCCAATCAACATGCTCTACTTCAA  TGACAAGCAGCAGATTATCTACGGCAAGATCCCTGG  CATGGTGGTGGATCGCTGTGGCTGCTCT</p>
50	Propéptido GDF11 de la proteína GDF11 humana	<p>AEGPAAAAAAAAAAAAAGVGGERSRPPAPSVAPEPDG  CPVCVWRQHSRELRLLESIKSQILSKLRLKEAPNISREVV  KQLLPKAPPLQILDLHDFQGDALQPEDFLEEDEYHAT  TETVISMAQETDPAVQTDGSPLCCHFHFSPKVMFTKVL  KAQLWVYLRPVP  PATVYLQILRLKPLTGEGTAGGGG  GRRHIRIRSLKIELHSRSGHWQSIDFKQVLHSWFRQPQ  SNWGIEINAFDPSG  TDLAVTSLGPGAEGLHPFELRVLE    NTKRSRR</p>

## ES 2 753 811 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
51	Secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO:50	GCCGAGGGCCCCGCGGCCGGCGGGCGGCGGCGGCGGCGGC GGCGGGCGGCGAGCGCGGGGGTTCGGGGGGGAGCGCT CCAGCCGGCCAGCCCCGTCCGTGGCGCCCCGAGCCGG ACGGCTGCCCGTGTGCGTTTTGGCGGCAGCACAGCC GCGAGCTGCGCCTAGAGAGCATCAAGTTCGCAGATCT TGAGCAAACGCGGCTCAAGGAGGCGCCCAACATCA GCCGCGAGGTGGTGAAGCAGCTGCTGCCAAAGGCCG CGCCGCTGCAGCAGATCCTGGACCTACACGACTTCC AGGGCGACGCGCTGCAGCCGAGGACTTCCTGGAGG AGGACGAGTACCACGCCACCACCGAGACCCTCATT GCATGGCCCAGGAGACGGACCCAGCAGTACAGACAG ATGGCAGCCCTCTCTGCTGCCATTTCACTCAGCCC CAAGGTGATGTTACAAAAGGTACTGAAGGCCCAGCT GTGGGTGATACCTACGGCCTGTACCCCGCCAGCCAC AGTCTACCTGCAGATCTTGCGACTAAAACCCCTAACT GGGAAGGGACCGCAGGGGGAGGGGGCGGAGGCCG GCGTCACATCCGTATCCGCTCACTGAAGATTGAGCTG CACTCACGCTCAGGCCATTGGCAGAGCATCGACTTC AAGCAAAGTGTACACAGCTGGTTCGCCAGCCACAG AGCAACTGGGGCATCGAGATCAACGCCTTTGATCCC AGTGGCACAGACCTGGCTGTCACCTCCCTGGGGCCG GGAGCCGAGGGGCTGCATCCATTGAGGCTTCGA GTCCTAGAGAACACAAAAACGTTCCCGGCGG
52	Proteína GDF11 humana madura	NLGLDCDEHSSSRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRY KANYCSGQCEYMFQKYPHTLVQANPRGSAGPCC TPTKMSPINMLYFNDKQQIYKIPGMVVDRCGCS
53	Secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO:52	AACCTGGGTCTGGACTGCGACGAGCACTCAAGCGAG TCCCGCTGCTGCCGATATCCCCTCACAGTGGACTTTG AGGCTTTCGGCTGGGACTGGATCATCGCACCTAAGC GCTACAAGGCCAACTACTGCTCCGGCCAGTGGGAGT ACATGTTTCATGCAAAAATATCCGCATACCCATTTGGT GCAGCAGGCCAATCCAAGAGGCTCTGCTGGGGCCCTG TTGTACCCCCACCAAGATGTCCCAATCAACATGCTC TACTTCAATGACAAGCAGCAGATTATCTACGGCAAG ATCCCTGGCATGGTGGTGGATCGCTGTGGTGTCTCT
54	Dominio extracelular de ActRIIA murino fusionado a un dominio Fc murino ("mActRIIA-Fc")	Contraparte murina de la SEQ ID NO: 7

**REIVINDICACIONES**

1. Un inhibidor del receptor de activina tipo II para uso en un método para el tratamiento de anemia, beta talasemia, o para aumentar los niveles de glóbulos rojos o eritroblastos ortocromáticos (Ery-C) en un sujeto que lo necesite, en donde el método comprende:

5 (a) evaluar el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido del sujeto, y

(b) si el nivel y/o actividad de GDF11 está elevado sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11, administrar un inhibidor del receptor de activina tipo II al sujeto,

en donde el inhibidor del receptor de activina tipo II es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

a	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 2;
b	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 2;
c	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 2;
d	SEQ ID NO:2;
e	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 3;
f	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 3;
g	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 3;
h	SEQ ID NO:3;
i	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 6;
j	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 6;
k	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 6;
l	SEQ ID NO:6;
m	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 7;
n	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 7;
o	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 7;
p	SEQ ID NO:7;
q	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 12;
r	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 12;
s	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 12;
t	SEQ ID NO:12;
u	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 17;
v	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 17;

ES 2 753 811 T3

w	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 17;
x	SEQ ID NO:17;
y	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 20;
z	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 20;
aa	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 20;
bb	SEQ ID NO:20;
cc	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 21;
dd	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 21;
ee	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 21;
ff	SEQ ID NO:21
gg	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 22;
hh	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 22;
ii	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 22;
jj	SEQ ID NO:22;
kk	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 23;
ll	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 23;
mm	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 23;
nn	SEQ ID NO:23;
oo	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 24;
pp	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 24;
qq	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 24;
rr	SEQ ID NO:24;
ss	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 25;
tt	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 25;
uu	98% idéntica a SEQ ID NO: 25; y
vv	SEQ ID NO:25;

o

en donde el inhibidor del receptor de activina tipo II es un polipéptido que comprende el dominio extracelular del receptor de activina tipo IIA unido a la porción Fc de un anticuerpo;

o

5 en donde el inhibidor del receptor de activina tipo II es un polipéptido que comprende el dominio extracelular del receptor de activina tipo IIB unido a la porción Fc de un anticuerpo.

2. Un inhibidor del receptor de activina tipo II para uso en un método para el tratamiento de anemia, beta talasemia, o para aumentar los niveles de glóbulos rojos o eritroblastos ortocromáticos (Ery-C) en un sujeto que lo necesite, en donde el método comprende:

(a) administrar un inhibidor del receptor de activina tipo II, y

10 (b) monitorizar el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido del sujeto,

en donde el inhibidor del receptor de activina tipo II es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

a	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 2;
b	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 2;
c	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 2;
d	SEQ ID NO:2;
e	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 3;
f	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 3;
g	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 3;
h	SEQ ID NO:3;
i	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 6;
j	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 6;
k	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 6;
l	SEQ ID NO:6;
m	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 7;
n	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 7;
o	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 7;
p	SEQ ID NO:7;
q	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 12;
r	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 12;
s	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 12;
t	SEQ ID NO:12;

ES 2 753 811 T3

u	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 17;
v	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 17;
w	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 17;
x	SEQ ID NO:17;
y	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 20;
z	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 20;
aa	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 20;
bb	SEQ ID NO:20;
cc	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 21;
dd	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 21;
ee	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 21;
ff	SEQ ID NO:21
gg	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 22;
hh	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 22;
ii	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 22;
jj	SEQ ID NO:22;
kk	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 23;
ll	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 23;
mm	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 23;
nn	SEQ ID NO:23;
oo	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 24;
pp	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 24;
qq	98 % idéntica a la SEQ ID NO: 24;
rr	SEQ ID NO:24;
ss	90 % idéntica a la SEQ ID NO: 25;
tt	95 % idéntica a la SEQ ID NO: 25;
uu	98% idéntica a SEQ ID NO: 25; y

vv	SEQ ID NO:25;
----	---------------

o

en donde el inhibidor del receptor de activina tipo II es un polipéptido que comprende el dominio extracelular del receptor de activina tipo IIA unido a la porción Fc de un anticuerpo;

5 o

en donde el inhibidor del receptor de activina tipo II es un polipéptido que comprende el dominio extracelular del receptor de activina tipo IIB unido a la porción Fc de un anticuerpo.

3. El inhibidor del receptor de activina tipo II para uso de la reivindicación 2, en donde el método comprende:

(a) administrar una cantidad de dosis de un inhibidor del receptor de activina tipo II,

10 (b) evaluar el nivel y/o actividad de GDF11 en una muestra de tejido del sujeto, y

(c) ajustar la cantidad de dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II,

en donde, si el nivel y/o actividad de GDF11 está elevado sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11, la cantidad de dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II se aumenta, y

15 en donde, si el nivel y/o actividad de GDF11 está disminuido sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11, la cantidad de dosis del inhibidor del receptor de activina tipo II se disminuye.

4. El inhibidor del receptor de activina tipo II para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha administración da como resultado un recuento celular disminuido de eritroblastos basófilos y policromáticos tardíos en el paciente.

20 5. El inhibidor del receptor de activina tipo II para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el nivel y/o actividad de GDF11 es el nivel de proteína de GDF11; o en donde el nivel y/o actividad de GDF11 es el nivel de ARNm de GDF11.

25 6. El inhibidor del receptor de activina tipo II para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el nivel y/o actividad de GDF11 está elevado sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11 cuando está elevado al menos un 25 %, al menos un 50 %, al menos un 75 %, al menos un 100 % o al menos un 200 % sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11.

7. El inhibidor del receptor de activina tipo II para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el nivel y/o actividad de GDF11 está elevado sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11 cuando está elevado al menos 2 veces sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11.

30 8. El inhibidor del receptor de activina tipo II para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en donde el nivel y/o actividad de GDF11 está disminuido sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11 cuando está disminuido al menos un 25 %, al menos un 50 %, al menos un 75 %, o al menos un 90 % sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11.

9. El inhibidor del receptor de activina tipo II para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en donde el nivel y/o actividad de GDF11 está disminuido sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11 cuando está disminuido al menos 2 veces sobre el nivel y/o actividad normal de GDF11.

35 10. El inhibidor del receptor de activina tipo II para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el nivel y/o actividad normal de GDF11 es un nivel y/o actividad promedio de GDF11 en una muestra del mismo tejido de uno o más sujetos sanos en la misma categoría de edad.

11. El inhibidor del receptor de activina tipo II para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el tejido es suero, médula ósea, hígado o bazo.

40 12. El inhibidor del receptor de activina tipo II para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el sujeto es humano.

13. El inhibidor del receptor de activina tipo II para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la porción Fc de un anticuerpo es la porción Fc de un anticuerpo IgG1.



FIG 1A

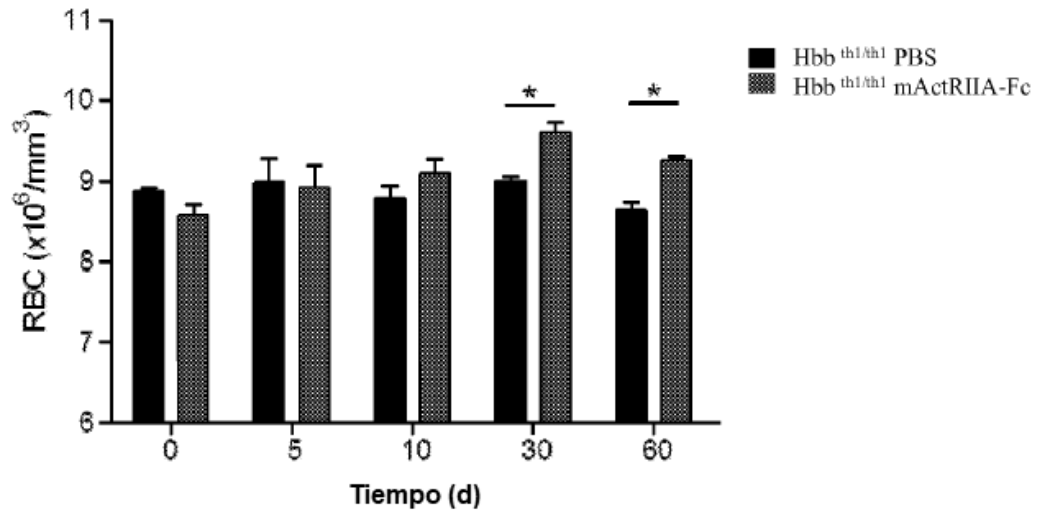


FIG 1B

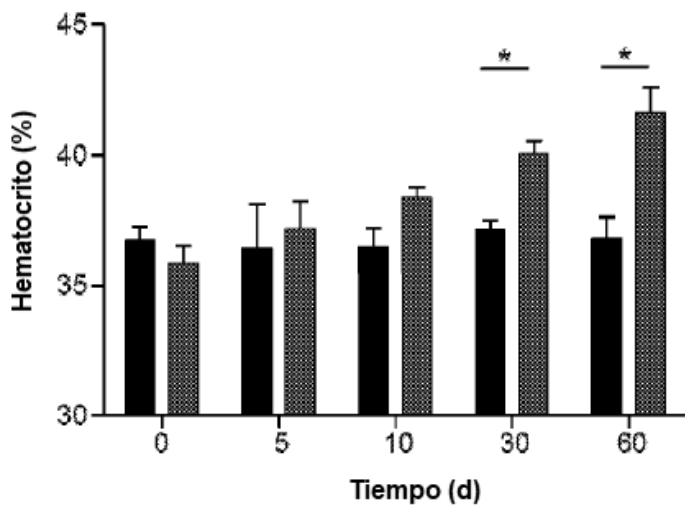


FIG 1C

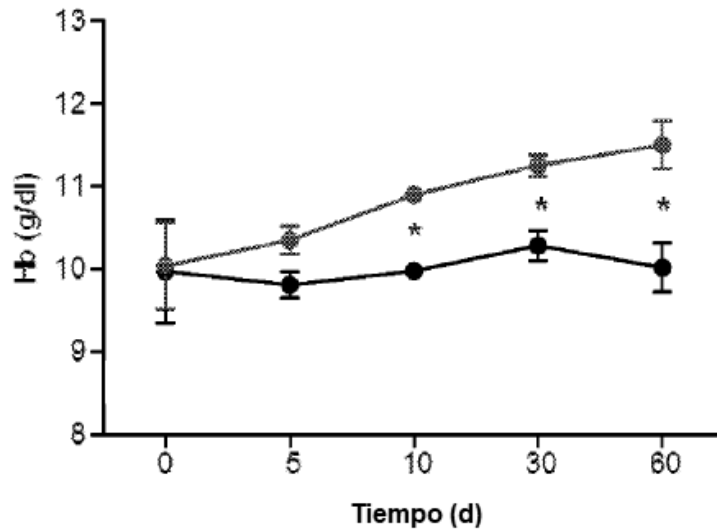


FIG 1D

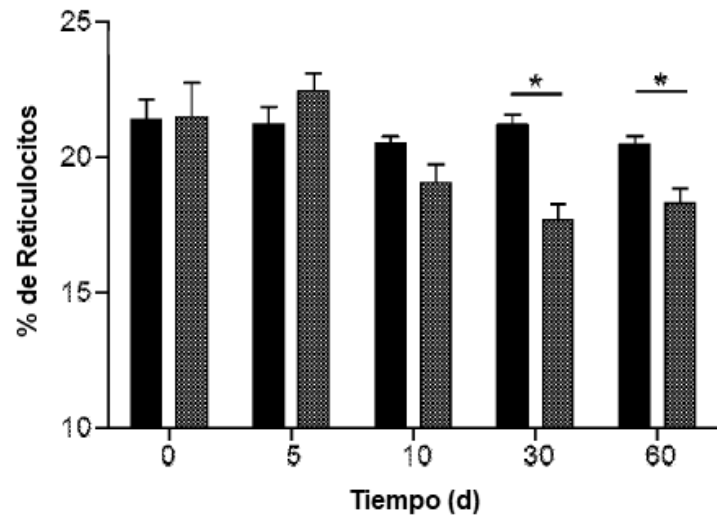
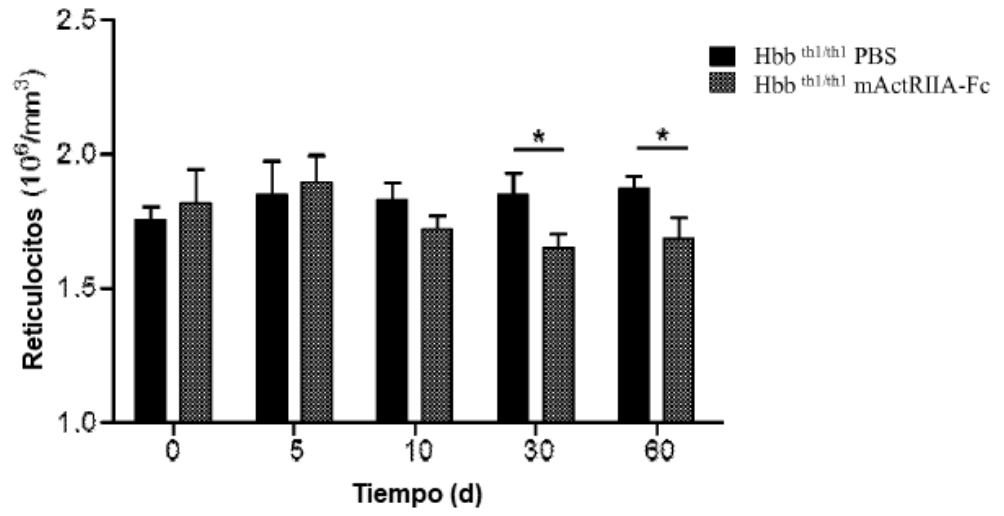


