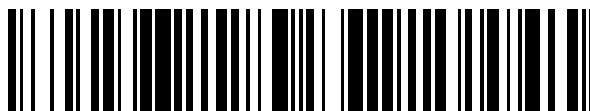


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 698**

51 Int. Cl.:

C07K 14/475 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2013** **PCT/US2013/030140**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013** **WO13142114**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2013** **E 13764561 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020** **EP 2828289**

54 Título: **Factor 11 de diferenciación del crecimiento (GDF) para el tratamiento de afecciones cardiovasculares relacionadas con la edad**

30 Prioridad:

19.03.2012 US 201261612550 P
22.05.2012 US 201261649962 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.08.2020

73 Titular/es:

THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.
(50.0%)
75 Francis Street
Boston, MA 02115, US y
PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD
COLLEGE (50.0%)

72 Inventor/es:

LEE, RICHARD T.;
LOFFREDO, FRANCESCO;
PANCOAST, JAMES;
STEINHAUSER, MATTHEW y
WAGERS, AMY

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 779 698 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

Factor 11 de diferenciación del crecimiento (GDF) para el tratamiento de afecciones cardiovasculares relacionadas con la edad

Campo tecnológico

Las realizaciones de la tecnología descrita en el presente documento se refieren a tratamientos para la insuficiencia cardíaca diastólica, hipertrofia cardíaca y afecciones relacionadas.

Antecedentes

El envejecimiento de los organismos multicelulares puede conducir a la pérdida de la función cardíaca normal, que finalmente resulta en insuficiencia cardíaca. La insuficiencia cardíaca afecta aproximadamente al 1 % de las personas mayores de 50 años, pero a más del 5 % de las personas mayores de 75 años, y con el fuerte aumento continuo de la proporción de personas mayores en nuestra población, la insuficiencia cardíaca relacionada con la edad seguramente se convertirá en una afección de salud cada vez más frecuente. La mayor parte de la insuficiencia cardíaca relacionada con la edad se encuentra en el contexto de la función sistólica normal y esta es una afección que a menudo se asocia con hipertrofia cardíaca (es decir, agrandamiento del tejido cardíaco) y se denomina "insuficiencia cardíaca diastólica" (G. P. Aurigemma, N Engl J Med 355, 308 (Jul 20, 2006)). La insuficiencia cardíaca diastólica representa el 40-60 % de los casos de insuficiencia cardíaca (G. P. Aurigemma, N Engl J Med 2006 355:308; S. A. Hunt et al., Circulation 2009 119:e391; D. W. Kitzman, K. R. Daniel, Clin Geriatr Med 2007 23:83; J. C. Finerty, Physiol Rev 1952 32: 277). El pronóstico de la insuficiencia cardíaca diastólica puede ser tan malo como el deficiente la insuficiencia cardíaca sistólica (G. P. Aurigemma, N Engl J Med 2006 355: 308), con un riesgo de muerte a 5 años después de una hospitalización por insuficiencia cardíaca inicial que se aproxima a la de tumores malignos comunes (D. E. Wright, et al. Science 2001 294:1933). Aunque se ha avanzado mucho en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca sistólica, con mejoras sustanciales en el resultado en las últimas dos décadas, el progreso en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca diastólica ha sido mucho más difícil de alcanzar (S. A. Hunt et al., Circulation 119, e391 (Apr 14, 2009)). De hecho, se puede argumentar que no hay terapias específicas para pacientes que experimentan el "endurecimiento" ventricular asociado con la disfunción diastólica que acompaña al envejecimiento (D. W. Kitzman, K. R. Daniel, Clin Geriatr Med 23, 83 (Feb, 2007)). Es esta realidad clínica la que puede explicar la observación de que la mortalidad está disminuyendo para la insuficiencia cardíaca sistólica pero no para la insuficiencia cardíaca diastólica (J. C. Finerty, Physiol Rev 1952 32:277) y subraya la enorme demanda clínica de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a la insuficiencia diastólica.

La insuficiencia cardíaca diastólica es un síndrome clínico que ocurre en varios entornos fisiopatológicos, incluyendo la hipertensión de larga duración, la enfermedad valvular, tal como estenosis aórtica, miocardiopatía hipertrófica genética, y como resultado del envejecimiento. Estas etiologías dispares convergen con algunos hilos fisiopatológicos comunes, más obviamente con hipertrofia celular o aumento del diámetro de los cardiomiocitos; que se traduce en un mayor grosor de la pared del corazón sin reducir significativamente la capacidad de compresión (función sistólica). La hipertrofia miocárdica es un contribuyente importante al deterioro de la relajación o al aumento de la rigidez que causa la insuficiencia cardíaca diastólica (A. J. Wagers, et al., Science 2002 297:2256).

Sumario

Las realizaciones de la tecnología descrita en el presente documento se basan en el descubrimiento de que el nivel de GDF11 en la sangre de un animal disminuye con la edad y esta disminución en el nivel de GDF11 está asociada con la hipertrofia cardíaca en el animal que envejece. Los inventores han descubierto aún más el potencial terapéutico de aumentar el nivel de GDF11 en un animal, particularmente en lo que se refiere a afecciones cardíacas, incluidos los asociados con el envejecimiento. La presente invención está definida por las reivindicaciones.

Un aspecto de esta divulgación es un método para tratar una afección cardiovascular, comprendiendo el método administrar a un sujeto una composición que aumenta el nivel de polipéptido GDF11 en el sujeto.

En algunas realizaciones de esta divulgación, el nivel de polipéptido GDF11 es el nivel de GDF11 en la circulación del sujeto. En algunas realizaciones, el nivel de polipéptido GDF11 es el nivel de GDF11 en el tejido cardíaco del sujeto.

En algunas realizaciones de esta divulgación, el sujeto tiene o ha sido diagnosticado con una afección seleccionada del grupo que consiste en: insuficiencia cardíaca diastólica; hipertrofia cardíaca; hipertrofia cardíaca relacionada con la edad; hipertensión; enfermedad valvular; estenosis aórtica; miocardiopatía hipertrófica genética; o rigidez del corazón debido al envejecimiento.

En algunas realizaciones de esta divulgación, la composición comprende un polipéptido GDF11. En algunas realizaciones, la composición comprende un polipéptido GDF11 que comprende la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO 14. En algunas realizaciones, la composición comprende un polipéptido GDF11 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 15. En algunas realizaciones, la composición comprende un polipéptido GDF11 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 2. En algunas realizaciones, la composición comprende un polipéptido GDF11 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones de esta divulgación, la composición comprende homodímeros de polipéptidos GDF11 que comprenden la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO 1, 2, 14 y/o 15. En algunas realizaciones, la composición comprende complejos de polipéptidos GDF11 que comprenden la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO 1, 2, 14 y/o 15.

En algunas realizaciones de esta divulgación, la composición comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido GDF11.

En algunas realizaciones de esta divulgación, la composición se administra a través de una vía seleccionada del grupo que consiste en: por vía intravenosa; por vía subcutánea; intraarterial; y arteria intracoronaria. En algunas realizaciones, el nivel de GDF11 aumenta al menos en un 100 %. En algunas realizaciones, el nivel de GDF11 se incrementa al menos al 75 % de un nivel de referencia saludable.

En un aspecto de la presente divulgación, la tecnología descrita en el presente documento se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido GDF11 aislado y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto de la presente divulgación, la tecnología descrita en el presente documento se refiere al uso de un polipéptido GDF11 para el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en: insuficiencia cardíaca diastólica; hipertrofia cardíaca; la hipertensión; enfermedad valvular; estenosis aórtica; miocardiopatía hipertrófica genética; o rigidez del corazón debido al envejecimiento. La presente invención está definida por las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1C demuestran que la parabiosis heterocrónica revierte la hipertrofia cardíaca relacionada con la edad. La figura 1A representa un esquema del experimento. Se generaron seis pares de ratones jóvenes isocrónicos y viejos parabióticos isocrónicos. Cuatro semanas después de la cirugía, se sacrificaron los ratones y se recogieron los tejidos para su análisis. La figura 1B demuestra una reducción dramática en el tamaño del corazón en ratones viejos expuestos a una circulación joven durante 4 semanas. En parabiontes heterocrónicos, la hipertrofia del corazón más viejo parece retroceder, mientras que el corazón de parabionte más joven no desarrolla hipertrofia. La figura 1C muestra un gráfico que representa la relación peso del corazón:longitud de la tibia después de 4 semanas de parabiosis, Datos mostrados como media $\pm$ s.e.m.

Las figuras 2A-2B demuestran la reversión de la hipertrofia de cardiomiocitos relacionada con la edad por exposición a una circulación joven. La figura 2A representa el área de la sección transversal de los miocitos en el VI basada en la tinción PAS en hembras. Para cada animal, el tamaño del miocito se determinó a partir de mediciones del área de la sección transversal de 100-200 miocitos en 5 secciones de miocardio independientes. Los resultados se basan en el promedio de 4 a 12 animales por grupo. La figura 2B muestra los resultados cuando el experimento se realizó con ratones macho. Datos mostrados como media $\pm$ s.e.m.

Las figuras 3A-3C demuestran que la reversión de la hipertrofia cardíaca en ratones viejos expuestos a una circulación joven no se explica por una reducción de la presión arterial en ratones parabióticos heterocrónicos viejos. La figura 3A representa las mediciones de la presión arterial y el pulso. La presión arterial sistólica se midió en ratones jóvenes y viejos no operados al inicio del estudio utilizando un sistema computarizado de manguito-cola. La frecuencia del pulso se midió usando el mismo sistema. Los ratones jóvenes (2 meses) muestran una presión arterial sistólica significativamente más alta en comparación con los ratones viejos (21 meses) sin diferencia en la frecuencia del pulso. La figura 2B muestra los resultados cuando se utiliza un sistema de manguito-cola modificado para mantener pares parabióticos para medir la presión arterial simultáneamente a las 4, 7 y 10 semanas después del agrupamiento de los ratones. Los ratones heterocrónicos viejos mostraron un aumento significativo en la presión arterial sistólica a las 7 y 10 semanas; los ratones isocrónicos viejos tuvieron un aumento significativo en la presión arterial a las 7 semanas en comparación con los valores basales, *: $P < 0,05$. La figura 3C representa los valores obtenidos para la presión arterial media cuando se determina realizando cateterizaciones intraarteriales terminales obtenidas simultáneamente en ratones emparejados después de que se hayan unido durante 10 semanas. No se observaron diferencias significativas entre los grupos diferentes. Datos mostrados como media $\pm$ s.e.m.

Las figuras 4A-4C muestran evidencia molecular para la remodelación cardíaca del miocardio envejecido por una circulación sistémica joven. El ARN se extrajo de los corazones y se analizó por PCR en tiempo real. Los niveles de ANP (Figura 4A) y BNP (Figura 4B) se redujeron significativamente en ratones viejos expuestos a una circulación joven en comparación con los ratones isocrónicos viejos. La Figura 4C muestra un gráfico que demuestra que los niveles de transcripción de SERCA-2 fueron significativamente más altos en ratones viejos expuestos a una circulación joven en comparación con ratones isocrónicos viejos. Niveles de transcripción medidos con PCR en tiempo real y normalizados al grupo Y-IP. Datos mostrados como media $\pm$ s.e.m.

La figura 5 representa la confirmación del quimerismo. El quimerismo sanguíneo se confirmó en pares parabióticos midiendo la frecuencia de células sanguíneas derivadas de donantes de un compañero (CD45.1+) en el bazo del otro compañero (CD45.2+). Las células derivadas de la pareja normalmente representaban el 40-50 % de los esplenocitos, consistente con el establecimiento de la circulación cruzada parabiótica. Debido a que los ratones viejos CD45.1+ no están disponibles comercialmente, no fue posible verificar el establecimiento del quimerismo en pares parabióticos viejos; sin embargo, la amplia experiencia de los inventores con este modelo y los datos no publicados de los pares GFP^{jóvenes}/WT^{viejos} apoyan firmemente la conclusión de que la circulación cruzada se establece de manera igualmente efectiva en estas parejas completamente isogénicas.