FIG 1E

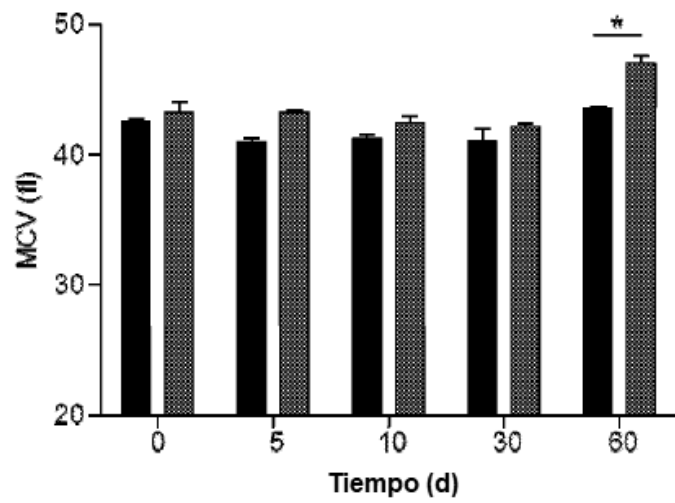


FIG 1F

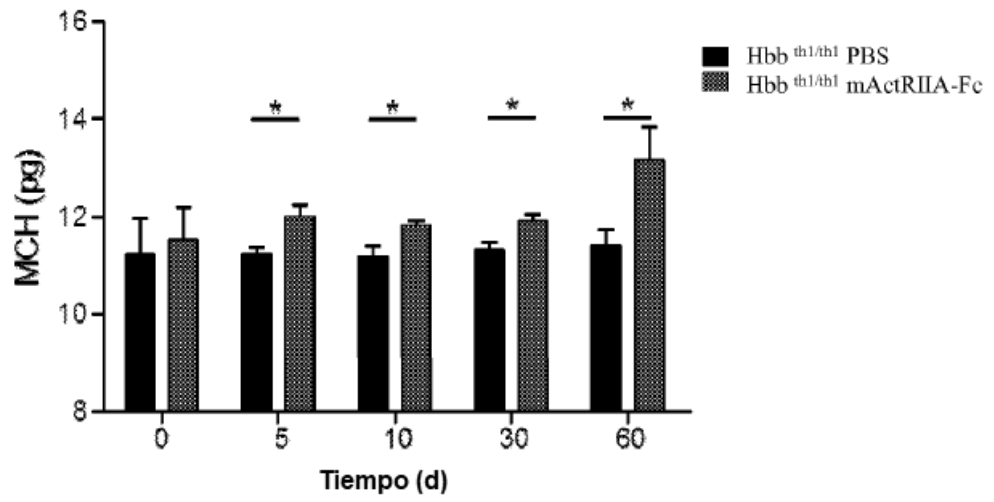


FIG 1G

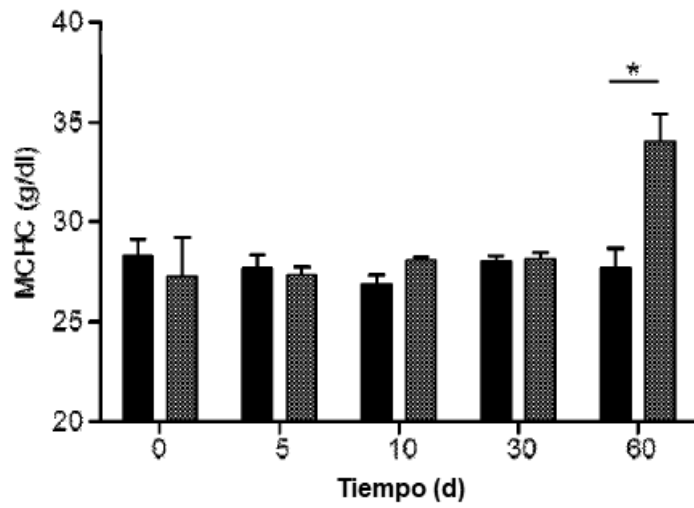
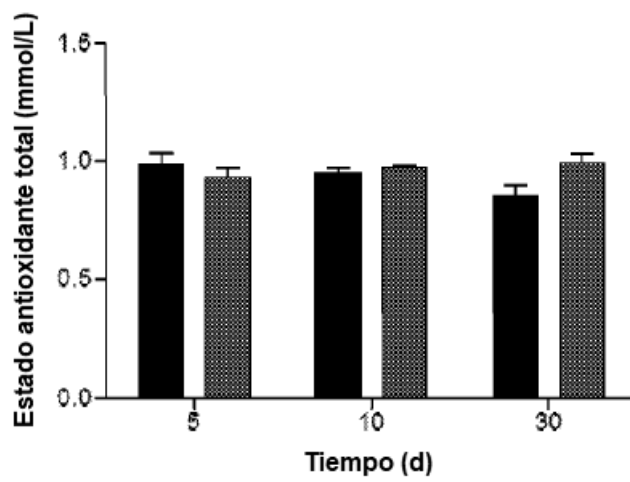
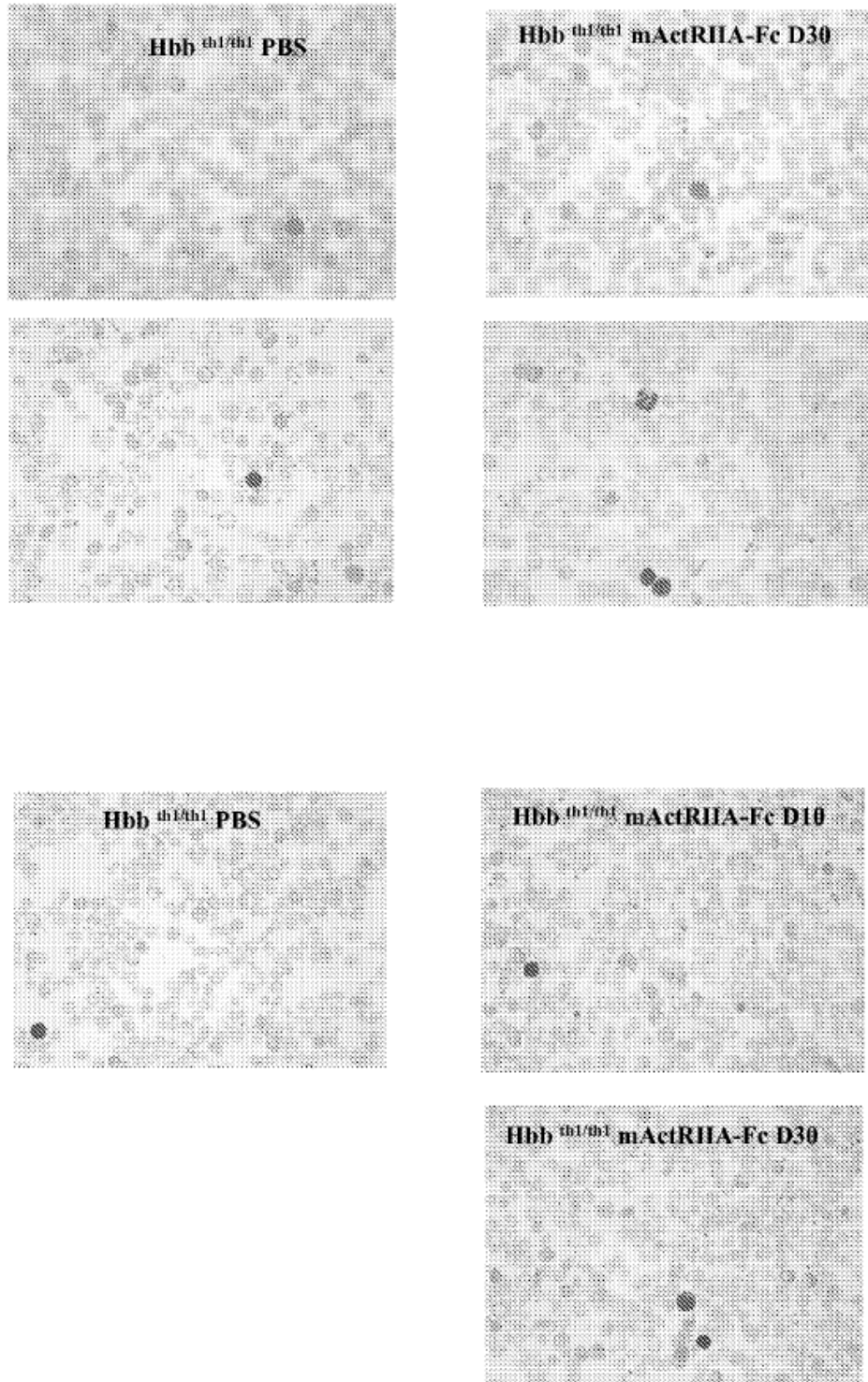


FIG 1H





**FIG 11**

FIG 1J

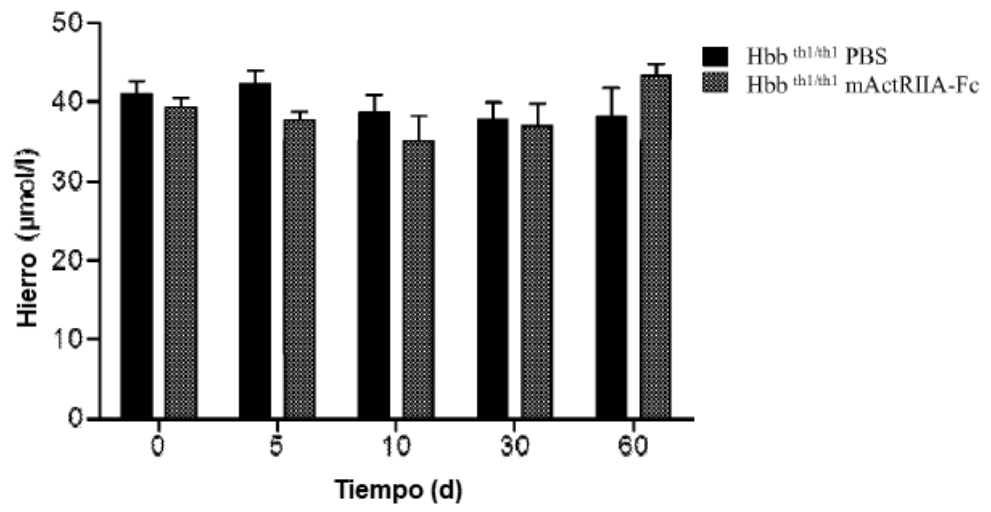


FIG 1K

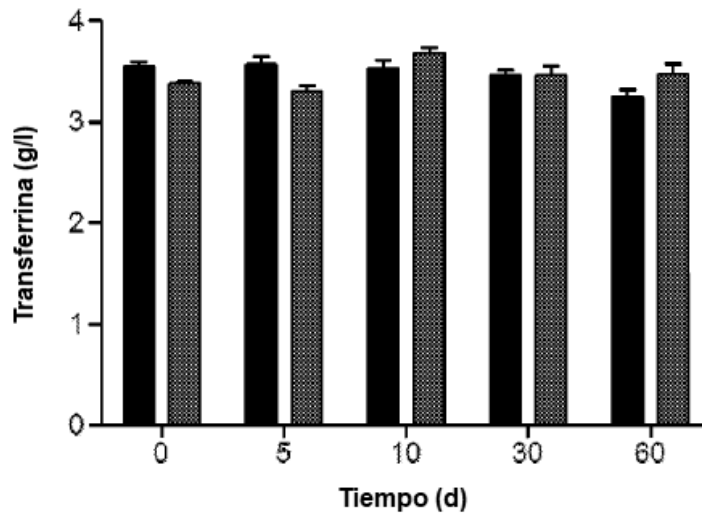
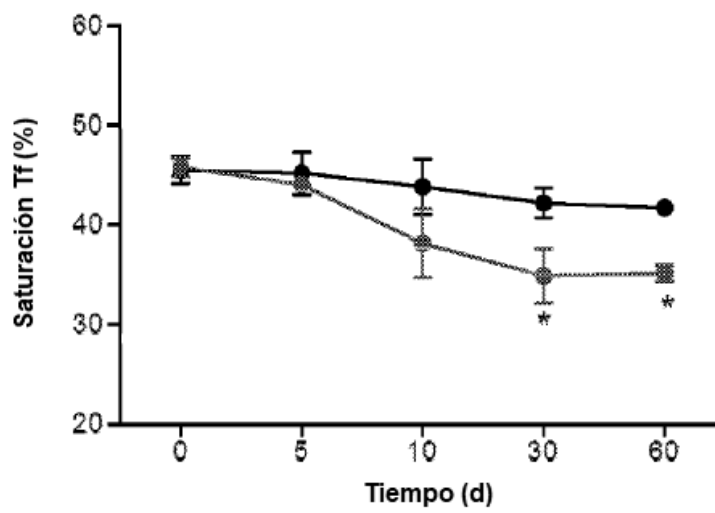
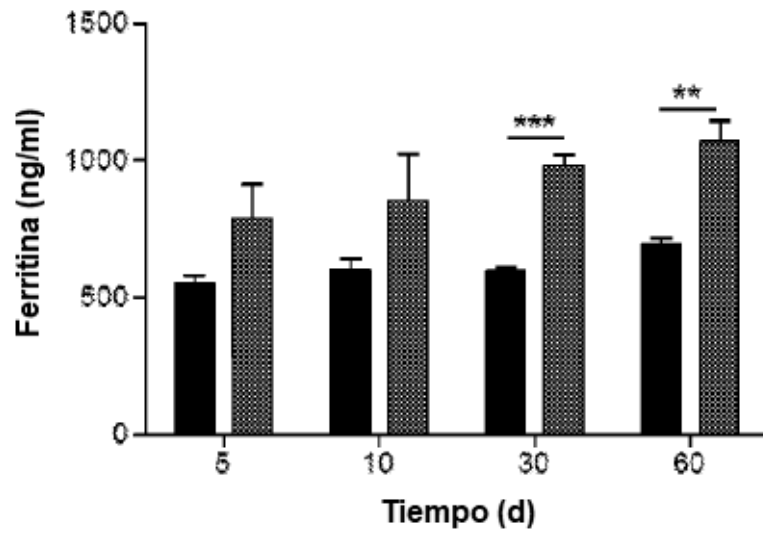


FIG 1L





**FIG 1M**

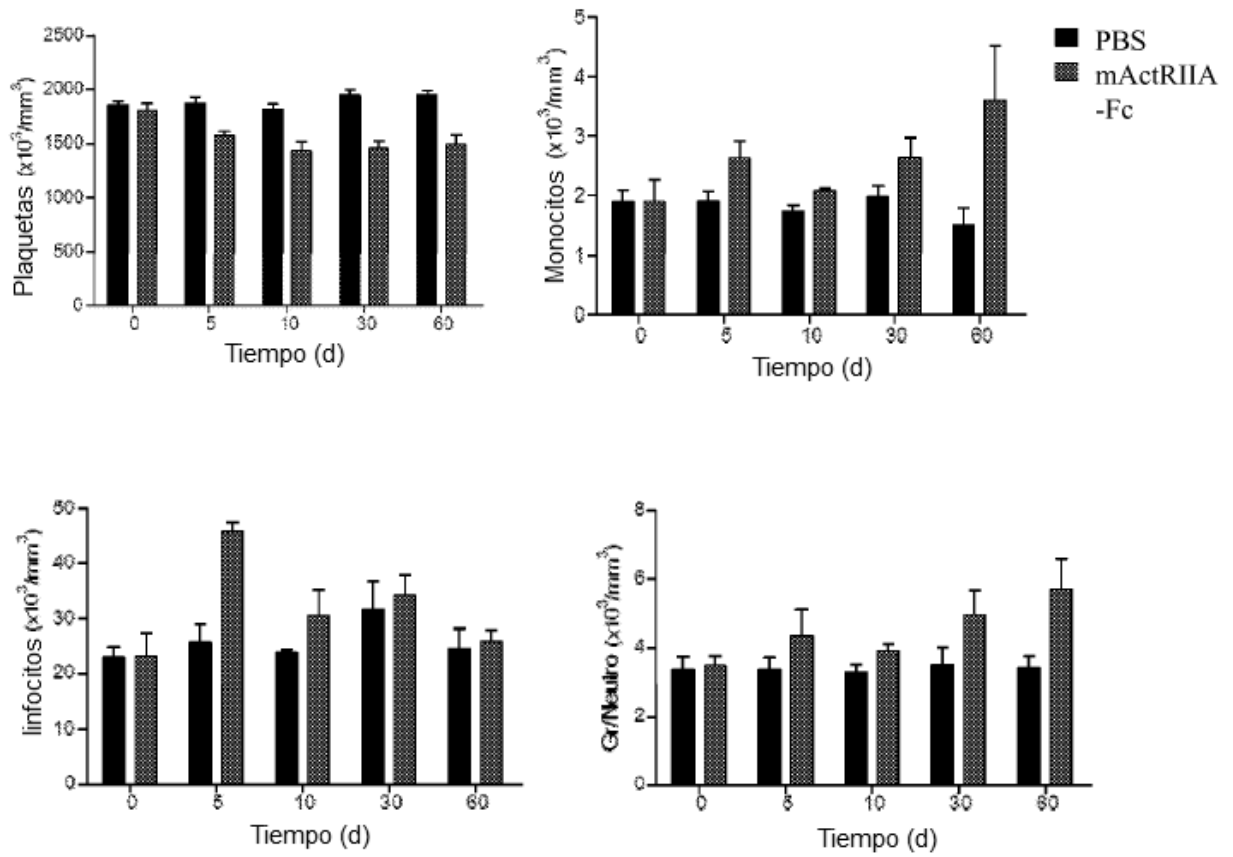


FIG 1N

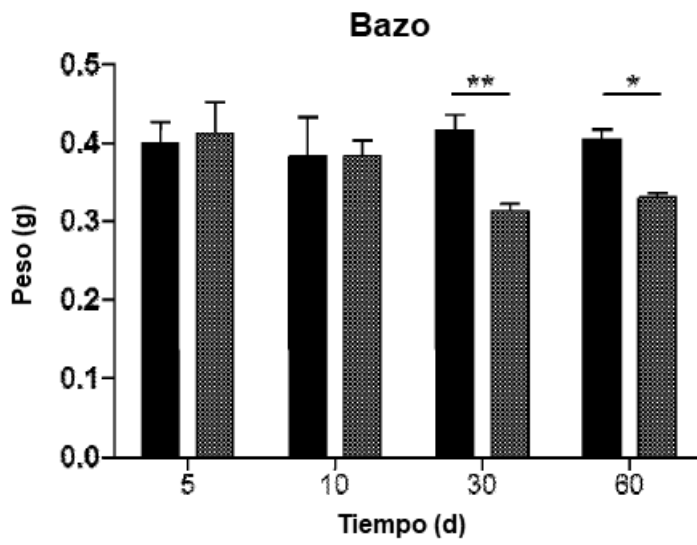
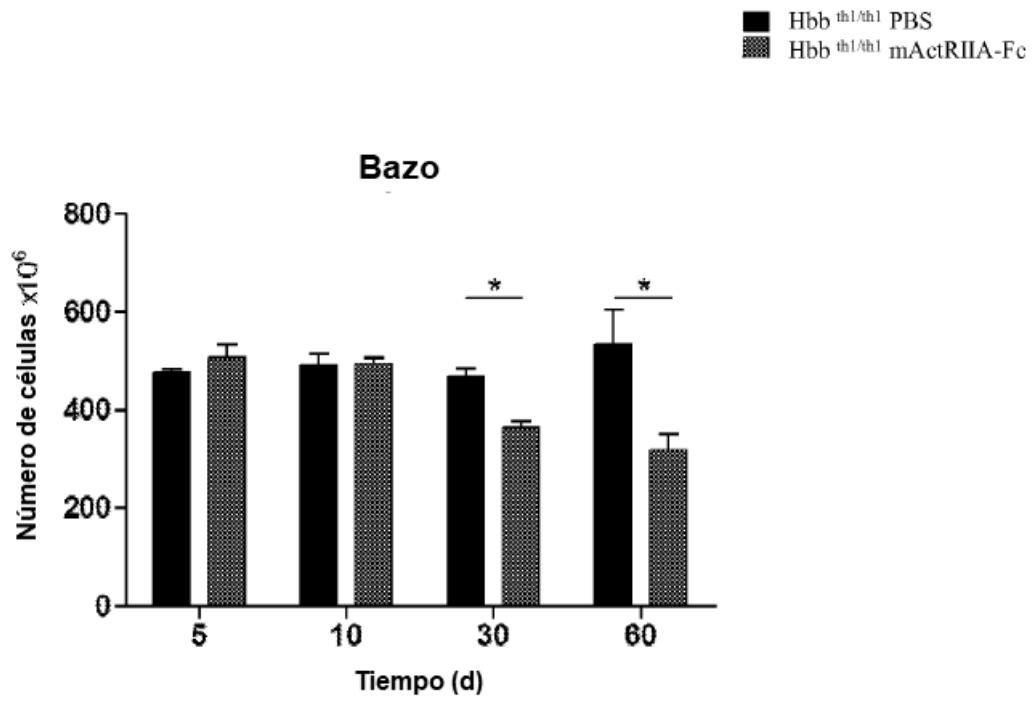