Las figuras 6A-6B representan el diseño del experimento y la evaluación de la masa cardíaca. La figura 6A presenta un esquema del experimento, en el que se generaron ratones jóvenes isocrónicos heterocrónicos y viejos isocrónicos parabióticos. Diez semanas después de la cirugía, se sacrificaron ratones y se recogieron tejidos para su análisis. La figura 6B muestra un gráfico que representa la relación peso del corazón: longitud de la tibia después de 10 semanas de parabiosis, Datos mostrados como media $\pm$ ETM

Las figuras 7A-7B demuestran que los ratones jóvenes tienen un mayor nivel de GDF11 que los ratones más viejos. La figura 7A muestra los resultados de un ensayo ELISA, mientras que la figura 7B muestra los resultados de una transferencia Western.

La figura 8 representa una alineación del polipéptido precursor de GDF11 humano (secuencia de consulta; restos 62-407 de la SEQ ID NO: 1) y polipéptido precursor de GDF8 humano (secuencia sujeto; SEQ ID NO: 18).

La figura 9 representa una alineación del péptido precursor de GDF11 humano (secuencia de consulta; restos 47-407 de la SEQ ID NO: 1) y péptido precursor de GDF11 murino (secuencia sujeto; SEQ ID NO: 19).

Las figuras 10A-10D demuestran que las diferencias en la presión arterial entre los ratones CD45.1 y CD45.2 jóvenes no explican la reversión de la hipertrofia cardíaca. La figura 10A representa un gráfico que representa la relación peso cardíaco/longitud de tibia después de 4 semanas de parabiosis, utilizando solo ratones CD45.2. La figura 10B representa un gráfico del área de la sección transversal del miocito ventricular izquierdo basada en la tinción PAS en ratones CD45.2. La exposición de un ratón viejo a la circulación de un ratón CD45.2 joven revierte la hipertrofia cardíaca. La figura 10C muestra un gráfico que demuestra que los ratones viejos unidos a los ratones CD45.1 o CD45.2 jóvenes no muestran diferencias en la presión arterial medida por el sistema de manguito en la cola después de 4 semanas. La figura 10D muestra un gráfico que demuestra que no se detectaron diferencias significativas entre los grupos en la presión arterial con mediciones basadas en catéteres intraarteriales terminales. Datos mostrados como media $\pm$ s.e.m.

Las figuras 11A-11C demuestran que la parabiosis simulada heterocrónica no revierte la hipertrofia cardíaca en ratones de edad avanzada. La figura 11A representa gráficos de citometría de flujo que representan la expresión de CD45.1 (eje y) o CD45.2 (eje x) por esplenocitos aislados de ratones jóvenes o viejos unidos por parabiosis heterocrónica simulada. Los pares parabióticos simulados no mostraron circulación cruzada de células sanguíneas derivadas de la pareja, como se observa en la parabiosis experimental. La figura 11B muestra un gráfico que representa la relación peso del corazón/longitud de tibia después de 4 semanas de parabiosis simulada. La figura 11C representa un gráfico del área transversal del miocito del ventrículo izquierdo basada en la tinción PAS después de 4 semanas de parabiosis simulada. Datos mostrados como media $\pm$ s.e.m.

Las figuras 12A-12F demuestran que los niveles circulantes de GDF11 se reducen en ratones de edad avanzada y la restauración de GDF11 a niveles "juveniles" promueve la reversión de la hipertrofia cardíaca y la remodelación molecular. La figura 12A muestra los resultados del análisis de transferencia Western que demuestra niveles reducidos de GDF11 en el plasma de ratones viejos en comparación con ratones jóvenes (n = 3 por grupo). De manera similar, el GDF11 se reduce en el plasma de los ratones viejos isocrónicos (O-IP) en comparación con los ratones jóvenes isocrónicos (Y-IP) y se restablece a niveles "juveniles" en los ratones viejos después de la exposición a una circulación joven (O-HP) (n = 3 por grupo). La figura 12B representa un gráfico de hipertrofia cardíaca inducida por fenilefrina medida por la incorporación de ³H-leucina en miocitos cardíacos expuestos a rGDF11 o miostatina. El rGDF11 (50 nM) evitó la incorporación de ³H-leucina inducida por fenilefrina. La figura 12C demuestra que GDF11 señala a través de una vía TGF β y suprime la fosforilación del factor de transcripción de Forkhead en cardiomiocitos humanos. Las transferencias Western de cardiomiocitos derivados de células madre pluripotenciales inducidas por humanos estimuladas durante 15 minutos con medios libres de suero (control) o con los mismos medios que contienen las proteínas indicadas. La figura 12D representa un gráfico de un estudio aleatorizado controlado con vehículo de la terapia con rGDF11 en ratones de edad avanzada (23 meses). rGDF11 (0,1 mg/kg) o solución salina (control del vehículo) administrado por inyección intraperitoneal diaria durante 30 días. Gráfico que representa la relación peso del corazón/longitud de tibia. La figura 12E representa un gráfico del área de la sección transversal del miocito ventricular izquierdo medida después de la tinción con PAS. La terapia con rGDF11 conduce a una reducción en el área transversal de los miocitos. La figura 12F representa gráficos de expresión de ANP, BNP o SERCA-2 en corazones recolectados de ratones viejos tratados con rGDF11 o solución salina. Las mediciones de la transcripción de PCR en tiempo real se normalizan a niveles en el grupo de solución salina. Datos mostrados como media $\pm$ s.e.m.

Las figuras 13A-13C demuestran que el bazo tiene un nivel significativamente mayor de expresión de GDF11 entre los tejidos analizados y muestra una reducción significativa dependiente de la edad en la expresión de GDF11 y la síntesis de proteínas. La figura 13A representa un gráfico de expresión de GDF11 en tejidos recolectados de ratones jóvenes (3 meses). Las mediciones del transcrito de la PCR en tiempo real se normalizan a niveles en el hígado. La expresión génica en el bazo fue significativamente mayor (* P < 0,05) en comparación con todos los otros tejidos. La figura 13B representa un gráfico de expresión de GDF11 en el bazo

extirpado de ratones jóvenes (3 meses) y viejos (24 meses). Las mediciones del transcrito de la PCR en tiempo real se normalizan a niveles en ratones jóvenes. La Figura 13C representa un gráfico del análisis de transferencia Western de GDF11 en el bazo de ratones jóvenes y viejos. Densitometría (unidades arbitrarias, media $\pm$ s.e.m) de GDF11 normalizado a α -tubulina. Datos mostrados como media $\pm$ s.e.m.

La Figura 14 demuestra que los niveles de GDF11 pueden aumentarse de manera persistente durante 24 horas en plasma después de un único bolo intraperitoneal. Los niveles de GDF11 en plasma se evaluaron mediante análisis Western en los momentos indicados después de una inyección intraperitoneal única de 0,1 mg/kg de GDF11 recombinante (n = 3).

Las Figuras 15A-15C demuestran que la suplementación de rGDF11 no previno el desarrollo de hipertrofia cardíaca después de la sobrecarga de presión por constricción aórtica transversal en ratones jóvenes. La Figura 15A representa un gráfico que representa la relación peso del corazón/longitud de tibia después de 30 días de tratamiento con rGDF11 o vehículo. La proporción en ratones a los que se inyectó rGDF11 (n = 10) no fue significativamente diferente de la proporción medida en ratones a los que se inyectó vehículo (n = 9) (9,08 $\pm$ 0,71 frente a 9,89 $\pm$ 0,69 mm/mg, P=ns). La figura 15B representa un gráfico del área de la sección transversal del miocito ventricular izquierdo medida después de la tinción con PAS después de 30 días de tratamiento con rGDF11 o vehículo. El área de la sección transversal de los cardiomiocitos no fue significativamente diferente en los dos grupos ((286,4 $\pm$ 12,89 μ m² en los tratados con rGDF11, 304,2 $\pm$ 17,3 μ m² en los tratados con vehículo, P=ns). La Figura 15C muestra una tabla con datos ecocardiográficos después de 30 días de tratamiento con rGDF11 o vehículo. No se observaron diferencias significativas en los parámetros ecocardiográficos de remodelación o función ventricular. AWT = espesor de la pared anterior; PWT = espesor de la pared posterior; EDD = dimensión telediastólica; ESD = dimensión telesistólica; FS = acortamiento fraccional. Datos mostrados como media $\pm$ s.e.m.

La figura 16 representa un gráfico de las mediciones en suero de la proteína GDF11 en humanos normales, n = 3 por grupo, por edad y género. Los niveles aproximados de ratones jóvenes y viejos se muestran a la izquierda del gráfico en unidades arbitrarias.

Descripción detallada

Las realizaciones de la tecnología descrita en el presente documento se basan en el descubrimiento de que a medida que los animales envejecen, su nivel de polipéptido GDF11 disminuye y produce hipertrofia cardíaca. En el presente documento se describen métodos y composiciones para el tratamiento de afecciones cardíacas que incluyen, aunque sin limitaciones, insuficiencia cardíaca diastólica; hipertrofia cardíaca; hipertrofia cardíaca relacionada con la edad; la hipertensión; enfermedad valvular; estenosis aórtica; miocardiopatía hipertrófica genética; y/o rigidez del corazón debido al envejecimiento. Estos métodos y composiciones se refieren generalmente al aumento del nivel de polipéptido GDF11 en un sujeto para tratar, prevenir o revertir las afecciones cardíacas descritas en el presente documento.

Por conveniencia, ciertos términos empleados en el presente documento, en la memoria descriptiva, en los ejemplos y en las reivindicaciones adjuntas se recogen en el presente documento. A menos que se indique lo contrario, o esté implícito en el contexto, los siguientes términos y frases incluyen los significados que se proporcionan a continuación. A menos que se indique explícitamente lo contrario, o sea evidente por el contexto, los términos y frases a continuación no excluyen el significado que el término o frase ha adquirido en la materia a la que pertenece. Las definiciones se proporcionan para ayudar a describir realizaciones particulares, y no pretenden limitar la invención reivindicada, dado que el alcance de las realizaciones se limita solo por las reivindicaciones. A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "afección cardiovascular" se refiere a una afección mediada o caracterizada por una reducción en el polipéptido GDF11 circulante. Los ejemplos no limitantes de afecciones cardiovasculares incluyen insuficiencia cardíaca diastólica; hipertrofia cardíaca; la hipertensión; enfermedad valvular; estenosis aórtica; miocardiopatía hipertrófica genética; o rigidez del corazón debido al envejecimiento.

Los términos "disminuir" "reducir", "reducido", "reducción", "disminución", e "inhibir" se usan en el presente documento en general para significar una disminución en una cantidad estadísticamente significativa con respecto a un valor de referencia. Sin embargo, para evitar dudas, "reducir", "reducción" o "disminuir" o "inhibición" generalmente significa una disminución de al menos un 10 % en comparación con un nivel de referencia y puede incluir, por ejemplo, una disminución de al menos un 20 %, al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 35 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 45 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 55 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 65 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, hasta e incluyendo, por ejemplo, la ausencia completa de la entidad o parámetro dado en comparación con el nivel de referencia, o cualquier disminución entre 10-99 % en comparación con la ausencia de un tratamiento dado.

Los términos "aumentado", "aumentar" o "mejorar" o "activar" se usan en el presente documento para significar generalmente un aumento en una cantidad estadísticamente significativa; para evitar cualquier duda, los términos "aumentado", "aumentar" o "mejorar" o "activar" significa un aumento de al menos un 10 % en comparación con un nivel de referencia, por ejemplo un aumento de al menos aproximadamente un 20 % o al menos aproximadamente un 30 % o al menos aproximadamente un 40 % o al menos aproximadamente un 50 % o al menos aproximadamente un 60 % o al menos aproximadamente un 70 % o al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 % o hasta, e incluyendo, un aumento del 100 % o cualquier aumento entre 10-100 % en comparación con un nivel de referencia, o al menos aproximadamente un incremento de 2 veces o al menos aproximadamente de 3 veces o al menos aproximadamente de 4 veces o al menos aproximadamente de 5 veces o al menos aproximadamente de 10 veces o cualquier aumento entre 2 veces y 10 veces o más en comparación con un nivel de referencia.

El término "aislado" o "parcialmente purificado" como se usa en el presente documento se refiere, en el caso de un ácido nucleico o polipéptido, a un ácido nucleico o polipéptido separado de al menos otro componente (por ejemplo, ácido nucleico o polipéptido) que está presente con el ácido nucleico o polipéptido como se encuentra en su fuente natural y/o que estaría presente con el ácido nucleico o polipéptido cuando está expresado por una célula o secretado en el caso de polipéptidos secretados. Un ácido nucleico o polipéptido sintetizado químicamente o uno sintetizado usando transcripción/traducción *in vitro* se considera "aislado".

La expresión "muestra biológica" como se usa en el presente documento denota una muestra tomada o aislada de un organismo biológico, por ejemplo, muestra de biopsia cardíaca, muestra de sangre, lisado de células, un homogeneizado de una muestra de tejido de un sujeto, o una muestra de fluido de un sujeto. Las muestras biológicas de ejemplo incluyen, aunque sin limitación, biopsias de tejido cardíaco o muestras de sangre y/o suero. En algunas realizaciones, la muestra es de una resección, biopsia o biopsia con aguja gruesa. Además, se pueden utilizar muestras de aspiración con aguja fina. Las muestras pueden incluir tejido embebido en parafina y congelado. La expresión "muestra biológica" también incluye muestras biológicas no tratadas o pretratadas (o preprocesadas). En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra biológica no tratada. La muestra se puede obtener eliminando una muestra de células de un sujeto, pero también se puede lograr mediante el uso de células previamente aisladas (por ejemplo, aisladas en un punto de tiempo anterior y aisladas por la misma u otra persona).

Tal como se usa en el presente documento, un "sujeto" significa un ser humano o animal. Por lo general, el animal es un vertebrado, tal como un primate, roedor, animal doméstico o animal de caza. Los primates incluyen chimpancés, monos cinomolgos, monos araña y macacos, por ejemplo, Rhesus. Los roedores incluyen ratones, ratas, marmotas, hurones, conejos y hámsteres. Los animales domésticos y de caza incluyen vacas, caballos, cerdos, ciervos, bisontes, búfalos, especies felinas, por ejemplo, gato doméstico, especies caninas, por ejemplo, perros, zorros, lobos, especies de aves, por ejemplo, pollo, emús, avestruces y peces, por ejemplo, truchas, bagre y salmón. Paciente o sujeto incluye cualquier subconjunto de lo anterior, por ejemplo, todos los anteriores, pero excluyendo uno o más grupos o especies, tales como seres humanos, primates o roedores. En ciertas realizaciones, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un primate, por ejemplo, un ser humano. Las expresiones "paciente", "individuo" y "sujeto" se usan indistintamente en el presente documento.

Preferentemente, el sujeto es un mamífero. El mamífero puede ser un ser humano, primate no humano, ratón, rata, perros, un gato, caballo o vaca, aunque sin limitaciones a estos ejemplos. Se pueden usar ventajosamente otros mamíferos que no sean humanos, por ejemplo, como sujetos que representan modelos animales de, por ejemplo, hipertrofia cardíaca. Además, los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar animales domésticos y/o mascotas. Un sujeto puede ser hombre o mujer.

Un sujeto puede ser uno que ha sido diagnosticado previamente o identificado como que padece o tiene una afección que necesita tratamiento (por ejemplo, hipertrofia cardíaca) o una o más complicaciones relacionadas con dicha afección, y opcionalmente, aunque no necesariamente, que ya se haya sometido a un tratamiento para una afección o una o más complicaciones relacionadas con la afección. Como alternativa, un sujeto también puede ser uno que no ha sido diagnosticado previamente como que tiene una afección que necesita tratamiento o una o más complicaciones relacionadas con dicha afección. Más bien, un sujeto puede incluir uno que exhibe uno o más factores de riesgo para una afección o una o más complicaciones relacionadas con una afección. Un "sujeto en necesidad" de tratamiento para una afección particular puede ser un sujeto que tiene esa afección, diagnosticado como que tiene esa afección, o con un mayor riesgo de desarrollar esa afección en relación con una población de referencia dada.

Como se usa en el presente documento, el término "que comprende" o "comprende" se usa en referencia a composiciones, métodos y sus respectivos componentes, que son esenciales para el método o composición, pero abierto a la inclusión de elementos no especificados, ya sea esenciales o no.

El término "que consiste en" se refiere a composiciones, métodos y sus respectivos componentes como se describe en el presente documento, que son exclusivos de cualquier elemento no mencionado en esa descripción de la realización.

Como se usa en el presente documento, la expresión "que consiste esencialmente en" se refiere a los elementos requeridos para una realización dada. El término permite la presencia de elementos que no afectan materialmente las características básicas y novedosas o funcionales de esa realización.

Como se usan en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", y "la/el" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, las referencias a "el método" incluyen uno o más métodos, y/o etapas del tipo que se describe en el presente documento y/o que serán evidentes para los expertos en la materia después de leer esta divulgación y así sucesivamente. De forma similar, la palabra "o" se pretende que incluya "y" a no ser que el contexto dicte claramente lo contrario. Aunque pueden usarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente divulgación, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. La abreviatura, por ejemplo, (p. ej.) deriva del latín *exempli gratia* y se usa en el presente documento para indicar un ejemplo no limitante. Por tanto, la abreviatura, "e. g" (p. ej.) es sinónimo de la expresión "por ejemplo".

Excepto en los ejemplos operativos, o donde se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción usadas en el presente documento deben entenderse modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente" cuando se usa en relación con porcentajes puede significar $\pm 1\%$.

La expresión "estadísticamente significativo" o "significativamente" se refiere a significación estadística y generalmente significa una diferencia de dos desviaciones estándar (2SD), por encima o por debajo de un valor de referencia. Se proporcionan definiciones adicionales en el texto de las secciones individuales a continuación.

Las definiciones de los términos comunes en biología celular y biología molecular se pueden encontrar en el "The Merck Manual of Diagnosis and Therapy", 19ª edición, publicado por Merck Research Laboratories, 2006 (ISBN 0-911910-19-0); Robert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); La guía ELISA (Métodos en biología molecular 149) de Crowther J. R. (2000); Immunology de Werner Luttmann, publicado por Elsevier, 2006. También pueden encontrarse definiciones de términos comunes en biología molecular en Benjamin Lewin, Genes X, publicado por Jones & Bartlett Publishing, 2009 (ISBN-10: 0763766321); Kendrew et al. (eds.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8) y Current Protocols in Protein Sciences 2009, Wiley Intersciences, Coligan *et al.*, eds.

Salvo que se indique de otra forma, la presente invención se realizó usando procedimientos estándar, tal como se ha descrito, por ejemplo en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3 ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., Estados Unidos (2001) y Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., Nueva York, USA (1995) que se incorporan por referencia en el presente documento en su totalidad.

En el presente documento se describen métodos que comprenden administrar a un sujeto una composición que aumenta el nivel de polipéptido GDF11 en el sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es alguien que tiene o ha sido diagnosticado con una afección relacionada con la edad. Tal como se usa en el presente documento, el término "afección relacionada con la edad" se refiere a cualquier enfermedad, trastorno, o estado indeseable cuya incidencia en una población o gravedad en un individuo se correlaciona con la progresión de la edad. En algunas realizaciones, la afección relacionada con la edad es una afección cardiovascular; envejecimiento del corazón; envejecimiento del músculo esquelético; o envejecimiento del cerebro. El envejecimiento de cualquier órgano puede incluir, aunque sin limitaciones, celularidad reducida, integridad genómica reducida de las células madre, función celular reducida (por ejemplo, reducción de la contracción muscular en el tejido muscular), capacidad regenerativa reducida, atrofia (por ejemplo, el envejecimiento de la piel puede incluir atrofia de la epidermis y/o folículos sebáceos). Una afección relacionada con la edad puede ser una que reduce la función de un órgano determinado o una que es estéticamente indeseable (por ejemplo, el envejecimiento de la piel o el músculo puede ser estéticamente indeseable). Las condiciones adicionales relacionadas con la edad pueden incluir, pero sin limitación: sarcopenia, atrofia de la piel, emaciación, atrofia cerebral, aterosclerosis, arteriosclerosis, enfisema pulmonar, osteoporosis, artrosis, incompetencia inmunológica, tensión arterial alta, demencia, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, cataratas, degeneración macular asociada a la edad, cáncer de próstata, ictus, disminución de la esperanza de vida, pérdida de memoria, arrugas, insuficiencia renal y pérdida auditiva relacionada con la edad. "Trastorno metabólico", tal como se usan en el presente documento, significará cualquier enfermedad o trastorno que dañe o interfiera con la función normal en una célula, tejido u órgano al afectar la producción de energía en las células o la acumulación de toxinas en una célula, tisú, órgano o individuo. Los trastornos metabólicos relevantes para la presente invención incluyen, aunque sin limitación, diabetes de tipo II, síndrome metabólico, hiperglucemia y obesidad.

En algunas realizaciones, la composición que aumenta el nivel del polipéptido GDF11 se administra a un sujeto que ha sido o ha sido diagnosticado con insuficiencia cardíaca diastólica, hipertrofia cardíaca, hipertrofia cardíaca relacionada con la edad, hipertensión, enfermedad valvular, estenosis aórtica, cardiomiopatía hipertrófica genética

y/o rigidez del corazón debido al envejecimiento.

En algunas realizaciones, el nivel de polipéptido GDF11 es el nivel de GDF11 en la circulación de un sujeto. En algunas realizaciones, el nivel de polipéptido GDF11 es el nivel de GDF11 en el tejido cardíaco de un sujeto. En algunas realizaciones, el nivel de polipéptido GDF11 se determina midiendo el nivel de un ARNm que codifica un polipéptido GDF11. El nivel de GDF11 en un sujeto puede determinarse obteniendo una muestra biológica del sujeto y determinando el nivel de GDF11 en la muestra biológica. Los métodos para determinar el nivel de un polipéptido en un sujeto o una muestra obtenida de un sujeto son bien conocidos en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, ELISA, radioinmunoensayo, inmunohistoquímica, métodos que implican un anticuerpo marcado específico para GDF11, análisis de transferencias puntuales, transferencia Northern, hibridación *in situ* y RT-PCR, entre otros. Los anticuerpos específicos para GDF11 están disponibles comercialmente, por ejemplo, n.º de cat. ab71347 de Abcam; Cambridge, MA. En algunas realizaciones, el nivel de GDF11 se puede medir como se describe en Souza et al., Molecular Endocrinology 2008 22:2689-2702; que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

A medida que los animales envejecen, Los tejidos cardíacos a menudo experimentan una disminución en la función diastólica relacionada con un engrosamiento y/o rigidez del tejido o hipertrofia cardíaca. Tal como se usa en el presente documento, La expresión "hipertrofia cardíaca" se refiere a un agrandamiento del corazón debido en parte a un aumento en el tamaño de los miocitos. En algunas realizaciones, los miocitos responden al estrés a través del crecimiento hipertrófico. La hipertrofia cardíaca a menudo se asocia con un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad. En algunas realizaciones, la hipertrofia cardíaca es la hipertrofia cardíaca del ventrículo izquierdo. La expresión "hipertrofia cardíaca del ventrículo izquierdo" se refiere a un trastorno en el que el tejido miocárdico del ventrículo izquierdo del corazón se engrosa. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, las causas de la hipertrofia cardíaca del ventrículo izquierdo incluyen, por ejemplo, hipertensión (por ejemplo, presión arterial alta), estenosis de la válvula aórtica (por ejemplo, la incapacidad de la válvula cardíaca para abrirse completamente) y miocardiopatía hipertrófica (por ejemplo, un trastorno en el que el tejido miocárdico se engrosa sin causa aparente). En otras realizaciones, la hipertrofia cardíaca es la hipertrofia cardíaca del ventrículo derecho. La expresión "hipertrofia cardíaca del ventrículo derecho" se refiere a un trastorno en el que el tejido miocárdico del ventrículo derecho se engrosa. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, las causas de la hipertrofia del ventrículo derecho incluyen, por ejemplo, enfermedades que dañan los pulmones, tales como enfisema y fibrosis quística; afecciones que disminuyen los niveles de oxígeno en el cuerpo, tales como bronquitis crónica y apnea del sueño; estenosis de la válvula cardíaca pulmonar, embolia pulmonar crónica, hipertensión pulmonar primaria, hipertrofia septal asimétrica y estenosis subaórtica hipertrófica idiopática.