FIG 10



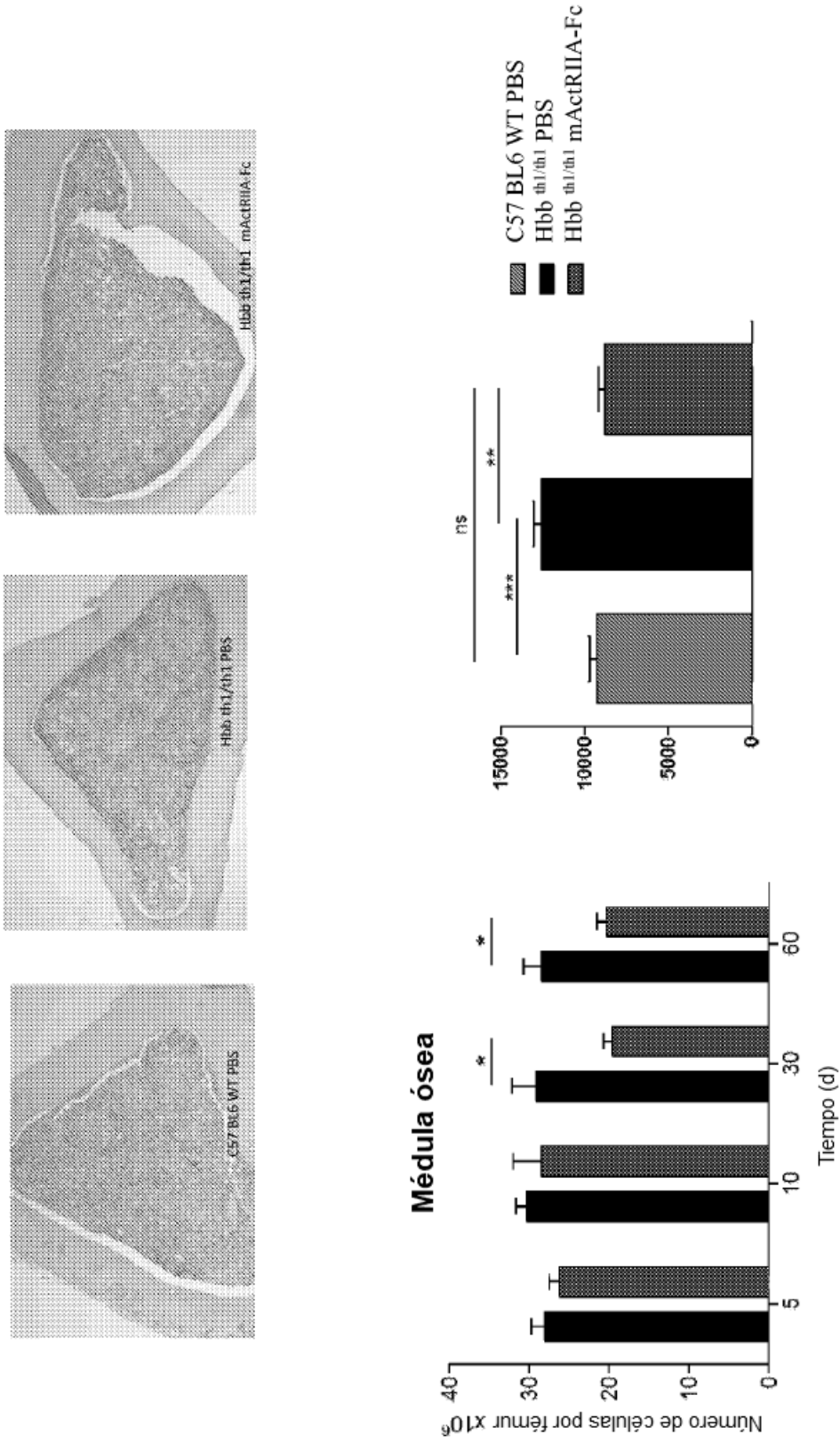


FIG 1P

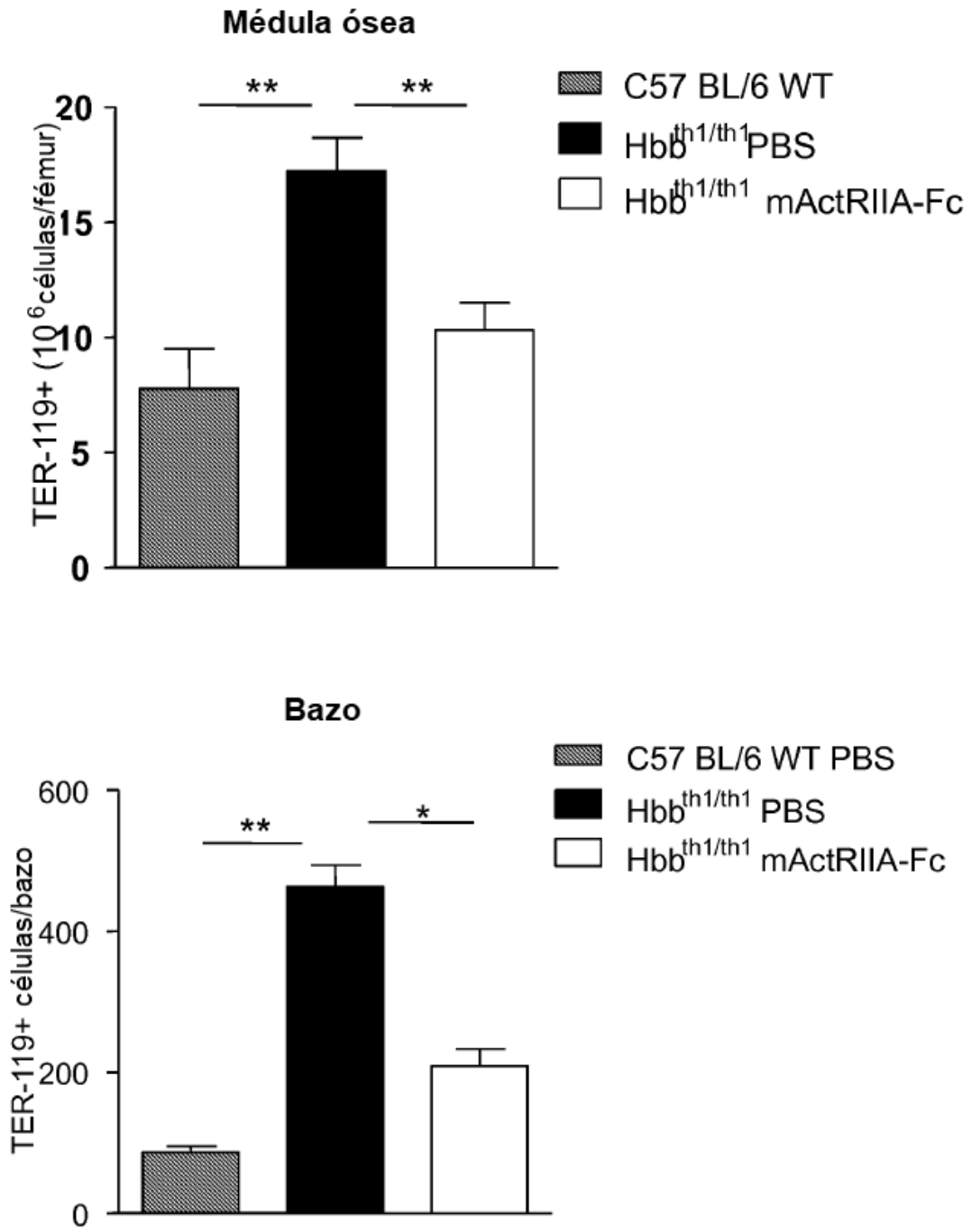


FIG 1Q

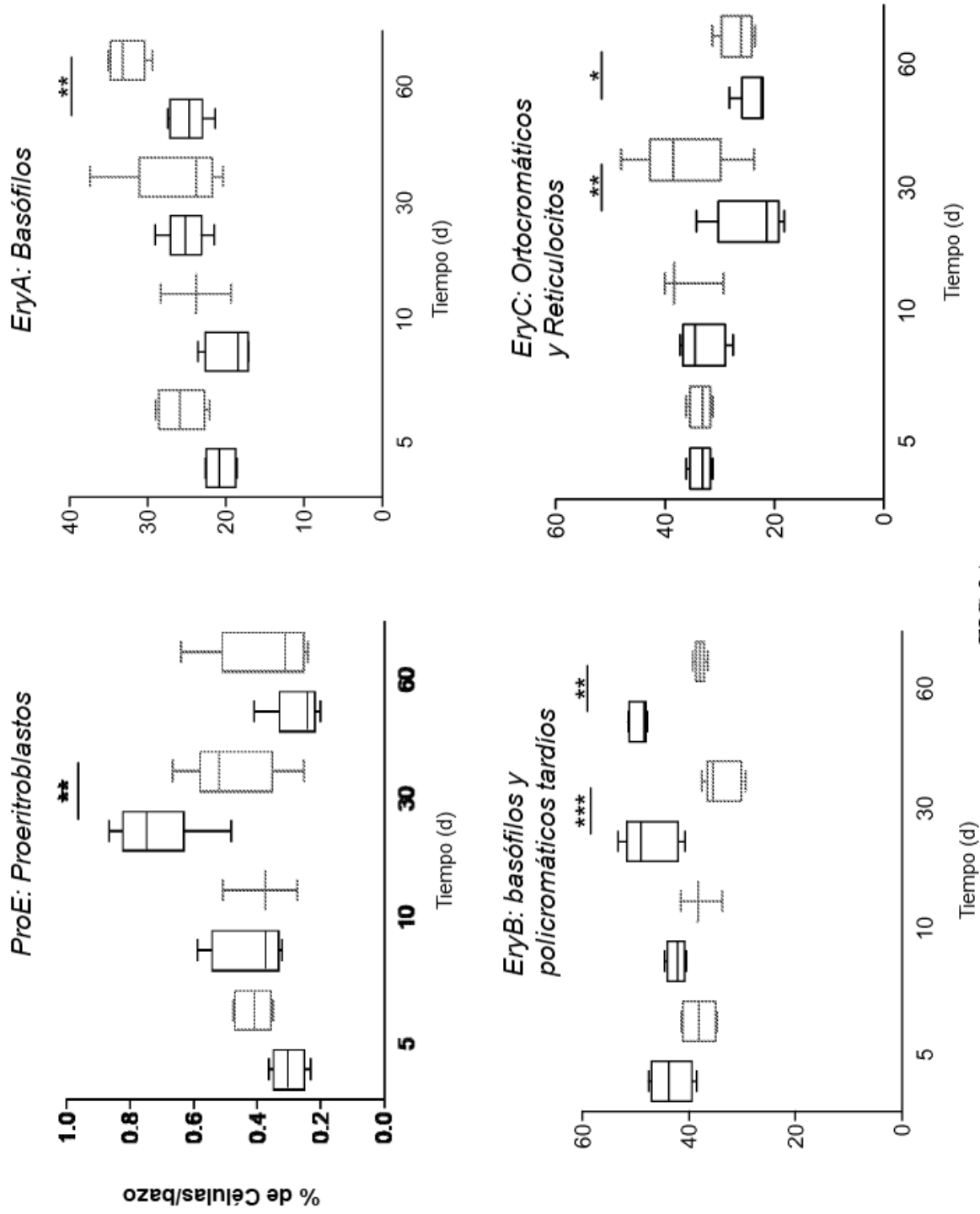
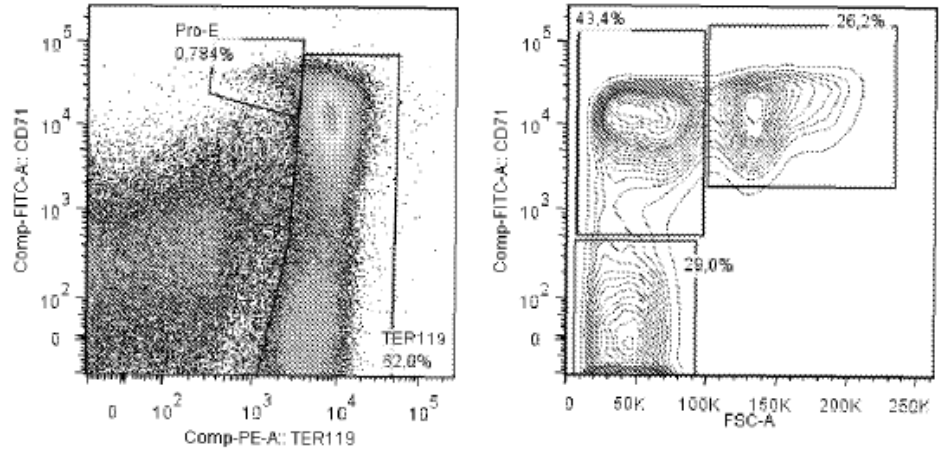
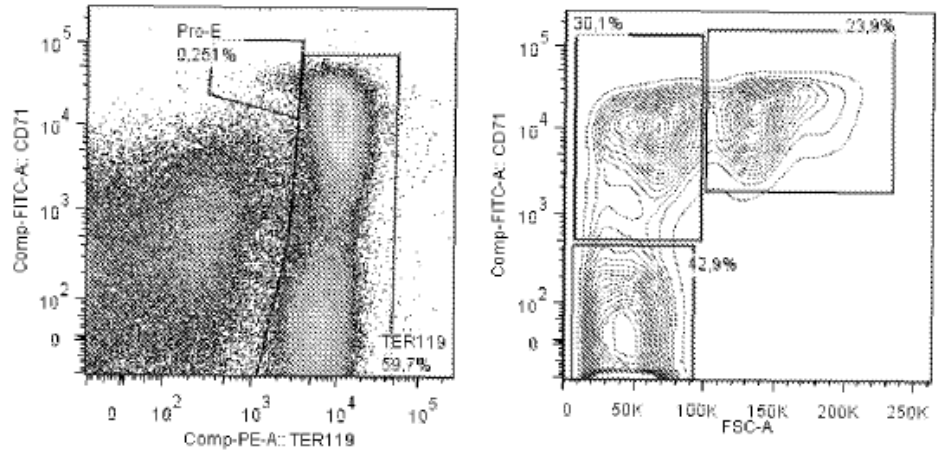


FIG 2A

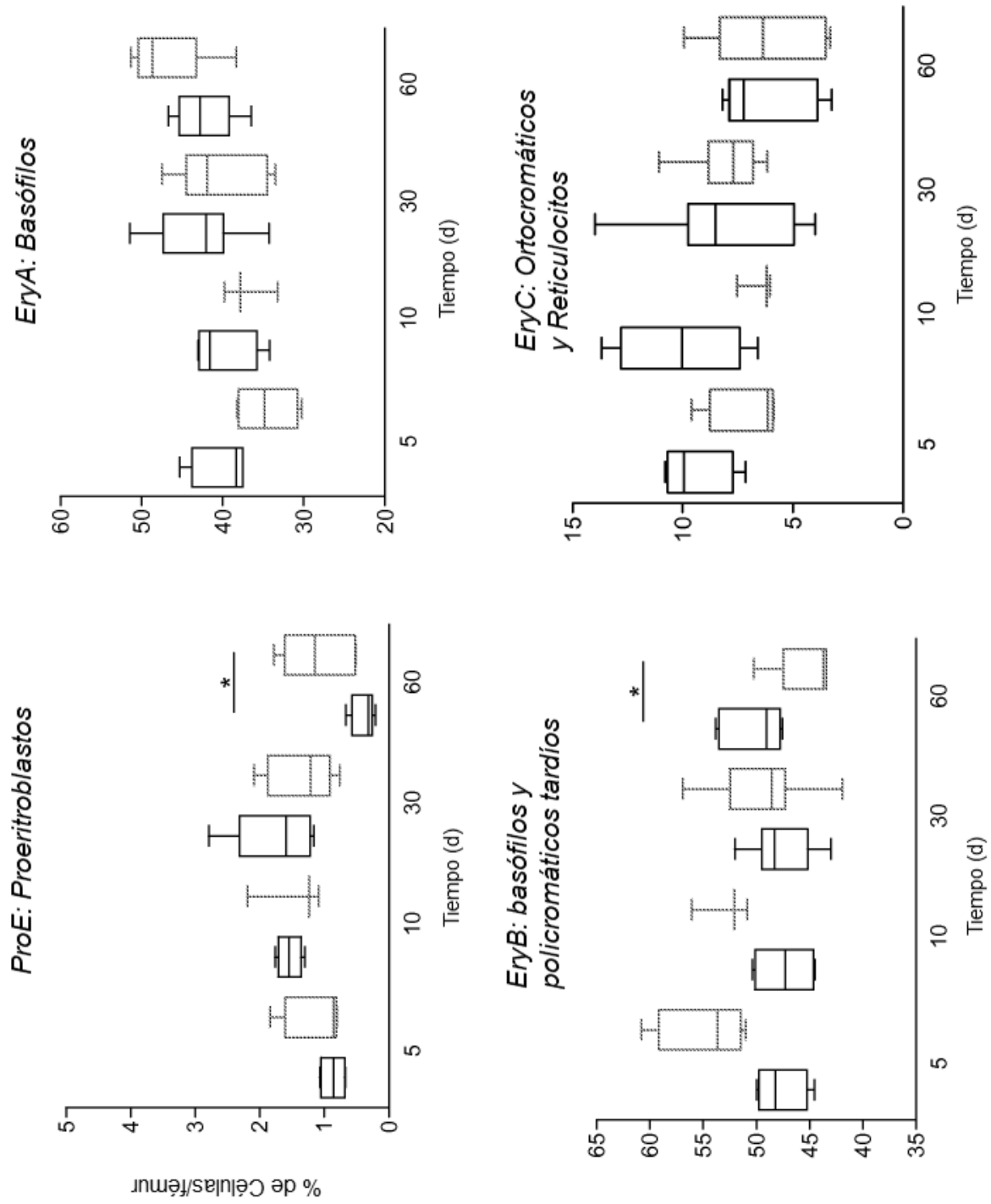
**Bazo PBS**



**Bazo  
mActRIIA-Fc**



**FIG 2A Con.**



**FIG 2B**

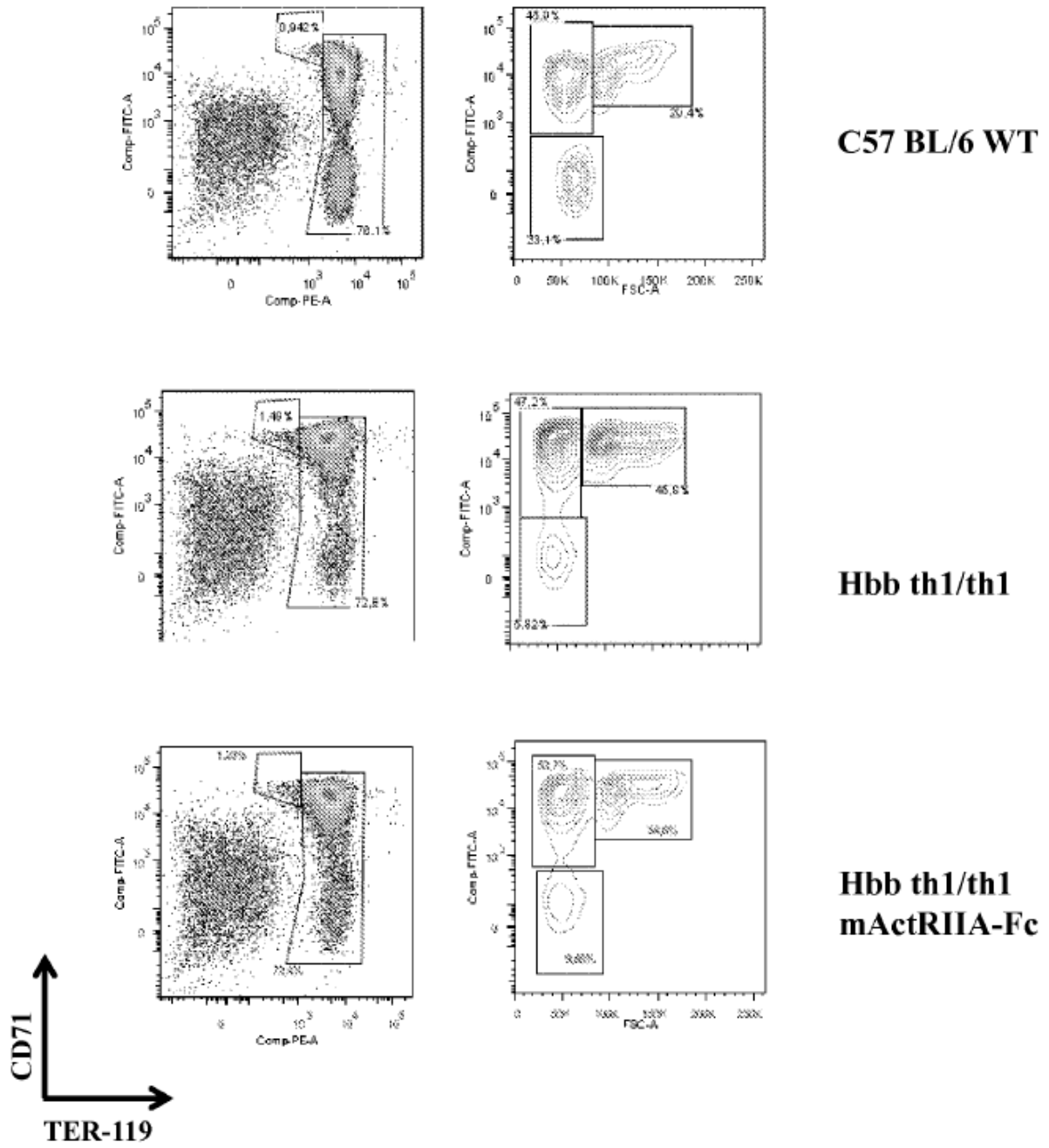


FIG 2B Con.

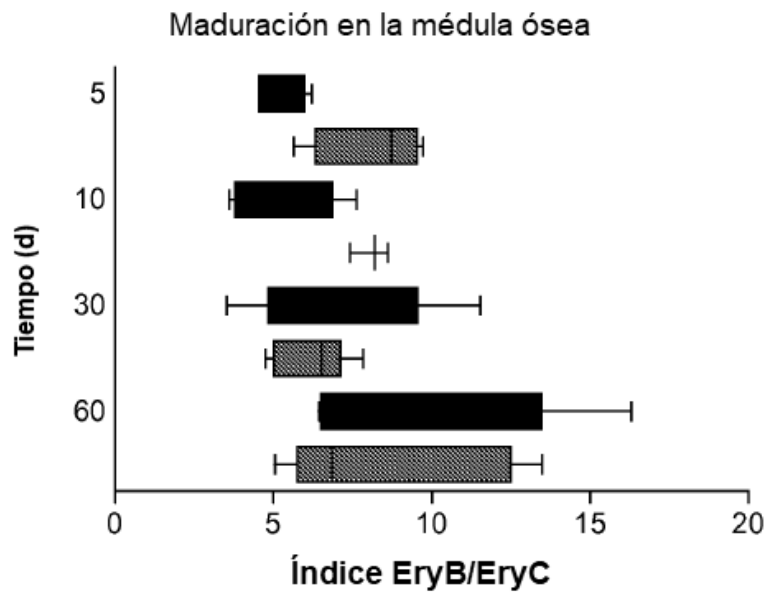
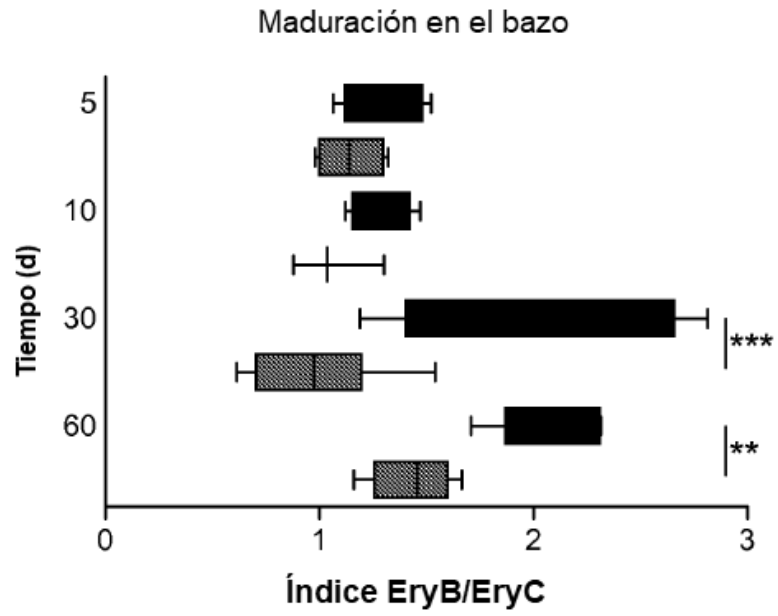