Los síntomas de la hipertrofia cardíaca y los métodos para medirlos son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, un aumento en la masa ventricular izquierda; un cambio en la relación de peso corporal; cambios en el tamaño de los cardiomiocitos, su masa y organización; cambios en la expresión génica cardíaca; cambios en la función cardíaca (por ejemplo, función cardíaca diastólica); deposición de fibromas; cambios en dP/dT, es decir, la tasa de cambio de la presión ventricular con respecto al tiempo; flujo de iones de calcio; longitud del golpe; y gasto ventricular. Los procedimientos de diagnóstico útiles para detectar afecciones cardiovasculares y/o la eficacia del tratamiento de afecciones cardiovasculares incluyen ecocardiografía (por ejemplo, 2 y 3 dimensiones), MRI (por ejemplo, Resonancia magnética espineco o angiografía por resonancia magnética de cine), radiografía de tórax, imágenes de miocardio con talio-201, PET, CT guiada por ECG, cateterismo cardíaco, angiografía, estudios electrofisiológicos y espectroscopía de resonancia magnética. Por ejemplo, la ecocardiografía puede detectar el tamaño del corazón, el patrón de hipertrofia, la función contráctil del corazón y la gravedad del gradiente de salida mientras que la resonancia magnética puede evaluar la anatomía ventricular, el espesor de pared, la función ventricular, los volúmenes ventriculares telediastólico y telesistólico, la disfunción valvular y la obstrucción del tracto de salida.

Los métodos y composiciones descritos en el presente documento se refieren al aumento del nivel de polipéptido GDF11 en un sujeto. Tal como se usa en el presente documento, "GDF11" se refiere al "Factor 11 de Crecimiento y Diferenciación" (ID de Gen NCBI No: 10220), miembro de la superfamilia de factores de crecimiento del factor beta de crecimiento transformante. Se sabe que GDF11 se une a los receptores de la superfamilia TGFβ tipo I, incluidos ALK4, ALK5 e ALK7. Para la señalización en el desarrollo de mamíferos, GDF11 utiliza predominantemente ALK4 y ALK5. En algunas realizaciones, la señalización de GDF11 también puede ocurrir a través del receptor ACVR2B. GDF11 también está estrechamente relacionado con GDF8 (también conocido como miostatina). GDF11 también se puede denominar proteína morfogénica ósea 11, es decir, BMP11. Tal como se usa en el presente documento, "GDF11" puede incluir el polipéptido precursor humano (SEQ ID NO:1, NCBI RefSeq: NP_005802); el propéptido humano (SEQ ID NO:2); el polipéptido N-terminal humano (SEQ ID NO: 15), y las formas maduras humanas (SEQ ID NO:14) de GDF11 así como las homólogas de otras especies, incluidos, entre otros, bovinos, perros, pollos, gatos, murinos, ratas, porcinos, ovinos, pavos, caballos, peces, babuinos y otros primates. Los términos también se refieren a fragmentos o variantes de GDF11 que mantienen al menos el 50 % del efecto reductor (o prevención) de hipertrofia cardíaca del GDF11 de longitud completa de las SEQ ID NO:2, SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 14, por ejemplo, medido en un modelo animal apropiado. Las variantes de sustitución conservadoras que mantienen la actividad de reducción o prevención de la hipertrofia cardíaca del GDF11 de tipo salvaje incluirán una sustitución conservadora como se define en el presente documento. La identificación de los aminoácidos con mayor

probabilidad de ser tolerantes a la sustitución conservadora mientras se mantiene al menos el 50 % de la actividad del tipo salvaje se guía por, por ejemplo, alineación de secuencia con homólogos de GDF11 o parálogos de otras especies. Los aminoácidos que son idénticos entre los homólogos de GDF11 tienen menos probabilidades de tolerar el cambio, mientras que aquellos que muestran diferencias conservadoras son obviamente mucho más propensos a tolerar cambios conservadores en el contexto de una variante artificial. De forma similar, es menos probable que las posiciones con diferencias no conservativas sean críticas para la función y toleren más la sustitución conservadora en una variante artificial. Las variantes pueden analizarse para determinar la actividad, por ejemplo, administrando la variante a un modelo animal apropiado con hipertrofia cardíaca e imágenes como se describe en el presente documento para seguir cualquier reversión de la hipertrofia.

Para el GDF 11 humano, la secuencia de señal pro-péptido más (por ejemplo, el polipéptido precursor) tiene una longitud de 407 aminoácidos. La escisión del péptido señal de 24 aminoácidos genera un pro-péptido de 383 aminoácidos y la escisión del propéptido da como resultado un polipéptido GDF11 maduro de 109 aminoácidos que corresponde a los 109 aminoácidos C-terminales del pro-péptido. El polipéptido maduro forma un homodímero unido por disulfuro. La escisión del pro-péptido también genera el polipéptido N-terminal (por ejemplo, SEQ ID NO:15) que comprende los aminoácidos 25-298 de SEQ ID NO:1. El polipéptido GDF11 N-terminal puede antagonizar la actividad de, por ejemplo, los polipéptidos de SEQ ID NO: 2 y 14, al menos *in vitro* formando un complejo con las otras formas de polipéptidos GDF11 y, por lo tanto, puede usarse para modular la actividad de las composiciones de GDF11 como se describe en el presente documento. Por tanto, en la medida en que los polipéptidos GDF11 como se describen en el presente documento reducen o previenen afecciones cardíacas, por ejemplo, hipertrofia cardíaca o rigidez, entre otros, y en la medida del polipéptido GDF11 N-terminal de, por ejemplo, SEQ ID NO: 15, puede antagonizar dicha reducción o prevención, el polipéptido de SEQ ID NO: 15 puede excluirse del significado de "polipéptido GDF11" como se usa ese término en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "proteínas" y "polipéptidos" se usan indistintamente para designar una serie de restos de aminoácidos conectados entre sí por enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carboxi de restos adyacentes. Los términos "proteína" y "polipéptido" se refieren a un polímero de aminoácidos proteicos, incluyendo aminoácidos modificados (por ejemplo, fosforilados, glicosilados, etc.) y análogos de aminoácidos, independientemente de su tamaño o función. "Proteína" y "polipéptido" se usan a menudo en referencia a polipéptidos relativamente grandes, considerando que el término "péptido" se utiliza a menudo en referencia a polipéptidos pequeños, pero el uso de estos términos en la técnica se superpone. Los términos "proteína" y "polipéptido" se usan indistintamente en la presente memoria cuando se refieren a un producto génico y fragmentos del mismo. Además de las proteínas naturales, homólogos, ortólogos, parálogos, fragmentos y otros equivalentes, también se desvelan variantes, fragmentos y análogos de lo anterior. Tal como se usa en el presente documento, "pro-péptido" usado en referencia a GDF11 se refiere a un polipéptido GDF11 en el que el dominio de señal (por ejemplo, los aminoácidos 1-24 de la SEQ ID NO: 1) se ha escindido durante la formación de las formas maduras y/o activas de GDF11. Tal como se usa en el presente documento, "péptido precursor" usado en referencia a GDF11 se refiere a un polipéptido GDF 11 que comprende el dominio de señal, por ejemplo, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

En algunas realizaciones, el nivel de GDF11 en un sujeto se incrementa administrando una composición que comprende un polipéptido GDF11 y/o un ácido nucleico que codifica un polipéptido GDF11. Un polipéptido GDF11 administrado a un sujeto de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento puede comprender un polipéptido GDF11 como se describe anteriormente en el presente documento, por ejemplo, un pro-péptido o forma madura. En algunas realizaciones, el polipéptido GDF11 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el polipéptido GDF11 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2. En algunas realizaciones, el polipéptido GDF11 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14. En algunas realizaciones, el polipéptido GDF11 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15. En algunas realizaciones, la composición administrada al sujeto puede comprender homodímeros de polipéptidos GDF11 que comprenden polipéptidos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14. En algunas realizaciones, la composición administrada al sujeto puede comprender homodímeros de polipéptidos GDF11 que comprenden polipéptidos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15. En algunas realizaciones, la composición administrada al sujeto puede comprender homodímeros de polipéptidos GDF11 que comprenden polipéptidos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2. En algunas realizaciones, la composición administrada al sujeto puede comprender heterodímeros de polipéptidos GDF11 que comprenden polipéptidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:15, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, se puede administrar una variante o fragmento de un polipéptido GDF11 a un sujeto. En algunas realizaciones, la variante de GDF11 es una variante conservadoramente modificada.

En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos descritos en el presente documento, al sujeto se le puede administrar una variante o fragmento (por ejemplo, una variante conservadoramente modificada o un fragmento funcional o un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido) de un polipéptido seleccionado de colectina renal 1 (por ejemplo, n.º identificación del gen NCBI: 78989) (SEQ ID NO: 4), Cathepsina D (por ejemplo, n.º identificación del gen NCBI: 1509) (SEQ ID NO: 5), proteína 4 relacionada con Dickkopf (por ejemplo, N.º de identificación del gen NCBI:

27121) (SEQ ID NO: 6), proteína de membrana de eritrocitos 4.1 (por ejemplo, N.º de identificación del gen NCBI: 2035) (SEQ ID NO: 7), esterasa D (por ejemplo, N.º de identificación del gen NCBI: 2098) (SEQ ID NO: 8), hemoglobina (por ejemplo, N.º de identificación del gen NCBI: 3043 o 3047) (SEQ ID NOS 9 y 20, respectivamente), proteína accesoria del receptor de interleucina-1 (por ejemplo, N.º de identificación del gen NCBI: 3556) (SEQ ID NO: 21), miembro 2 del grupo de células citolíticas D (por ejemplo, N.º de identificación del gen NCBI: 22914) (SEQ ID NO: 22), sustrato 1 de toxina botulínica C3 relacionada con Ras (por ejemplo, N.º de identificación del gen NCBI: 5879) (SEQ ID NO: 23), proteína nuclear de unión a GTP Ran (por ejemplo, N.º de identificación del gen NCBI: 5901) (SEQ ID NO: 24), inhibidor tisular de las metaloproteasas 3 (por ejemplo, N.º de identificación del gen NCBI: 7078) (SEQ ID NO: 25) y timidilato sintasa (por ejemplo, N.º de identificación del gen NCBI: 7298) (SEQ ID NO: 26).