FIG 2C

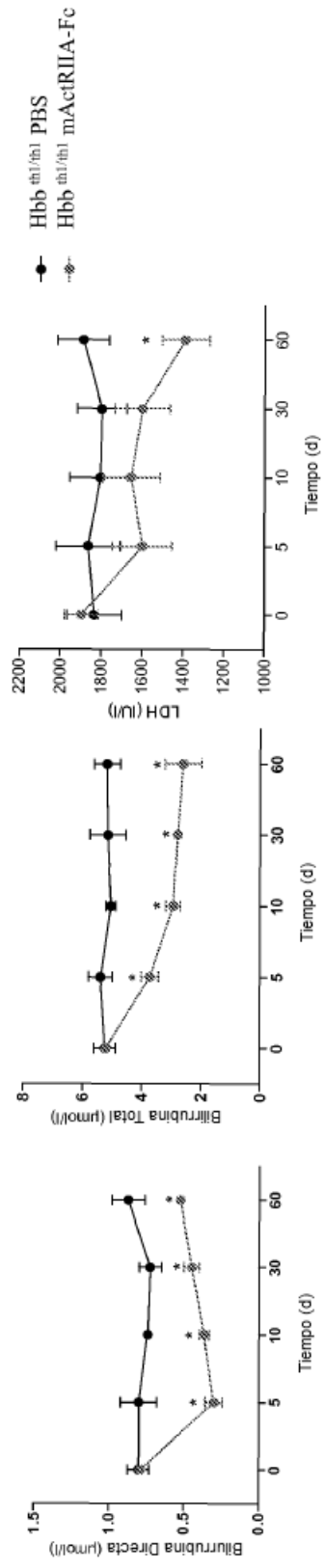
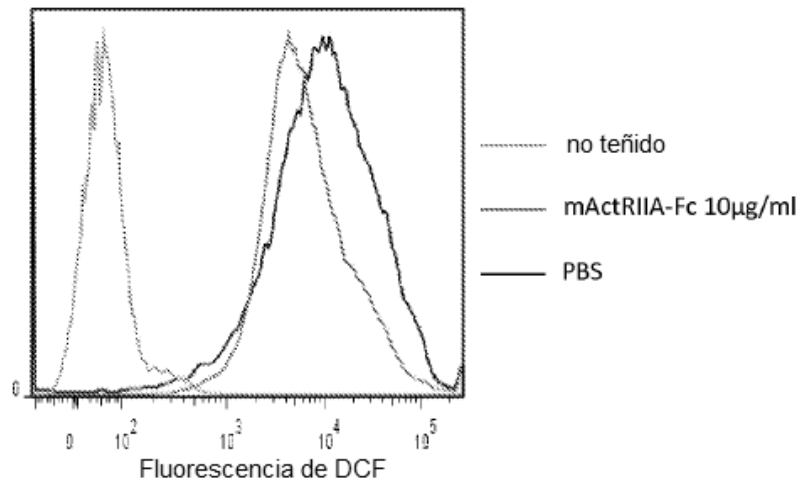


FIG 2D





**FIG 2E**

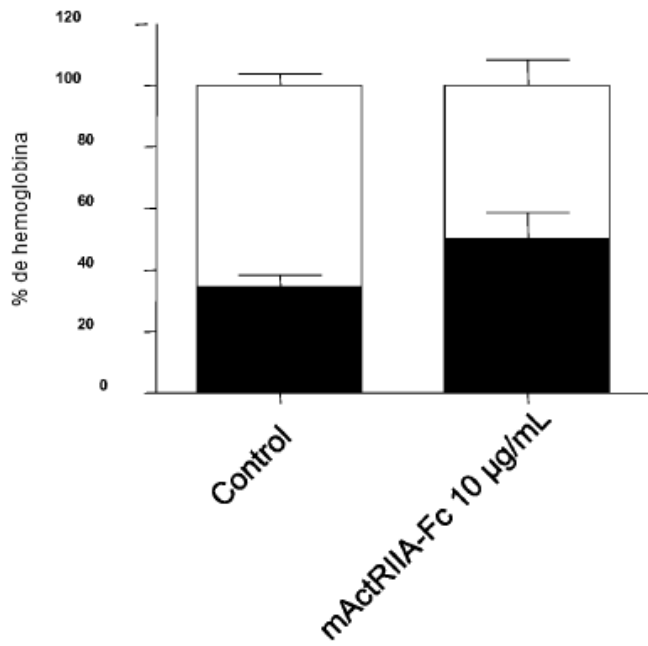
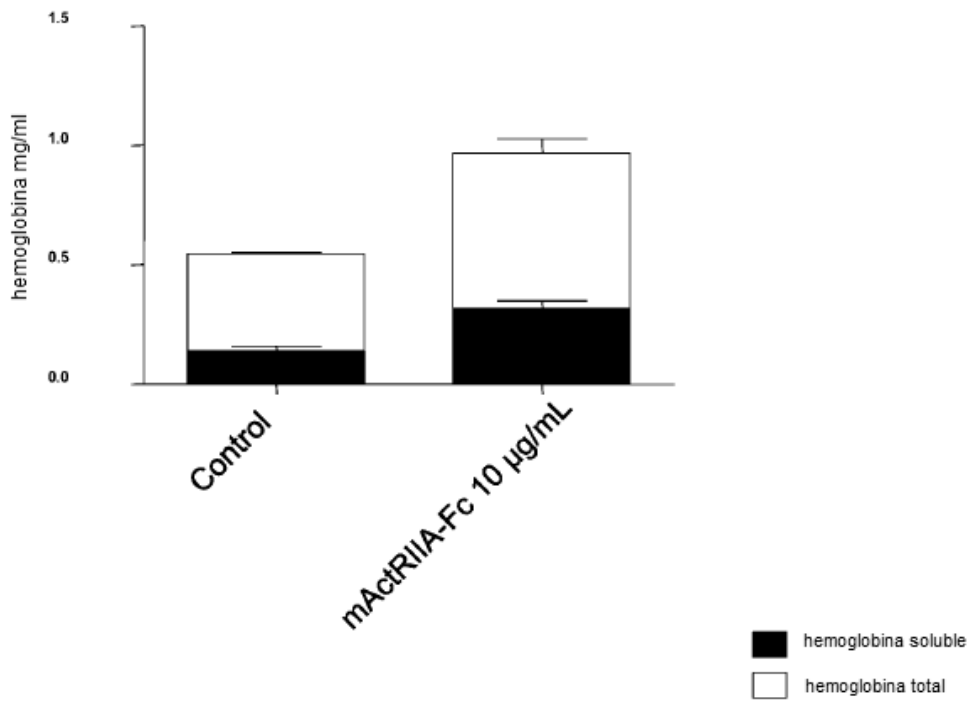
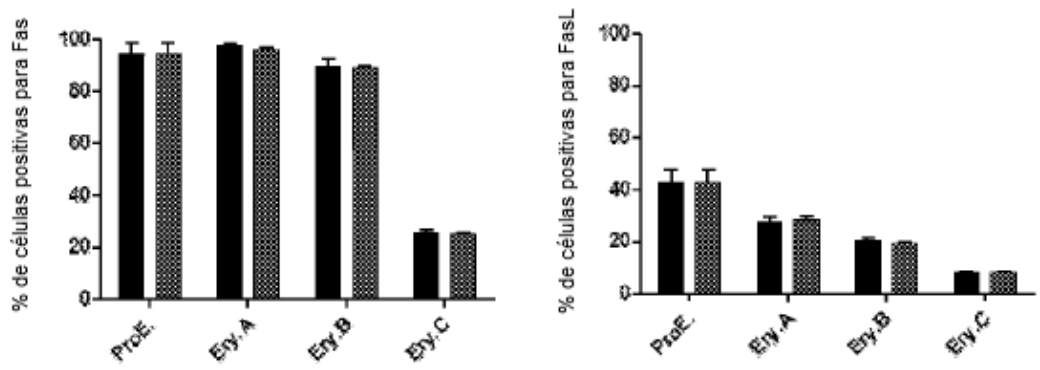
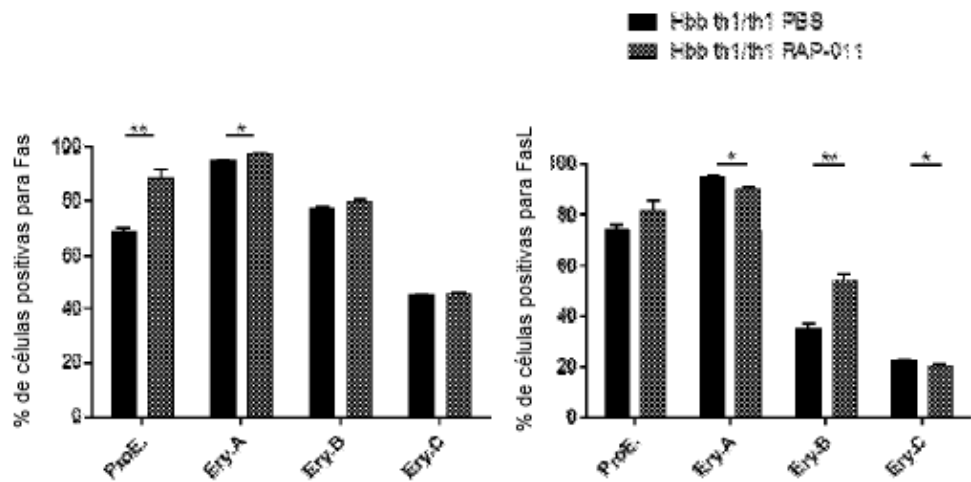