En algunas realizaciones de esta divulgación, el polipéptido GDF11 puede ser una variante de una secuencia descrita en el presente documento, por ejemplo, una variante de un polipéptido GDF11 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la variante es una variante de sustitución conservadora. Se pueden obtener variantes por mutaciones de secuencias de nucleótidos nativas, por ejemplo. Una "variante", tal como se cita en el presente documento, es un polipéptido sustancialmente homólogo a un polipéptido nativo o de referencia, pero que tiene una secuencia de aminoácidos diferente de la del polipéptido nativo o de referencia debido a una o una pluralidad de deleciones, inserciones o sustituciones. Las secuencias de ADN que codifican polipéptidos abarcan secuencias que comprenden una o más adiciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos en comparación con una secuencia de ADN nativa o de referencia, pero que codifica una proteína variante o fragmento de la misma que retiene la actividad biológica relevante en relación con la proteína de referencia, es decir, puede retrasar o revertir la hipertrofia cardíaca al menos un 50 %, así como el GDF11 de tipo salvaje. Como secuencias de aminoácidos, Un experto reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteica que altera un solo aminoácido o un pequeño porcentaje, (es decir, 5 % o menos, por ejemplo, 4 % o menos, o 3 % o menos, o 1 % o menos) de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante conservadoramente modificada" donde la alteración resulta en la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Se contempla que algunos cambios pueden mejorar potencialmente la actividad relevante, tal que una variante, ya sea conservadora o notable, tiene más del 100 % de la actividad de GDF11 de tipo salvaje, por ejemplo, 110 %, 125 %, 150 %, 175 %, 200 %, 500 %, 1000 % o más.

Un método para identificar restos de aminoácidos que se pueden sustituir es alinear, por ejemplo, GDF11 humano a un homólogo de GDF11 de una o más especies no humanas. La alineación puede proporcionar orientación sobre no solo los restos que probablemente sean necesarios para la función, sino también, por el contrario, aquellos restos que probablemente toleren el cambio. Cuando, por ejemplo, una alineación muestra dos aminoácidos idénticos o similares en las posiciones correspondientes, es más probable que ese sitio sea importante funcionalmente. Cuando, por el contrario, la alineación muestra que los restos en las posiciones correspondientes difieren significativamente en tamaño, carga, hidrofobia, etc., es más probable que ese sitio pueda tolerar la variación en un polipéptido funcional. De forma similar, la alineación con un polipéptido relacionado de la misma especie, por ejemplo GDF8, que no muestra la misma actividad, también puede proporcionar orientación con respecto a las regiones o estructuras requeridas para la actividad de GDF11. La figura 8 representa un ejemplo de una alineación entre el péptido precursor de GDF11 humano (secuencia de consulta; restos 62-407 de SEQ ID NO: 1) y péptido precursor GDF8 humano creado usando la configuración predeterminada de la herramienta de alineación del programa BLASTP, disponible gratuitamente en la red mundial en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. La figura 9 representa un ejemplo de una alineación entre el péptido precursor de GDF11 humano (secuencia de consulta; restos 47-407 de SEQ ID NO: 1) y péptido precursor GDF11 murino creado usando la configuración predeterminada de la herramienta de alineación del programa BLASTP, disponible gratuitamente en la red mundial en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. La secuencia de aminoácidos o ADN variante puede ser al menos 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o más, idéntica a una secuencia nativa o de referencia, por ejemplo, las SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o un ácido nucleico que codifica una de esas secuencias de aminoácidos. Se puede determinar el grado de homología (porcentaje de identidad) entre una secuencia nativa y una secuencia mutante, por ejemplo, comparando las dos secuencias utilizando programas informáticos de libre acceso comúnmente empleados para este fin en la red mundial. La secuencia de aminoácidos o ADN variante puede ser al menos 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o más, similar a la secuencia de la que se deriva (denominado en el presente documento una secuencia "original"). Se puede determinar el grado de similitud (porcentaje de similitud) entre una secuencia original y una secuencia mutante, por ejemplo, mediante el uso de una matriz de similitud. Las matrices de similitud son bien conocidas en la técnica y una serie de herramientas para comparar dos secuencias usando matrices de similitud están disponibles gratuitamente en línea, por ejemplo, BLASTp (disponible en la red mundial en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), con los parámetros predeterminados establecidos.

Se observa que el polipéptido GDF11 maduro incluye probables enlaces disulfuro intracatenarios entre, por ejemplo, aminoácido 313 y 372; 341 y 404; y 345 y 406 (numerados en relación con el polipéptido de longitud completa, incluyendo la secuencia de señal) y que el aminoácido 371 probablemente participa en enlaces disulfuro intercatenarios.

- Un aminoácido dado puede ser reemplazado por un resto que tenga características fisicoquímicas similares, por ejemplo, sustituyendo un resto alifático por otro (tal como Ile, Val, Leu, o Ala por el otro), o sustitución de un resto polar por otro (como entre Lys y Arg; Glu y Asp; o Gln y Asn). Otras sustituciones conservadoras de este tipo, por ejemplo, sustituciones de regiones enteras que tienen características de hidrofobicidad similares, son bien conocidos. Los polipéptidos que comprenden sustituciones conservadoras de aminoácidos se pueden analizar en cualquiera de los ensayos descritos en el presente documento para confirmar que se retiene la actividad apoptótica deseada de un polipéptido nativo o de referencia. Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Dichas variantes modificadas conservadoramente son adicionales, y no excluyen, las variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos consistentes con la divulgación. Las sustituciones normalmente conservadoras entre sí incluyen: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins* (1984)).
- Cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo también puede sustituirse, en general con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar el reticulado aberrante. A la inversa, los enlaces de cisteína se pueden añadir al polipéptido para mejorar su estabilidad o facilitar la oligomerización.
- En algunas realizaciones, el polipéptido GDF11 administrado a un sujeto puede comprender una o más sustituciones o modificaciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, las sustituciones y/o modificaciones pueden prevenir o reducir la degradación proteolítica y/o prolongar la semivida del polipéptido en el sujeto. En algunas realizaciones, un polipéptido GDF11 puede modificarse conjugándolo o fusionándolo con otros polipéptidos o dominios de polipéptidos tales como, a modo de ejemplo no limitante, transferrina (documento WO06096515A2), albúmina (Yeh et al., 1992), hormona del crecimiento (documento US2003104578AA); celulosa (Levy y Shoseyov, 2002); y/o fragmentos de Fc (Ashkenazi y Chamow, 1997).
- En algunas realizaciones, un polipéptido GDF11 como se describe en el presente documento puede comprender al menos un reemplazo de enlace peptídico. Un enlace peptídico simple o enlaces peptídicos múltiples, por ejemplo, 2 enlaces, 3 enlaces, 4 enlaces, 5 enlaces, o 6 o más enlaces, o todos los enlaces peptídicos pueden reemplazarse. Un péptido aislado como se describe en el presente documento puede comprender un tipo de reemplazo de enlace peptídico o múltiples tipos de reemplazos de enlace peptídico, por ejemplo, 2 tipos, 3 tipos, 4 tipos, 5 tipos, o más tipos de reemplazos de enlaces peptídicos. Los ejemplos no limitantes de reemplazos de enlaces peptídicos incluyen urea, tiourea, carbamato, sulfonilureas, trifluoroetilamina, ácido orto-(aminoalquil)-fenilacético, ácido para-(aminoalquil)-fenilacético, ácido meta-(aminoalquil)-fenilacético, tioamida, tetrazol, éster borónico, grupo olefínico y derivados de los mismos.
- En algunas realizaciones, un polipéptido GDF11 como se describe en el presente documento puede comprender aminoácidos naturales que se encuentran comúnmente en polipéptidos y/o proteínas producidas por organismos vivos, por ejemplo, Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M), Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q), Asp (D), Glu (E), Lys (K), Arg (R) e His (H). En algunas realizaciones, un polipéptido GDF11 como se describe en el presente documento puede comprender aminoácidos alternativos. Los ejemplos no limitantes de aminoácidos alternativos incluyen, D-aminoácidos; beta-aminoácidos; homocisteína, fosfoserina, fosfotreonina, fosfotirosina, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato; ácido hipúrico, ácido octahidroindol-2-carboxílico, estatinas, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico, penicilamina (3-mercapto-D-valina), ornitina, citrulina, alfa-metil-alanina, para-benzoilfenilalanina, para-aminofenilalanina, p-fluorofenilalanina, fenilglicina, propargilglicina, sarcosina y terc-butilglicina), ácido diaminobutírico, ácido 7-hidroxi-tetrahidroisoquinolina carboxílico, naftilalanina, bifenilalanina, ciclohexilalanina, ácido amino-isobutírico, norvalina, norleucina, *terc*-leucina, ácido tetrahidroisoquinolina carboxílico, ácido pipercolico, fenilglicina, homofenilalanina, ciclohexilglicina, deshidroleucina, 2,2-dietilglicina, ácido 1-amino-1-ciclopentanocarboxílico, ácido 1-amino-1-ciclohexanocarboxílico, ácido aminobenzoico, ácido amino-naftoico, ácido gamma-aminobutírico, difluorofenilalanina, ácido nipecótico, ácido alfa-amino butírico, tienil-alanina, t-butilglicina, trifluorovalina; hexafluoroleucina; análogos fluorados; aminoácidos modificados con azida; aminoácidos modificados con alquino; aminoácidos modificados con ciano; derivados de los mismos.
- En algunas realizaciones, se puede modificar un polipéptido GDF11, por ejemplo, mediante la adición de un resto a uno o más de los aminoácidos que comprenden el péptido. En algunas realizaciones, un polipéptido GDF11 como se describe en el presente documento puede comprender una o más moléculas de resto, por ejemplo, 1 o más moléculas del resto por péptido, 2 o más moléculas del resto por péptido, 5 o más moléculas del resto por péptido, 10 o más moléculas del resto por péptido o más moléculas del resto por péptido. En algunas realizaciones, un polipéptido GDF11 como se describe en el presente documento puede comprender uno más tipos de modificaciones y/o restos, por ejemplo, 1 tipo de modificación, 2 tipos de modificaciones, 3 tipos de modificaciones o más tipos de modificaciones. Los ejemplos no limitantes de modificaciones y/o restos incluyen PEGilación; glucosilación; HESilación; ELPilación; lipidación; acetilación; amidación; modificaciones de protección en el extremo; grupos ciano; fosforilación; albúmina y ciclación. En algunas realizaciones, una modificación de protección en el extremo puede comprender acetilación en el extremo N, acilación N-terminal y formilación N-terminal. En algunas realizaciones, una

modificación de protección en el extremo puede comprender una amidación en el extremo C, introducción de alcohol C-terminal, aldehído, éster y restos tioéster. La semivida de un polipéptido GDF11 puede aumentarse mediante la adición de restos, por ejemplo, PEG o albúmina.

5 En algunas realizaciones, el polipéptido GDF11 administrado al sujeto puede ser un fragmento funcional de una de las secuencias de aminoácidos de GDF11 descritas en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, un "fragmento funcional" es un fragmento o segmento de un péptido que puede ralentizar o revertir la hipertrofia cardíaca en un sujeto de acuerdo con los ensayos descritos a continuación en el presente documento. Un
10 fragmento funcional puede comprender sustituciones conservadoras de las secuencias descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, un fragmento funcional puede comprender el C terminal de 12,5 kDa de GDF11. En algunas realizaciones, el C terminal de 12,5 kDa de GDF11 puede funcionar como un monómero. En algunas realizaciones, el C terminal de 12,5 kDa de GDF11 puede funcionar como un homodímero. En algunas realizaciones, el C terminal de 12,5 kDa de GDF11 puede funcionar como un heterodímero con el pro-péptido GDF11.

15 Las alteraciones de la secuencia de aminoácidos original se pueden lograr mediante cualquiera de una serie de técnicas conocidas por un experto en la materia. Se pueden introducir mutaciones, por ejemplo, en loci particulares sintetizando oligonucleótidos que contienen una secuencia mutante, flanqueada por sitios de restricción que permiten la ligadura a fragmentos de la secuencia nativa. Después de la ligadura, la secuencia reconstruida
20 resultante codifica un análogo que tiene la inserción, sustitución o eliminación de aminoácidos deseada. Como alternativa, pueden emplearse procedimientos de mutagénesis específicos de sitio dirigidos a oligonucleótidos para proporcionar una secuencia de nucleótidos alterada que tiene codones particulares alterados de acuerdo con la sustitución, delección o inserción requerida. Las técnicas para realizar tales alteraciones incluyen las descritas por Walder et al. (Gene 42: 133, 1986); Bauer et al. (Gene 37:73, 1985); Craik (BioTechniques, January 1985, 12-19);
25 Smith et al. (Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981); y las patentes de Estados Unidos números 4.518.584 y 4,737,462. En algunas realizaciones, un polipéptido GDF11 como se describe en el presente documento puede sintetizarse químicamente y pueden incorporarse mutaciones como parte del proceso de síntesis química.

30 En algunas realizaciones, un polipéptido GDF11 como se describe en el presente documento puede formularse como un profármaco farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, un "profármaco" se refiere a compuestos que pueden convertirse mediante algún proceso químico o fisiológico (por ejemplo, procesos enzimáticos e hidrólisis metabólica) en un agente terapéutico. Por tanto, el término "profármaco" también se refiere a un precursor de un compuesto biológicamente activo que es farmacéuticamente aceptable. Un profármaco puede
35 estar inactivo cuando se administra a un sujeto, es decir, un éster, pero se convierte *in vivo* a un compuesto activo, por ejemplo, por hidrólisis al ácido carboxílico libre o hidroxilo libre. El compuesto de profármaco, frecuentemente, ofrece ventajas de solubilidad, compatibilidad tisular o liberación retardada en un organismo. El término "profármaco" también pretende incluir cualquier vehículo unido covalentemente, que libere el compuesto activo *in vivo* cuando se administra dicho profármaco a un sujeto. Pueden prepararse profármacos de un compuesto activo documento,
40 modificando grupos funcionales presentes en el compuesto activo de tal forma que las modificaciones se escinden, tanto por manipulación rutinaria o *in vivo*, para dar el compuesto activo precursor. Los profármacos incluyen compuestos de la invención en los que un grupo hidroxilo, amino o mercapto se une a cualquier grupo que, cuando el profármaco del compuesto activo se administra a un sujeto, se escinde para formar un grupo hidroxilo libre, amino libre o mercapto libre, respectivamente. Los ejemplos de profármacos incluyen, aunque sin limitación, acetato, derivados
45 de formiatos y benzoatos de un alcohol o derivados de acetamida, formamida y benzamida de un grupo funcional amina en el compuesto activo y similares. Véase Harper, "Drug Latentiation" en Jucker, ed. Progress in Drug Research 4:221-294 (1962); Morozowich et al, "Application of Physical Organic Principles to Prodrug Design" en E. B. Roche ed. Design of Biopharmaceutical Properties through Prodrugs and Analogs, APHA Acad. Pharm. Sci. 40 (1977); Bioreversible Carriers in Drug in Drug Design, Theory and Application, E. B. Roche, ed., APHA Acad. Pharm.
50 Sci. (1987); Design of Prodrugs, H. Bundgaard, Elsevier (1985); Wang et al. "Prodrug approaches to the improved delivery of peptide drug" en Curr. Pharm. Design. 5(4):265-287 (1999); Pauletti et al. (1997) Improvement in peptide bioavailability: Peptidomimetics and Prodrug Strategies, Adv. Drug. Delivery Rev. 27:235-256; Mizen et al. (1998) "The Use of Esters as Prodrugs for Oral Delivery of (3-Lactam antibiotics" Pharm. Biotech. 11,: 345 -365; Gagnault et al. (1996) "Designing Prodrugs and Bioprecursors I. Carrier Prodrugs," Pract. Med. Chem. 671-696; Asgharnejad,
55 "Improving Oral Drug Transport", enTransport Processes in Pharmaceutical Systems, G. L. Amidon, P. I. Lee y E. M. Topp, Eds., Marcell Dekker, p. 185-218 (2000); Balant et al., "Prodrugs for the improvement of drug absorption via different routes of administration", Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., 15(2): 143-53 (1990); Balimane y Sinko, "Involvement of multiple transporters in the oral absorption of nucleoside analogues", Adv. Drug Delivery Rev., 39(1-3): 183-209 (1999); Browne, "Fosphenytoin (Cerebyx)", Clin. Neuropharmacol. 20(1): 1-12 (1997); Bundgaard,
60 "Bioreversible derivatization of drugs-principle and applicability to improve the therapeutic effects of drugs", Arch. Pharm. Chemi 86(1): 1-39 (1979); Bundgaard H. "Improved drug delivery by the prodrug approach", Controlled Drug Delivery 17: 179-96 (1987); Bundgaard H. "Prodrugs as a means to improve the delivery of peptide drugs", Arfv. Drug Delivery Rev. 8(1): 1-38 (1992); Fleisher et al. "Improved oral drug delivery: solubility limitations overcome by the use of prodrugs", Arfv. Drug Delivery Rev. 19(2): 115-130 (1996); Fleisher et al. "Design of prodrugs for improved
65 gastrointestinal absorption by intestinal enzyme targeting", Methods Enzymol. 112 (Drug Enzyme Targeting, Pt. A): 360-81, (1985); Farquhar D, et al., "Biologically Reversible Phosphate-Protective Groups", Pharm. Sci., 72(3): 324-

325 (1983); Freeman S, et al., "Bioreversible Protection for the Phospho Group: Chemical Stability and Bioactivation of Di(4-acetoxy-benzyl) Methylphosphonate with Carboxyesterase," *Chem. Soc., Chem. Commun.*, 875-877 (1991); Friis y Bundgaard, "Prodrugs of phosphates and phosphonates: Novel lipophilic alphaacyloxyalkyl ester derivatives of phosphate- or phosphonate containing drugs masking the negative charges of these groups", *Eur. J. Pharm. Sci.* 4: 49-59 (1996); Gangwar et al., "Pro-drug, molecular structure and percutaneous delivery", *Des. Biopharm. Prop. Prodrugs Analogs*, [Symp.] Meeting Date 1976, 409-21. (1977); Nathwani y Wood, "Penicillins: a current review of their clinical pharmacology and therapeutic use", *Drugs* 45(6): 866-94 (1993); Sinhababu y Thakker, "Prodrugs of anticancer agents", *Adv. Drug Delivery Rev.* 19(2): 241-273 (1996); Stella et al., "Prodrugs. Do they have advantages in clinical practice?", *Drugs* 29(5): 455-73 (1985); Tan et al. "Development and optimization of anti-HIV nucleoside analogs and prodrugs: A review of their cellular pharmacology, structure-activity relationships and pharmacokinetics", *Adv. Drug Delivery Rev.* 39(1-3): 117-151 (1999); Taylor, "Improved passive oral drug delivery via prodrugs", *Adv. Drug Delivery Rev.*, 19(2): 131-148 (1996); Valentino y Borchardt, "Prodrug strategies to enhance the intestinal absorption of peptides", *Drug Discovery Today* 2(4): 148-155 (1997); Wiebe y Knaus, "Concepts for the design of anti-HIV nucleoside prodrugs for treating cephalic HIV infection", *Adv. Drug Delivery Rev.*: 39(1-3):63-80 (1999); Waller et al., "Prodrugs", *Br. J. Clin. Pharmacol.* 28: 497-507 (1989).

En algunas realizaciones, un polipéptido GDF11 como se describe en el presente documento puede ser un solvato farmacéuticamente aceptable. El término "solvato" se refiere a un péptido como se describe en el presente documento en estado sólido, en el que las moléculas de un disolvente adecuado se incorporan a la red cristalina. Un disolvente adecuado para la administración terapéutica es fisiológicamente tolerable a la dosis administrada. Los ejemplos de disolventes adecuados para administración terapéutica son etanol y agua. Cuando el agua es el disolvente, el solvato se denomina hidrato. En general, los solvatos se forman disolviendo el compuesto en el disolvente apropiado y aislando el disolvente mediante enfriamiento o usando un antidisolvente. El solvato normalmente se seca o se forma un azeótropo en condiciones ambiente.

Los péptidos de la presente invención pueden sintetizarse usando métodos bien conocidos que incluyen métodos recombinantes y síntesis química. Los métodos recombinantes para producir un péptido mediante la introducción de un vector que incluye ácido nucleico que codifica el péptido en una célula huésped adecuada es bien conocido en la técnica, tal como se describe en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Volúmenes 1 a 8, Cold Spring Harbor, NY (1989); M.W. Pennington y B.M. Dunn, *Methods in Molecular Biology: Peptide Synthesis Protocols*, Vol 35, Humana Press, Totowa, NJ (1994). Los péptidos también pueden sintetizarse químicamente usando métodos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Merrifield et al., *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149 (1964); Bodanszky, M., *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Nueva York, NY (1984); Kimmerlin, T. y Seebach, D. *J. Pept. Res.* 65:229-260 (2005); Nilsson et al., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* (2005) 34:91-118; W.C. Chan y P.D. White (Eds.) *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, Oxford University Press, Cary, NC (2000); N.L. Benoiton, *Chemistry of Peptide Synthesis*, CRC Press, Boca Ratón, FL (2005); J. Jones, *Amino Acid and Peptide Synthesis*, 2ª Ed., Oxford University Press, Cary, NC (2002); y P. Lloyd-Williams, F. Albericio y E. Giralt, *Chemical Approaches to the synthesis of peptides and proteins*, CRC Press, Boca Ratón, FL (1997). Los derivados de péptidos también se pueden preparar como se describe en las patentes de Estados Unidos n.º 4,612,302; 4,853,371; y 4,684,620, y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2009/0263843.

En algunas realizaciones, la tecnología descrita en el presente documento se refiere a un ácido nucleico que codifica un polipéptido GDF11 como se describe en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" se refiere a cualquier molécula, preferentemente una molécula polimérica, incorporando unidades de ácido ribonucleico, ácido desoxirribonucleico o un análogo del mismo. El ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario. Un ácido nucleico de cadena sencilla puede ser un ácido nucleico monocatenario de un ADN bicatenario desnaturalizado. Como alternativa, puede ser un ácido nucleico monocatenario no derivado de ningún ADN bicatenario. En un aspecto, el ácido nucleico molde es ADN. En otro aspecto, el molde es ARN. Las moléculas de ácido nucleico adecuadas son ADN, incluyendo ADN genómico o ADNc. Otras moléculas de ácido nucleico adecuadas son ARN, incluyendo ARNm. La molécula de ácido nucleico puede ser natural, como en el ADN genómico, o puede ser sintético, es decir, preparado basado en la acción humana, o puede ser una combinación de los dos. La molécula de ácido nucleico también puede tener ciertas modificaciones, como 2'-desoxi, 2'-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropilo (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetilo (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropilo (2'-O-DMAP), 2'-O-dimetilaminoetiloxietilo (2'-O-DMAEOE), o 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA), adición de colesterol y esqueleto de fosforotioato como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos 20070213292; y ciertos ribonucleósidos que están unidos entre los átomos de 2'-oxígeno y 4'-carbono con una unidad de metileno como se describe en la Patente de los Estados Unidos n.º 6.268.490.

En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido GDF11 puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:3.

En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido GDF11 como se describe en el presente documento está compuesto por un vector. En algunos de los aspectos descritos en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido GDF11 como se describe en el presente documento o cualquier módulo del mismo, está operativamente unido a un vector. El término "vector", tal como se usan en el

presente documento, se refiere a una construcción de ácido nucleico diseñada para el suministro a una célula huésped o para la transferencia entre diferentes células huésped. Tal como se usa en el presente documento, un vector puede ser viral o no viral. El término "vector" abarca cualquier elemento genético que sea capaz de replicarse cuando se asocie con los elementos de control adecuados y que pueda transferir secuencias de genes a las células.

5 Un vector puede incluir, aunque sin limitaciones, un vector de clonación, un vector de expresión, un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, virus, virión, etc.