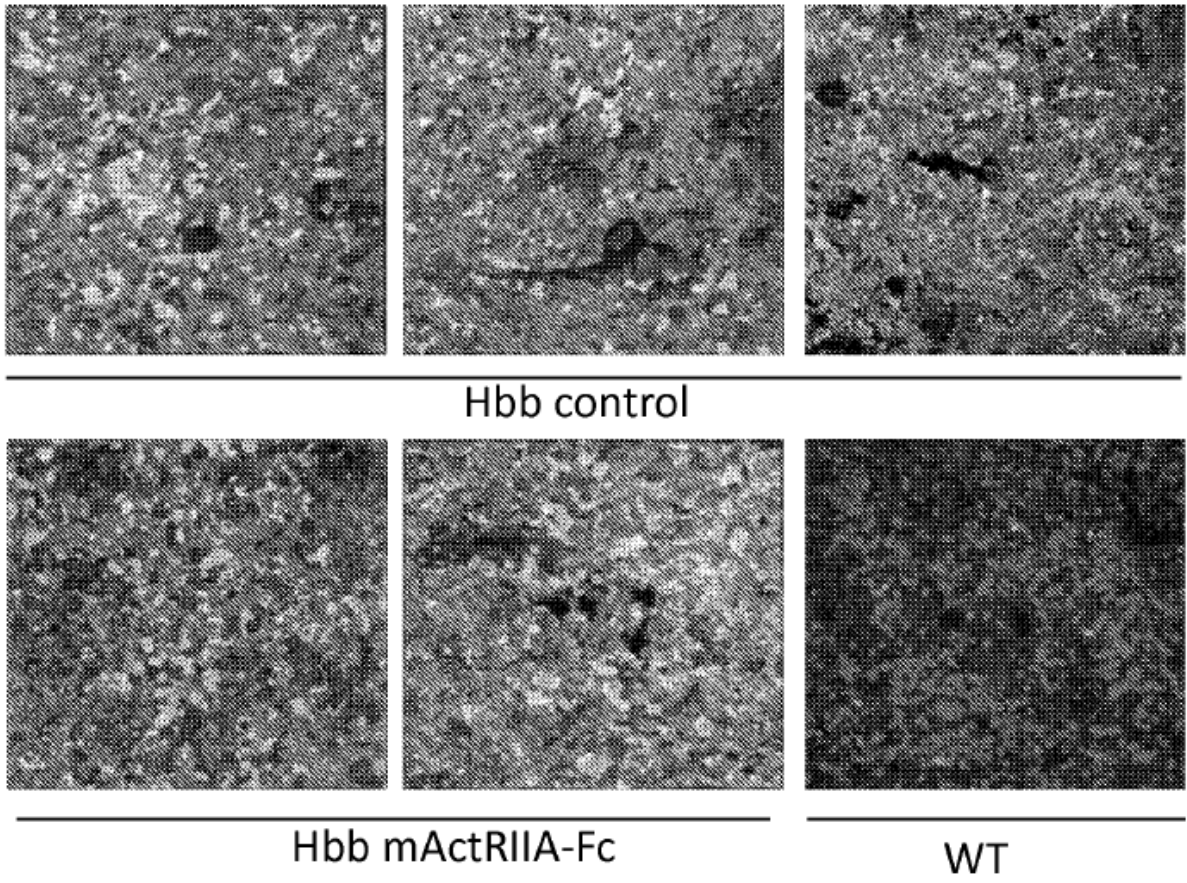
FIG 2F

**FIG 3A Médula ósea**



**FIG 3B Bazo**





**FIG 3C**

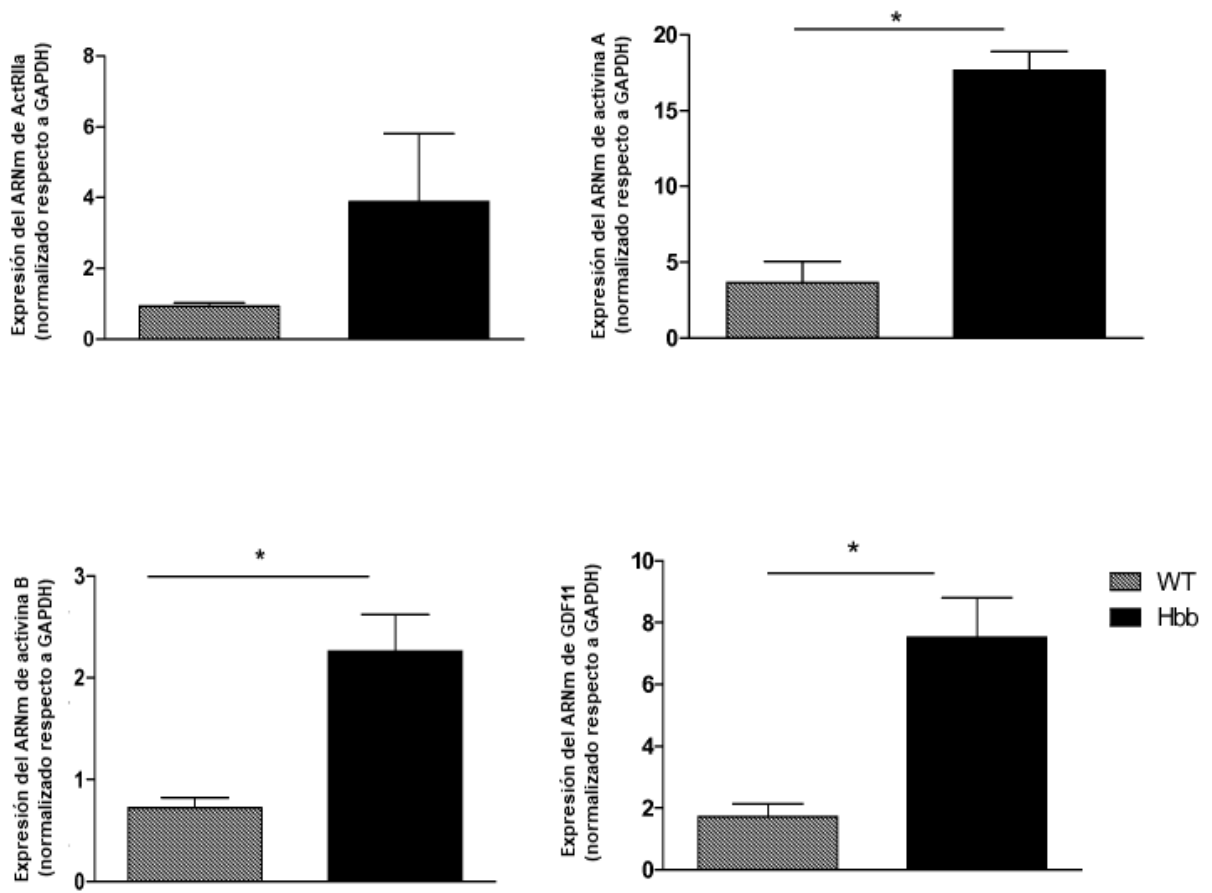
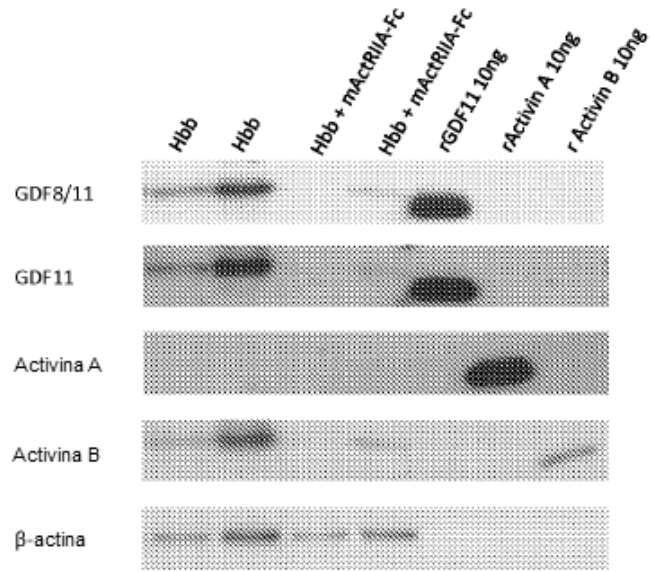
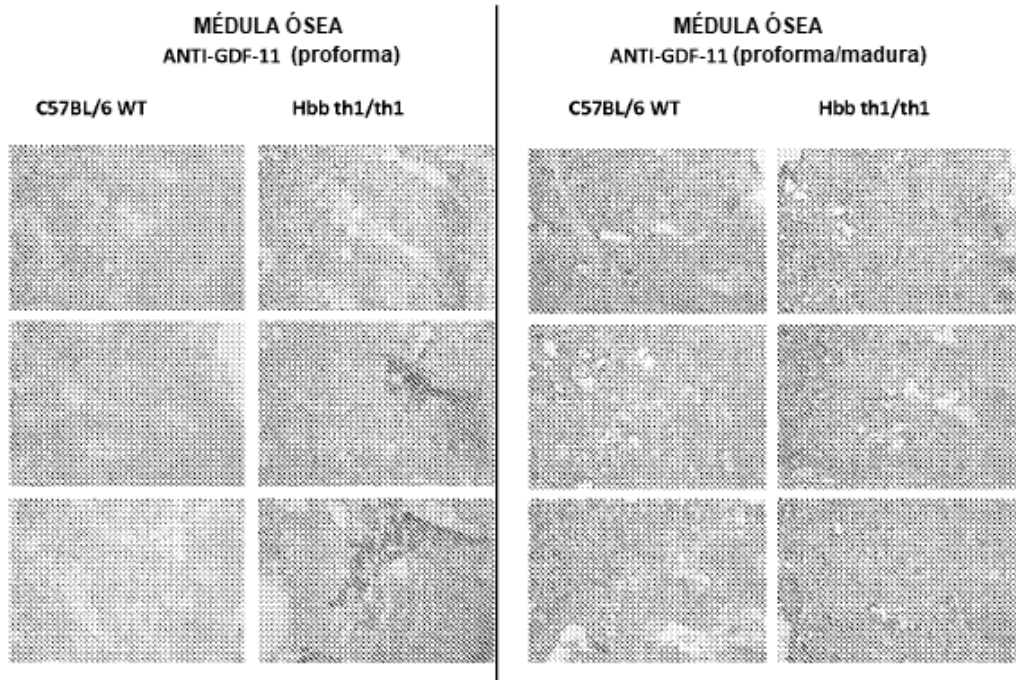


FIG 4A

**FIG 4B**



**FIG 4C**



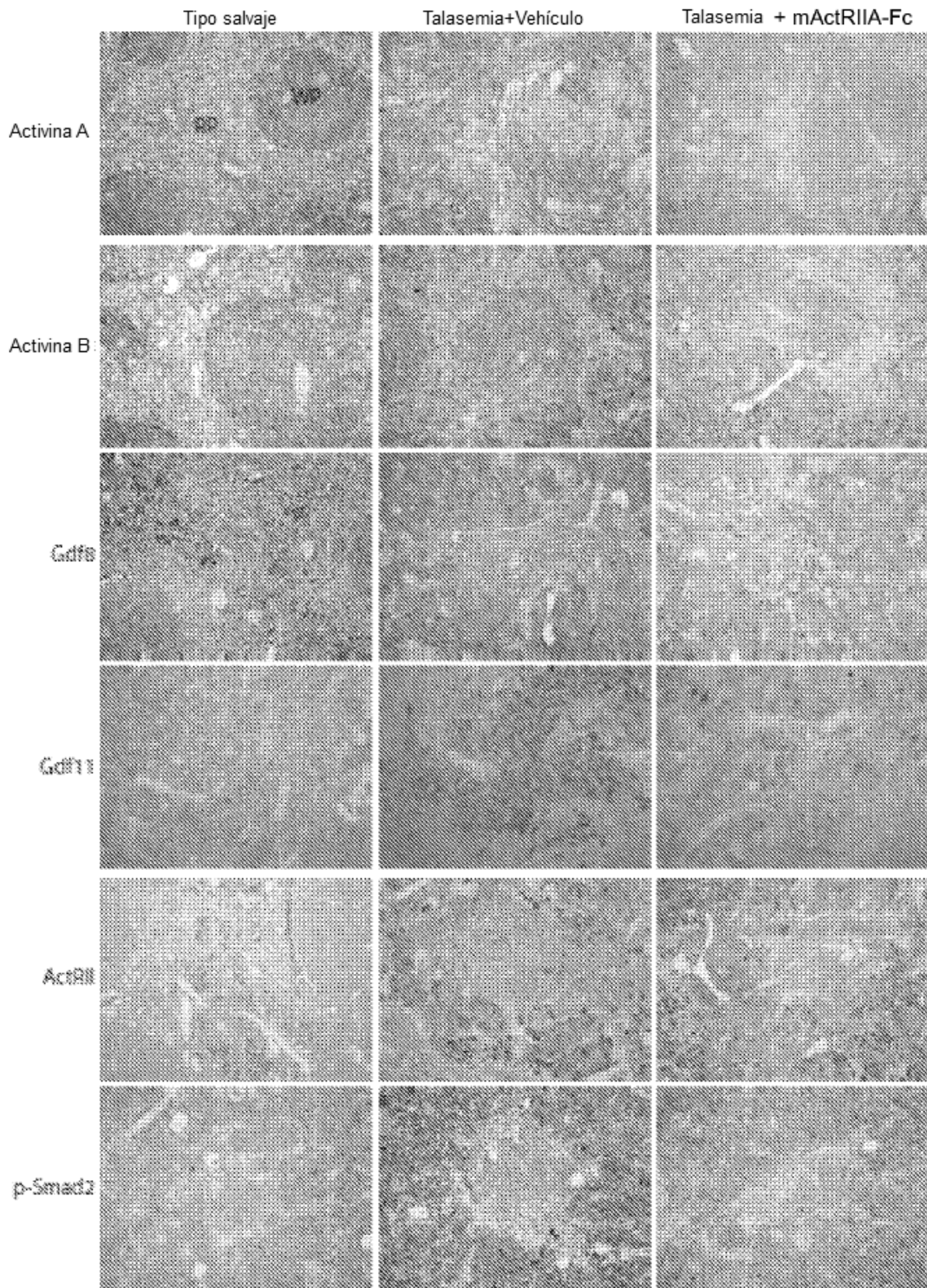
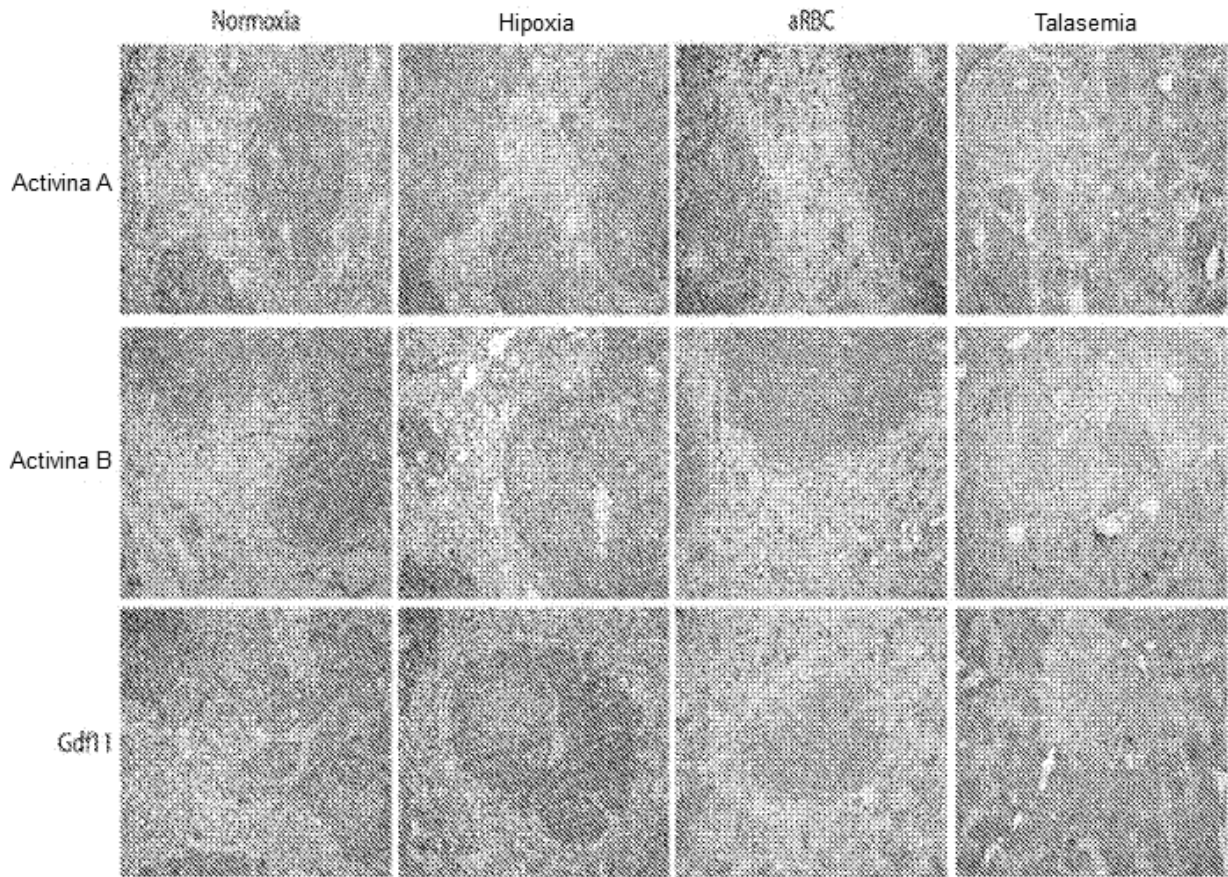


FIG 5A



**FIG 5B**



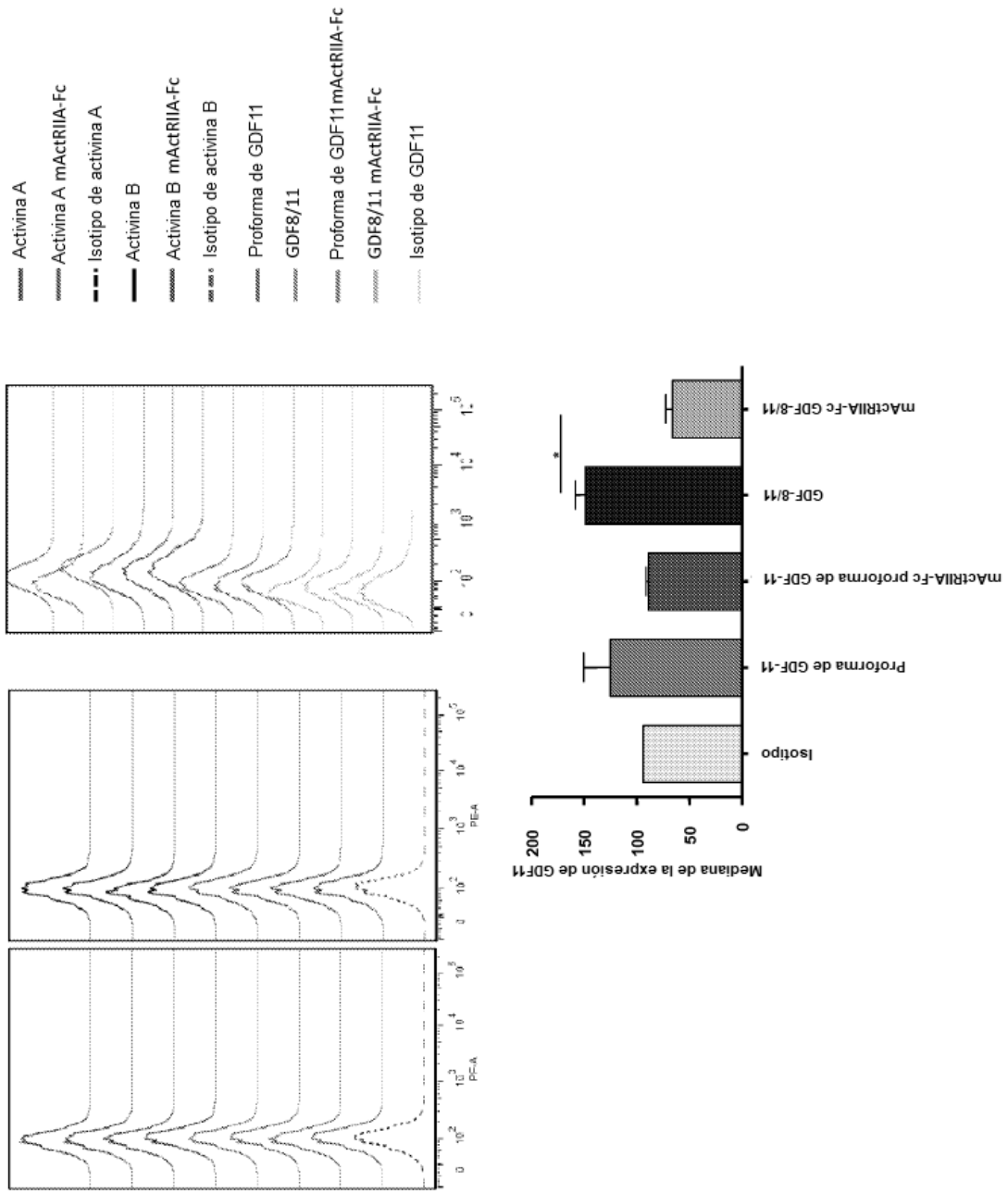
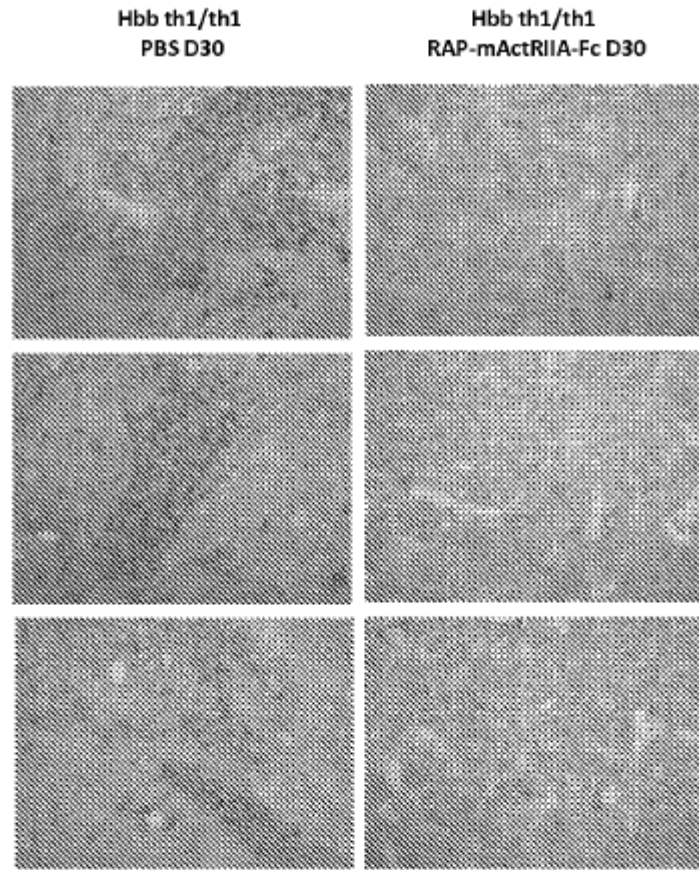
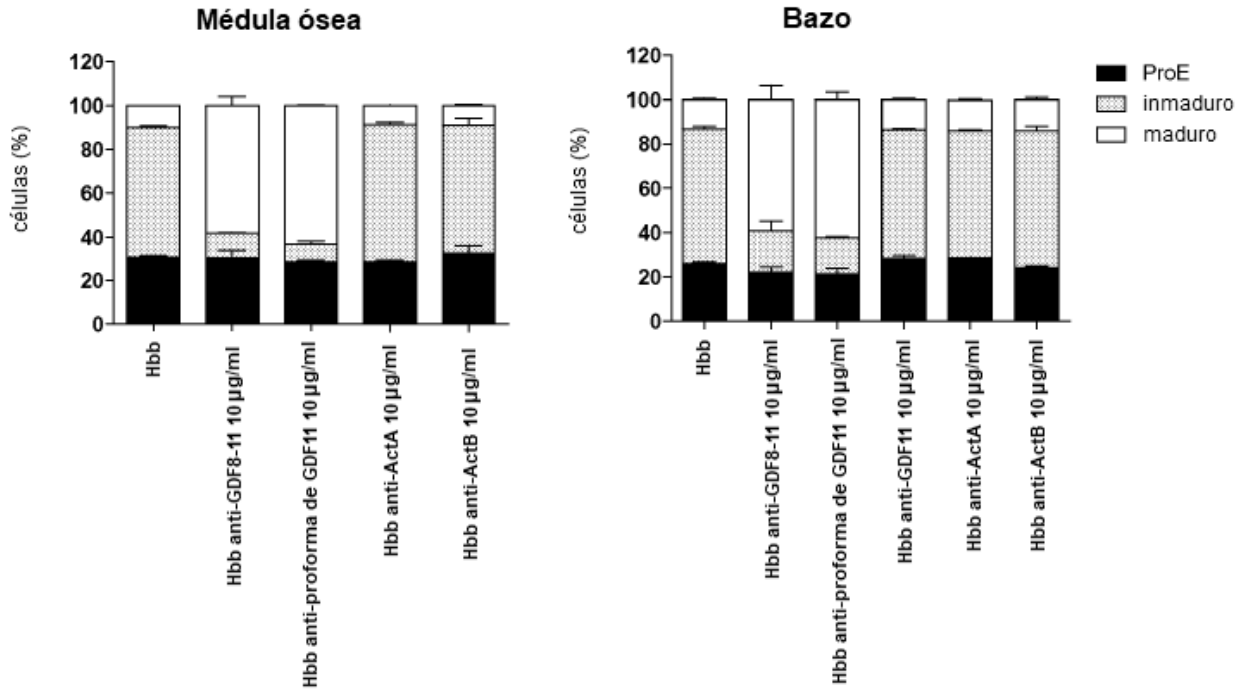