Tal como se usa en el presente documento, La expresión "vector de expresión" se refiere a un vector que dirige la expresión de un ARN o polipéptido a partir de secuencias unidas a secuencias reguladoras de la transcripción en el vector. Las secuencias expresadas, a menudo, pero no necesariamente, serán heterólogas para la célula. Un vector de expresión puede comprender elementos adicionales, por ejemplo, el vector de expresión puede tener dos sistemas de replicación, permitiendo así que se mantenga en dos organismos, por ejemplo, en células humanas para expresión y en un huésped procariota para clonación y amplificación. El término "expresión" se refiere a los procesos celulares implicados en la producción de ARN y proteínas y, según corresponda, secreción de proteínas, incluyendo, cuando sea aplicable, aunque sin limitaciones, por ejemplo, transcripción, procesamiento de transcritos, traducción y plegamiento de proteínas, modificación y procesamiento. Los "productos de expresión" incluyen ARN transcrito a partir de un gen, y polipéptidos obtenidos por traducción de ARNm transcrito a partir de un gen. El término "gen" significa la secuencia de ácido nucleico que se transcribe (ADN) a ARN *in vitro* o *in vivo* cuando está operativamente unida a secuencias reguladoras apropiadas. El gen puede o no incluir regiones que preceden y siguen a la región de codificación, por ejemplo, secuencias 5' no traducidas (5'UTR) o "líder" y secuencias 3' UTR o "de cola", así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos de codificación individuales (exones).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "vector viral" se refiere a una construcción de vector de ácido nucleico que incluye al menos un elemento de origen viral y tiene la capacidad de empaquetarse en una partícula de vector viral. El vector viral puede contener el ácido nucleico que codifica un polipéptido GDF11 como se describe en el presente documento en lugar de genes virales no esenciales. El vector y/o partícula pueden utilizarse con el fin de transferir cualquier ácido nucleico a las células *in vitro* o *in vivo*. Se conocen numerosas formas de vectores virales en la técnica.

Por "vector recombinante" se entiende un vector que incluye una secuencia de ácido nucleico heterólogo, o "transgén" que es capaz de expresarse *in vivo*. Debe entenderse que los vectores descritos en el presente documento pueden, en algunas realizaciones, combinarse con otras composiciones y terapias adecuadas. En algunas realizaciones, el vector es episomal. El uso de un vector episomal adecuado proporciona un medio para mantener el nucleótido de interés en el sujeto en un ADN cromosómico extra de alto número de copias, eliminando así los posibles efectos de la integración cromosómica.

En algunas realizaciones, el nivel de GDF11 en el sujeto aumenta al menos un 20 % sobre el nivel de GDF11 en el sujeto antes del tratamiento, por ejemplo, un 20 % o más, un 30 % o más, un 40 % o más, un 50 % o más, un 100 % o más, un 150 % o más, un 200 % o más, un 250 % o más, un 300 % o más o un 350 % o más. En algunas realizaciones, el nivel de GDF11 en el sujeto aumenta al menos un 100 % sobre el nivel de GDF11 en el sujeto antes del tratamiento. En algunas realizaciones, el nivel de GDF11 en el sujeto aumenta al menos un 200 % sobre el nivel de GDF11 en el sujeto antes del tratamiento. En algunas realizaciones, el nivel de GDF11 en el sujeto aumenta aproximadamente un 250 % sobre el nivel de GDF11 en el sujeto antes del tratamiento. En algunas realizaciones, el nivel de GDF11 en el sujeto aumenta al menos al 50 % de un nivel de referencia saludable, por ejemplo, un 50 % o más, un 60 % o más, un 70 % o más, un 80 % o más, un 90 % o más o un 100 % o más de un nivel de referencia saludable. En algunas realizaciones, el nivel de GDF11 en el sujeto aumenta al menos al 60 % de un nivel de referencia saludable. En algunas realizaciones, el nivel de GDF11 en el sujeto aumenta al menos al 75 % de un nivel de referencia saludable. En algunas realizaciones, el nivel de GDF11 en el sujeto aumenta al menos al 90 % de un nivel de referencia saludable. Un nivel de referencia saludable puede ser el nivel promedio de GDF11 en una población de sujetos humanos que no muestran ningún signo o síntoma de hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca diastólica o afecciones relacionadas.

En algunas realizaciones, un nivel de referencia saludable puede ser el nivel promedio de GDF11 en una población de sujetos humanos que no muestran ningún signo o síntoma de hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca diastólica o afecciones relacionadas y menores de 70 años. En algunas realizaciones, un nivel de referencia saludable puede ser el nivel promedio de GDF11 en una población de sujetos humanos que no muestran ningún signo o síntoma de hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca diastólica o afecciones relacionadas y menores de 65 años. En algunas realizaciones, un nivel de referencia saludable puede ser un nivel equivalente a al menos 8.500 unidades según lo medido por la tecnología de aptámero descrita en los Ejemplos en el presente documento, por ejemplo, 8.500 o más, 9.000 o más o 10.000 o más.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento pueden comprender seleccionar un sujeto con un nivel de GDF 11 que sea inferior a un nivel de referencia saludable y administrar un tratamiento como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, el nivel de GDF11 en un sujeto aumenta para tratar una afección cardíaca, por ejemplo,

hipertrofia cardíaca o rigidez cardíaca como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el nivel de GDF11 en un sujeto aumenta para prevenir una afección cardíaca, por ejemplo, hipertrofia cardíaca o rigidez cardíaca como se describe en el presente documento. Las afecciones cardíacas relacionadas con el polipéptido GDF11 bajo o disminuido tienden a desarrollarse con la disminución en los niveles de GDF11 que ocurren con el aumento de la edad. Por tanto, se espera que tales afecciones puedan prevenirse o, como mínimo, retrasarse, manteniendo los niveles de polipéptido GDF11 en o cerca del nivel encontrado en adultos jóvenes normales sanos, por ejemplo, administrando un polipéptido GDF11 o un ácido nucleico que codifica un polipéptido GDF 11 con la edad avanzada, pero antes del inicio de un trastorno cardíaco.

Los aspectos de la tecnología descrita en el presente documento se refieren a composiciones que comprenden un polipéptido GDF11 como se describe en el presente documento o un ácido nucleico que codifica un polipéptido GDF11 como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "composición farmacéutica" se refiere al agente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable de uso habitual en la industria farmacéutica. La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acordes con una relación beneficio/riesgo razonable.

La preparación de una composición farmacológica que contiene ingredientes activos disueltos o dispersados en la misma se entiende bien en la técnica y generalmente no necesita limitarse basándose en la formulación. Normalmente, dichas composiciones se preparan como inyectables en forma de soluciones o suspensiones líquidas, sin embargo, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión, en líquido antes de su uso. La preparación también se puede emulsionar o presentar como una composición de liposomas. El principio activo puede mezclarse con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo y en cantidades adecuadas para su uso en los métodos terapéuticos descritos en el presente documento. Son excipientes adecuados, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades mínimas de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH y similares, que potencian la eficacia del principio activo. La composición terapéutica de la presente invención puede incluir sales farmacéuticamente aceptables de los componentes en la misma. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del polipéptido) que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico o ácidos orgánicos tales como acético, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden obtenerse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, y similares. Los vehículos fisiológicamente tolerables son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de vehículos líquidos son soluciones acuosas estériles que no contienen materiales además de los ingredientes activos y agua, o contienen un tampón tal como fosfato de sodio a un valor de pH fisiológico, como solución salina fisiológica o ambos, tal como solución salina tamponada con fosfato. Aún adicionalmente, los vehículos acuosos pueden contener más de una sal tamponante, así como sales tales como cloruro de sodio y de potasio, dextrosa, polietilenglicol y otros solutos. Las composiciones líquidas también pueden contener fases líquidas además de y excluyendo el agua. Ejemplos de dichas fases líquidas adicionales son glicerina, aceites vegetales, tales como aceite de semilla de algodón y emulsiones de agua y aceite. La cantidad de un agente activo usado en la invención que será eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar.

En algunas realizaciones, un polipéptido GDF11 o ácido nucleico que codifica un polipéptido GDF11 como se describe en el presente documento puede administrarse por medios de liberación controlada o retardada. Los productos farmacéuticos de liberación controlada tienen el objetivo común de mejorar la terapia farmacológica por encima de lo logrado por sus homólogos de liberación no controlada. En el mejor de los casos, el uso de una preparación de liberación controlada de diseño óptimo en el tratamiento médico se caracteriza por un mínimo de sustancia farmacológica que se emplea para curar o controlar la afección en un tiempo mínimo. Las ventajas de las formulaciones de liberación controlada incluyen: 1) actividad extendida del fármaco; 2) frecuencia de dosificación reducida; 3) mayor cumplimiento del paciente; 4) uso de menos fármaco total; 5) reducción de los efectos secundarios locales o sistémicos; 6) minimización de la acumulación de fármaco; 7) reducción en las fluctuaciones del nivel sanguíneo; 8) mejora en la eficacia del tratamiento; 9) reducción de potenciación o pérdida de actividad del fármaco; y 10) mejora de la velocidad de control de enfermedades o afecciones. Kim, Cherng-ju, Controlled-release Dosage Form Design, 2 (Technomic Publishing, Lancaster, Pa.: 2000).

Las formas de dosificación convencionales generalmente proporcionan una liberación rápida o inmediata del fármaco desde la formulación. Dependiendo de la farmacología y farmacocinética del medicamento, el uso de formas de dosificación convencionales puede conducir a grandes fluctuaciones en las concentraciones del fármaco en la sangre y otros tejidos de un paciente. Estas fluctuaciones pueden afectar a una serie de parámetros, tal como la frecuencia de dosis, el inicio de acción, la duración de la eficacia, el mantenimiento de los niveles terapéuticos en sangre, la toxicidad, los efectos secundarios y similares. Provechosamente, las formulaciones de liberación controlada pueden usarse para controlar el inicio de acción de un medicamento, la duración de la acción, los niveles

plasmáticos dentro de la ventana terapéutica y los niveles sanguíneos máximos. En particular, las formas o formulaciones de dosificación de liberación controlada o prolongada se pueden usar para asegurar que se logre la máxima efectividad de un medicamento y, al mismo tiempo, se minimizan los posibles efectos adversos y los problemas de seguridad, lo que puede ocurrir tanto por la dosificación insuficiente de un medicamento (es decir, por debajo de los niveles terapéuticos mínimos) como por exceder el nivel de toxicidad del medicamento.

La mayoría de las formulaciones de liberación controlada están diseñadas para liberar inicialmente una cantidad de medicamento (principio activo) que produce rápidamente el efecto terapéutico deseado, y gradualmente y continuamente liberan otras cantidades de medicamento para mantener este nivel de efecto terapéutico o profiláctico durante un período prolongado de tiempo. Para mantener este nivel constante de fármaco en el cuerpo, el fármaco debe liberarse de la forma de dosificación a una velocidad que reemplace la cantidad de medicamento que se metaboliza y se excreta del cuerpo. La liberación controlada de un principio activo puede ser estimulada por varias condiciones, que incluyen, aunque sin limitaciones, pH, fuerza iónica, presión osmótica, temperatura, enzimas, agua y otras condiciones fisiológicas o compuestos.

Diversas formas de dosificación de liberación controlada o prolongada conocidas, formulaciones y dispositivos pueden adaptarse para su uso con las sales y composiciones de la divulgación. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitación, los descritos en las patentes de Estados Unidos N.º: 3,845,770; 3,916,899; 3,536,809; 3,598,123; 4,008,719; 5,674,533; 5,059,595; 5,591,767; 5,120,548; 5,073,543; 5,639,476; 5,354,556; 5,733,566; y 6.365.185 B1. Estas formas de dosificación se pueden usar para proporcionar una liberación lenta o controlada de uno o más principios activos usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa, otras matrices poliméricas, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos (tales como OROS® (Alza Corporation, Mountain View, Calif. USA)), o una combinación de los mismos para proporcionar el perfil de liberación deseado en proporciones variables.