FIG 5C



**FIG 5D**

A.



B.

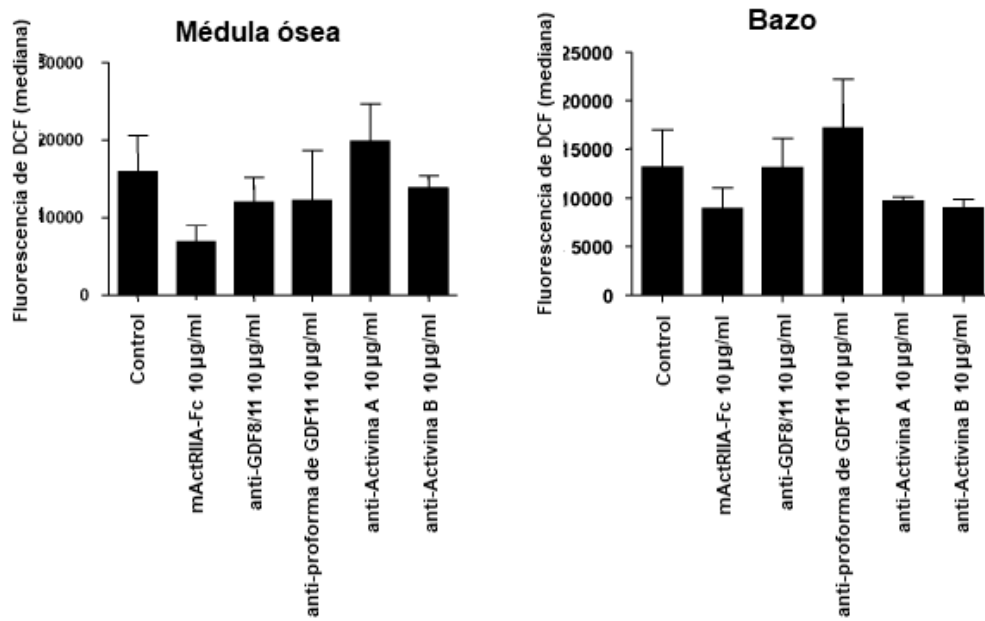
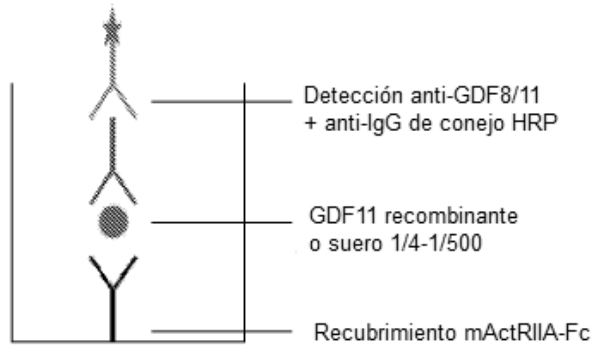
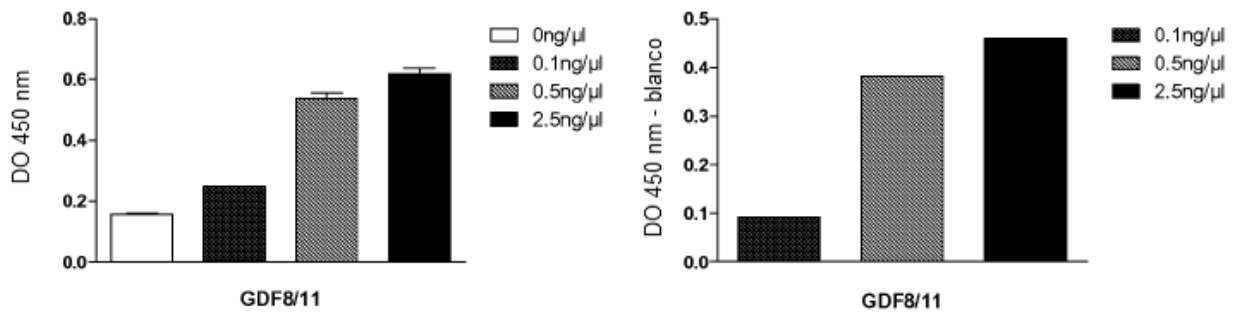


FIG 6

**A.**



**B.**



**FIG 7**

Recubrimiento mActRIIA-Fc - Detección anti-GDF8/11

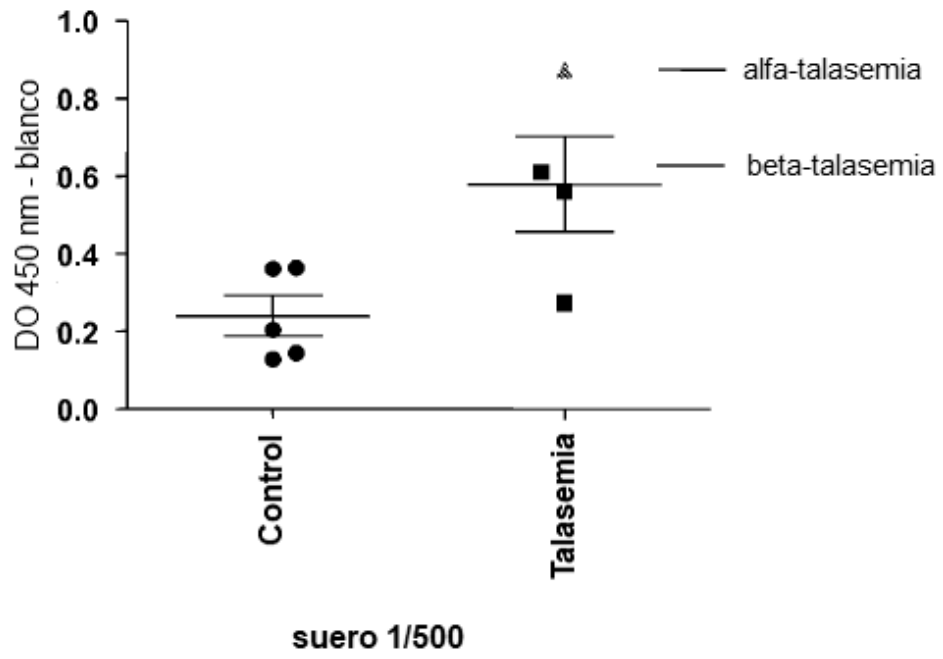


FIG 8

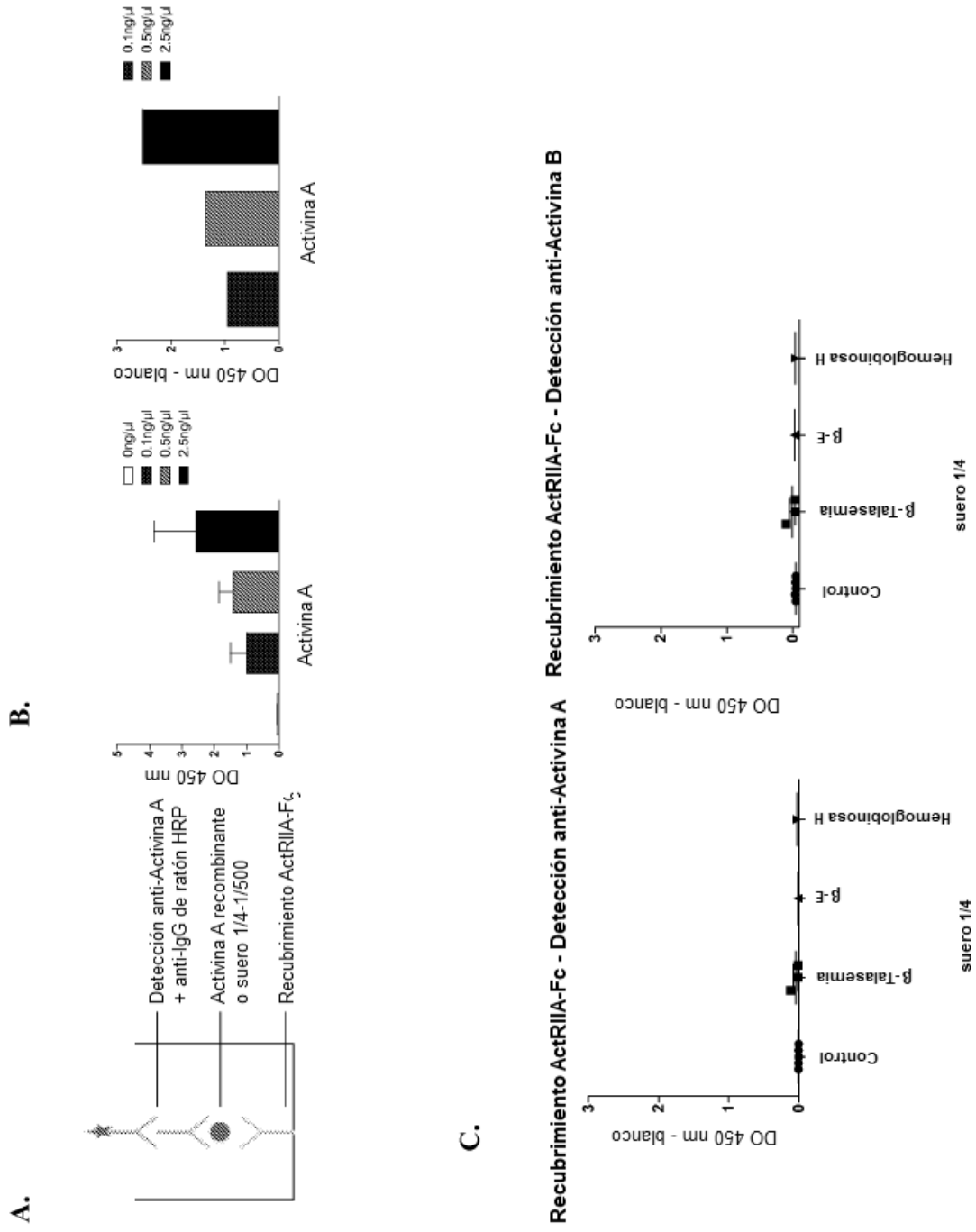
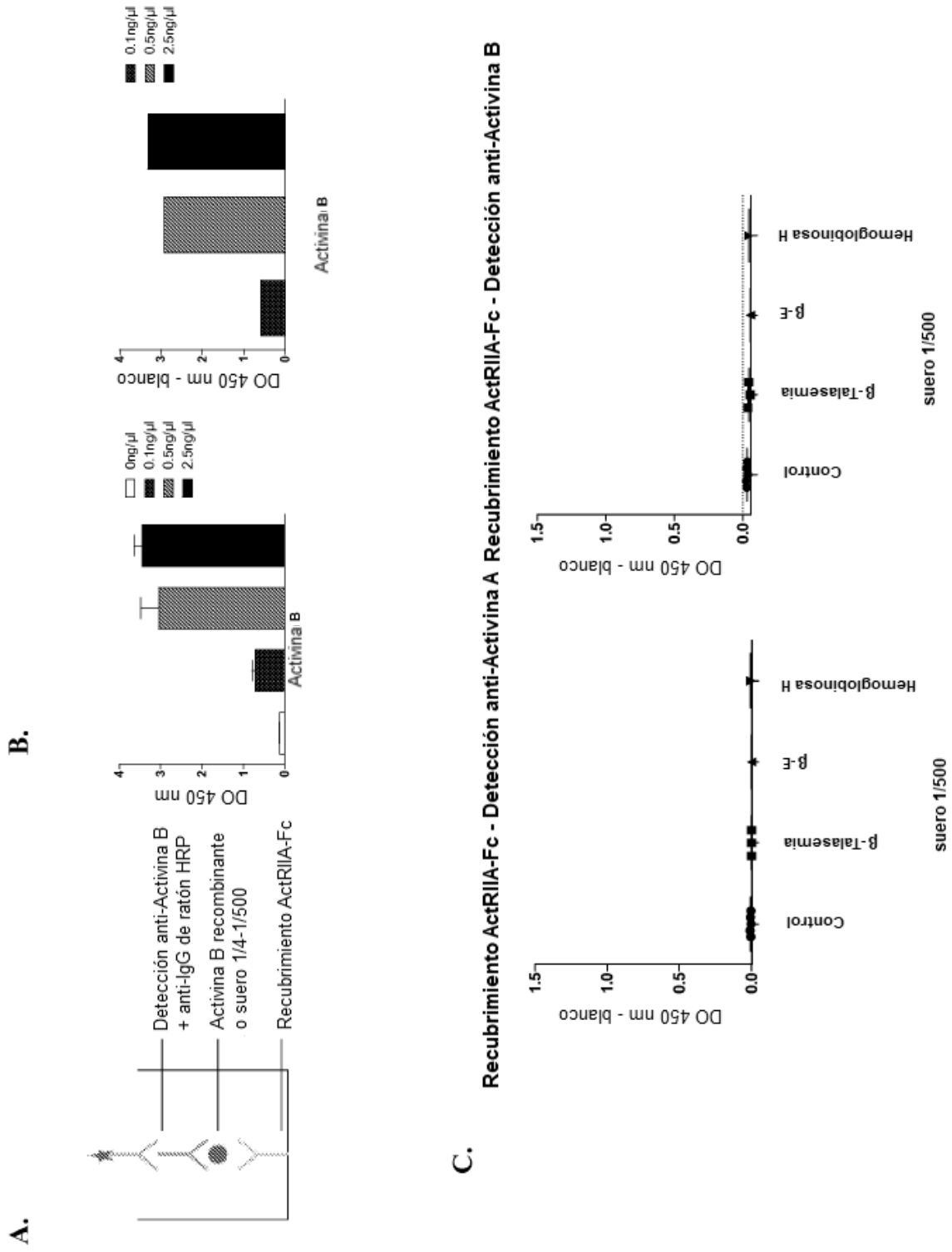


FIG 9



**FIG 10**

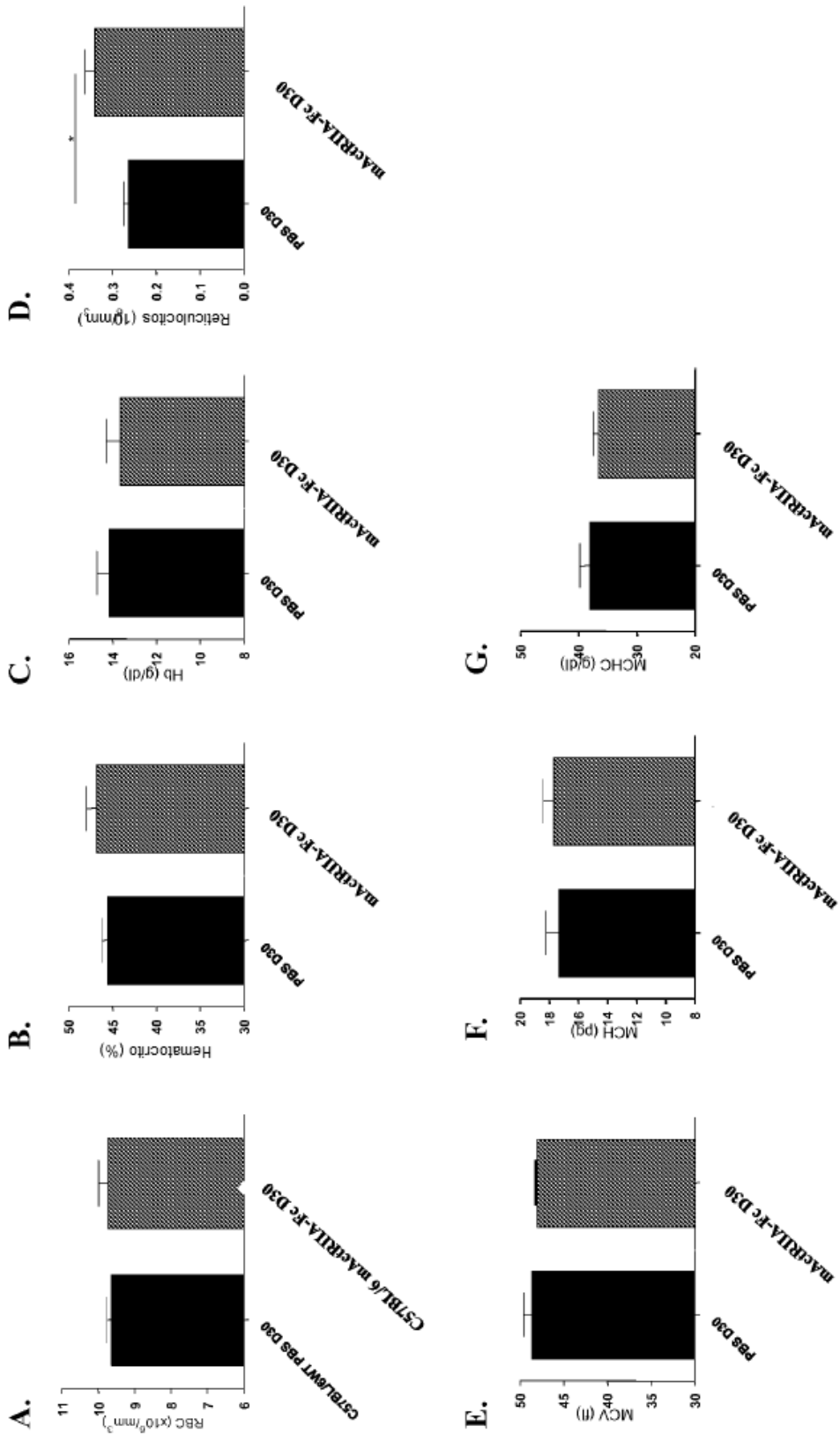


FIG 11



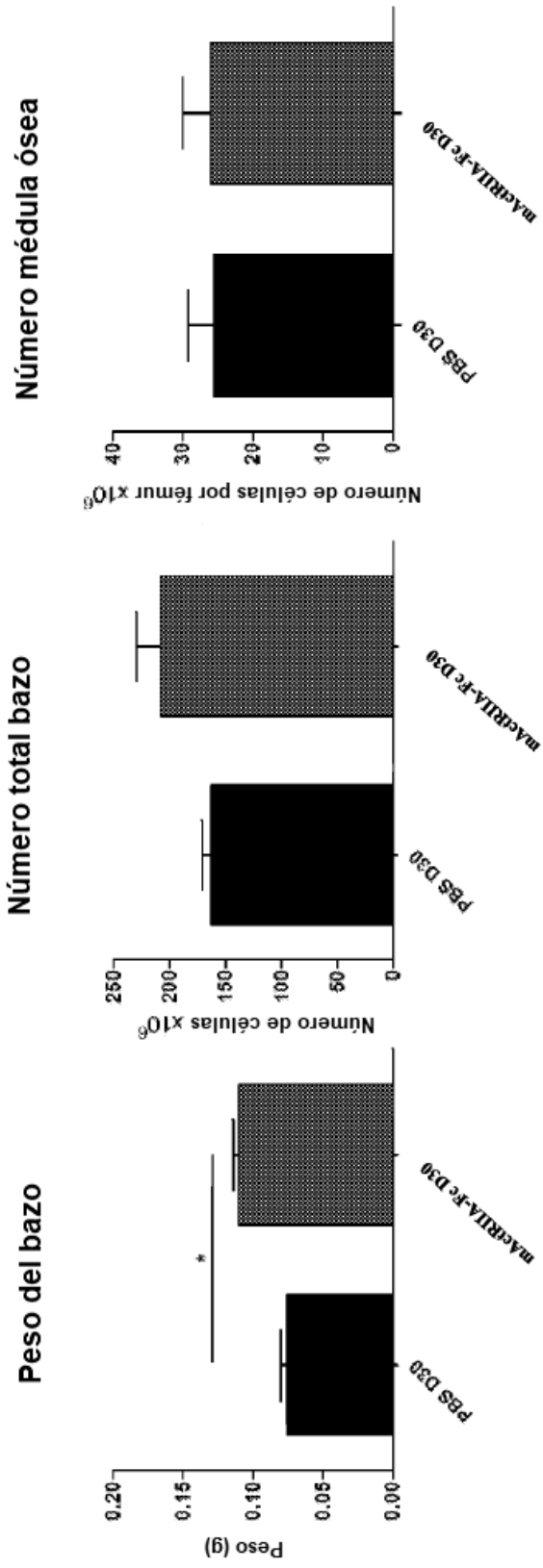


FIG 12

FIG 13A

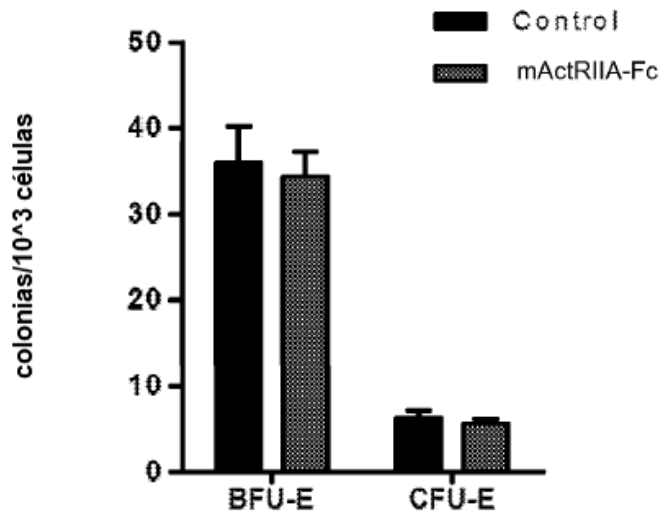


FIG 13B

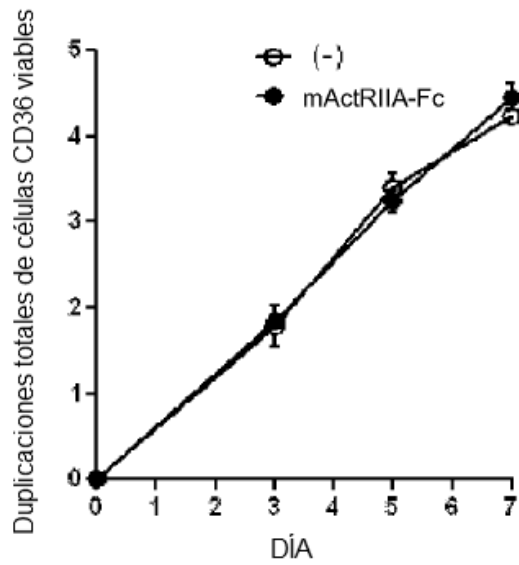


FIG 13C

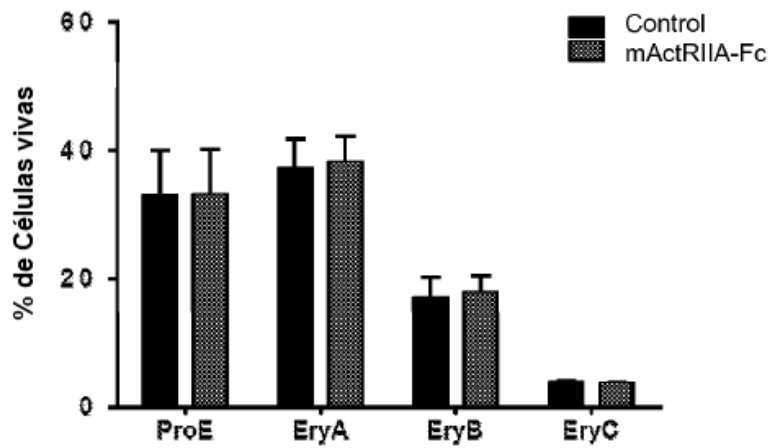


FIG 13D

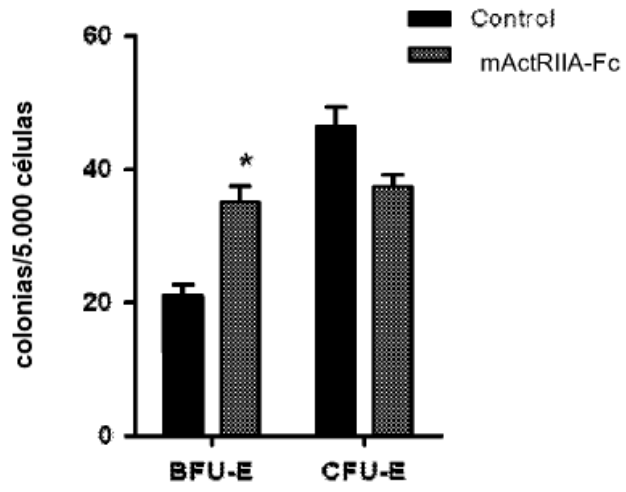


FIG 13E

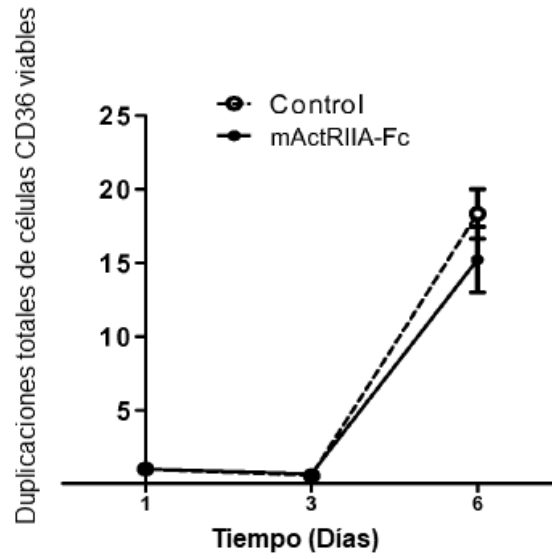
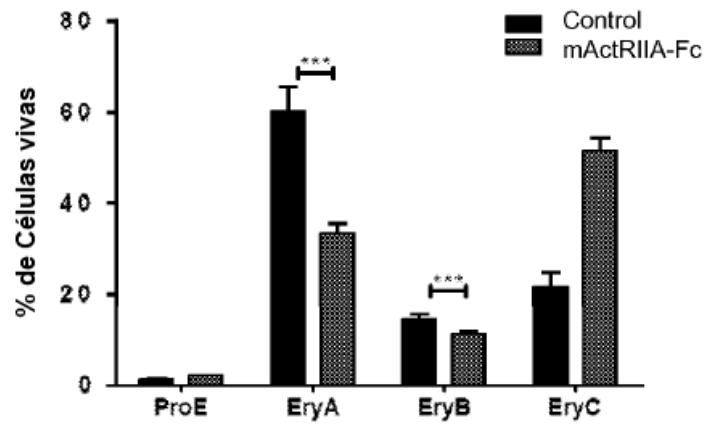
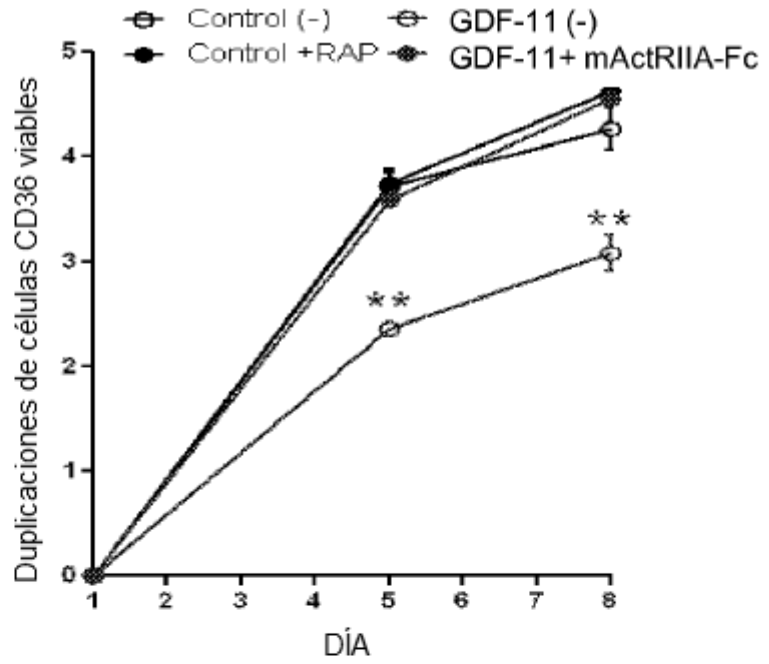


FIG 13F



**FIG 13G**



**FIG 13H**