En algunas realizaciones, la tecnología descrita en el presente documento se refiere a una jeringa que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición, p. una preparación farmacéutica que comprende un polipéptido GDF11 como se describe en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, la frase "cantidad terapéuticamente efectiva", "cantidad efectiva" o "dosis efectiva" se refiere a una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico o estético en el tratamiento, prevención o tratamiento de, por ejemplo, la hipertrofia cardíaca, por ejemplo, una cantidad que proporciona una disminución estadísticamente significativa en al menos un síntoma, signo o marcador de hipertrofia cardíaca. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz entra bien en de la capacidad de los expertos en la técnica. En general, una cantidad terapéuticamente efectiva puede variar con el historial del sujeto, la edad, la afección, el sexo, así como la gravedad y el tipo de afección médica en el sujeto, y la administración de otros agentes farmacéuticamente activos.

En un aspecto, la tecnología descrita en el presente documento se refiere a un método que comprende administrar un polipéptido GDF11 o un ácido nucleico que codifica un polipéptido GDF11 a un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto necesita tratamiento para hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca diastólica o una afección relacionada como se ha descrito anteriormente en el presente documento. En algunas realizaciones, el método es un método de tratamiento de un sujeto. En algunas realizaciones, el método es un método para tratar la hipertrofia cardíaca y/o la insuficiencia cardíaca diastólica o una afección relacionada en un sujeto. Dichas afecciones, así como los métodos para diagnosticarlas se describen anteriormente en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento" "que trata" o "mejora" cuando se usa en referencia a una enfermedad, trastorno o afección médica, se refieren a tratamientos terapéuticos para una afección, en la que el objeto es revertir, aliviar, mejorar, inhibir, ralentizar o detener la progresión o la gravedad de un síntoma o afección. El término "tratar" incluye reducir o aliviar al menos un efecto adverso o síntoma de una afección. El tratamiento generalmente es "eficaz" si se reducen uno o más síntomas o marcadores clínicos. Como alternativa, el tratamiento es "eficaz" si la progresión de una afección se reduce o se detiene. Esto es, "tratamiento" incluye no solo la mejora de los síntomas o marcadores, sino también un cese o al menos la desaceleración del progreso o el empeoramiento de los síntomas que se esperarían en ausencia de tratamiento. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, aunque sin limitación, alivio de uno o más síntomas, disminución de la extensión del déficit, estado patológico estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de, por ejemplo, la hipertrofia cardíaca, retraso o ralentización de la hipertrofia cardíaca, y un aumento de la vida útil en comparación con lo esperado en ausencia de tratamiento. Tal como se usa en el presente documento, el término "administración", se refiere a la colocación de la composición que comprende un polipéptido GDF11 o un ácido nucleico que codifica un polipéptido GDF11 como se describe en el presente documento en un sujeto mediante un método o ruta que da como resultado la administración a un sitio de acción. La composición farmacéutica que comprende un polipéptido GDF11 o un ácido nucleico que codifica un polipéptido GDF11 puede administrarse por cualquier ruta apropiada que dé como resultado un tratamiento eficaz en el sujeto.

Los datos descritos en el presente documento descritos indican que la administración sistémica a través del sistema vascular puede ser efectiva. Por tanto, la administración por vía intravenosa se contempla específicamente. Sin embargo, con formulación apropiada, se contemplan otras vías, incluyendo, por ejemplo, intranasal, intraarterial;

intraarterial coronarias; por vía oral, por inhalación, por vía intraperitoneal, intramuscular, por vía subcutánea, intracavitaria, o por otros medios conocidos por los expertos en la materia. Las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad a administrar y el tiempo depende del sujeto a tratar, la capacidad del sistema del sujeto de utilizar el principio activo y el grado de efecto terapéutico deseado.

Las composiciones terapéuticas que contienen al menos un agente pueden administrarse convencionalmente en una dosis unitaria, por ejemplo. La expresión "dosis unitaria" cuando se usa en referencia a una composición terapéutica se refiere a unidades físicamente concretas adecuadas como dosificación unitaria para el sujeto, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente fisiológicamente aceptable, es decir, excipiente o vehículo.

Los intervalos de dosificación para el agente dependen de la potencia y son cantidades lo suficientemente grandes como para producir el efecto deseado, por ejemplo, una disminución de la tasa de hipertrofia cardíaca o una reversión de la hipertrofia cardíaca. La dosis no ha de ser lo suficientemente grande como para provocar efectos secundarios adversos. En general, la dosificación variará con la edad, la afección y el sexo del paciente, y puede determinarla un experto en la materia. La dosificación puede ajustarla el médico individual en caso de cualquier complicación. Por lo general, la dosis puede variar de 0,001 mg/kg de peso corporal a 0,5 mg/kg de peso corporal. En una realización, el intervalo de dosis es de 5 µg/kg de peso corporal a 30 µg/kg de peso corporal.

La administración de las dosis mencionadas anteriormente puede repetirse. En algunas realizaciones, las dosis se administran una vez al día o varias veces al día, por ejemplo, aunque sin limitaciones, tres veces al día. En algunas realizaciones, las dosis mencionadas anteriormente se administran diariamente durante semanas o meses. La duración del tratamiento depende del progreso clínico del sujeto y la capacidad de respuesta a la terapia. Cuando el polipéptido GDF11 aparentemente disminuye con la edad en los individuos afectados, se espera que se requiera una terapia a largo plazo para establecer y mantener el beneficio del tratamiento basado en GDF11, por ejemplo, para hipertrofia cardíaca.

Las cantidades precisas de principio activo que se necesitan administrar pueden depender del criterio del médico a cargo del tratamiento y son específicas para cada individuo. Sin embargo, los intervalos de dosificación adecuados para aplicación sistémica se divulgan en el presente documento y dependen de la vía de administración. Los regímenes adecuados para administración también son variables, pero se caracterizan por una administración inicial seguida de dosis repetidas en uno o más intervalos por una administración posterior. Como alternativa, se contempla la infusión intravenosa continua suficiente para mantener concentraciones en la sangre en los intervalos especificados para tratamientos *in vivo*. En algunas realizaciones, el intervalo de dosificación es suficiente para mantener las concentraciones en la sangre en el intervalo que se encuentra en la sangre de una población de sujetos humanos sanos normales (por ejemplo, aquellos sin signos, síntomas o fabricantes de hipertrofia cardíaca) menores de 50 años. En algunas realizaciones, el intervalo de dosificación es suficiente para mantener las concentraciones en la sangre en el intervalo que se encuentra en sujetos humanos sanos normales menores de 40 años. En algunas realizaciones, el intervalo de dosificación es suficiente para mantener las concentraciones en la sangre en el intervalo que se encuentra en condiciones normales, sujetos humanos sanos menores de 30 años.

Una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad de un agente que es suficiente para producir un cambio medible estadísticamente significativo en, por ejemplo, la hipertrofia cardíaca. Dichas cantidades efectivas pueden medirse en ensayos clínicos y en estudios en animales. La eficacia de un agente puede determinarse evaluando indicadores físicos de, por ejemplo, hipertrofia cardíaca como se describe anteriormente en el presente documento. En sistemas experimentales, los ensayos de eficacia incluyen la medición de la masa cardíaca, así como, determinación del tamaño de miocitos según lo determinado por microscopia histológica, y/o una reducción en la expresión de genes marcadores de miocardio envejecidos tales como ANP y BNP. Tales ensayos son bien conocidos en la técnica y se describen en detalle con los Ejemplos del presente documento. A continuación se describen métodos clínicamente aceptables para detectar o controlar la hipertrofia cardíaca. Además, la eficacia de un agente puede medirse mediante un aumento en los polipéptidos GDF11 o fragmentos de los mismos en un sujeto que está siendo tratado con un agente que comprende un polipéptido GDF11 o un polipéptido GDF11 que codifica un ácido nucleico.

La eficacia de un tratamiento dado para la hipertrofia cardíaca puede ser determinada por un médico experto. Sin embargo, un tratamiento se considera "tratamiento efectivo" como se usa el término en el presente documento, si alguno o todos los signos o síntomas de, por ejemplo, la hipertrofia cardíaca, se alteran de manera beneficiosa, otros síntomas clínicamente aceptados mejoran o mejoran, por ejemplo, en al menos un 10 % después del tratamiento con un agente como se describe en el presente documento. La eficacia también se puede medir por la incapacidad de un individuo de empeorar según lo evaluado por la hospitalización o la necesidad de intervenciones médicas (es decir, se detiene la progresión de la enfermedad). Los expertos en la técnica conocen y/o describen en el presente documento métodos para medir estos indicadores. El alcance y la gravedad de la hipertrofia cardíaca y/o la eficacia de un tratamiento para la hipertrofia cardíaca se pueden determinar mediante imágenes del corazón para medir la hipertrofia, por ejemplo, utilizando resonancia magnética o ecocardiografía bidimensional. La imagenología de la hipertrofia cardíaca se describe con más detalle en la referencia de Medscape de Agarwal y Hartnell "maging in

Hypertrophic Cardiomyopathy", May 27, 2011 (disponible online en <http://emedicine.medscape.com/article/348503-overview>).

En algunas realizaciones, los métodos comprenden además administrar la composición farmacéutica descrita en el presente documento junto con uno o más agentes adicionales, agentes biológicos, medicamentos o tratamientos beneficiosos para un sujeto que padece hipertrofia cardíaca o insuficiencia cardíaca diastólica como parte de una terapia combinatoria. En algunas de dichas realizaciones, el agente, los agentes biológicos, el fármaco o el tratamiento se pueden seleccionar del grupo que consiste en: tratamientos para la presión arterial alta (por ejemplo, diuréticos tiazídicos; inhibidores de la ECA, tal como enalapril, lisinopril y captopril; ARB, tales como losartán o valsartán; betabloqueantes, tales como atenolol, carvedilol, metoprolol y bisoprolol; agentes bloqueantes de los canales de calcio, tales como amlodipina, diltiazem, nifedipina y verapamilo); reparación de la válvula aórtica; tratamientos para relajar el músculo o disminuir la tasa de contracción muscular (por ejemplo, bloqueadores beta, bloqueadores de los canales de calcio o tratamientos antiarrítmicos como la disopiramida o la amiodarona); miectomía septal; ablación septal; implantación de marcapasos; y/o implantación de desfibrilador cardioversor.

La descripción de las realizaciones de la divulgación no pretende ser exhaustiva o limitar la divulgación a la forma precisa desvelada. Mientras que realizaciones específicas de, y ejemplos para, la divulgación se describe en el presente documento con fines ilustrativos, son posibles varias modificaciones equivalentes dentro del alcance de la divulgación, como reconocerán los expertos en la materia relevante. Por ejemplo, mientras que las etapas o funciones del método se presentan en un orden dado, realizaciones alternativas pueden realizar funciones en un orden diferente, o las funciones pueden realizarse sustancialmente al mismo tiempo. Las enseñanzas de la divulgación proporcionadas en el presente documento pueden aplicarse a otros procedimientos o métodos según sea apropiado. Las diversas realizaciones descritas en el presente documento se pueden combinar para proporcionar realizaciones adicionales. Los aspectos de la divulgación pueden modificarse, si es necesario, para emplear las composiciones, funciones y conceptos de las referencias y aplicaciones anteriores para proporcionar realizaciones aún más de la divulgación. Estos y otros cambios pueden hacerse a la divulgación a la luz de la descripción detallada. Sin embargo, el alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Los elementos específicos de cualquiera de las realizaciones anteriores se pueden combinar o sustituir por elementos en otras realizaciones. Adicionalmente, mientras que las ventajas asociadas con ciertas realizaciones de la divulgación se han descrito en el contexto de estas realizaciones, otras realizaciones también pueden exhibir tales ventajas, y no todas las realizaciones necesariamente necesitan exhibir tales ventajas para caer dentro del alcance de la divulgación.

Todas las patentes y otras publicaciones se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada a este respecto debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a anteceder dicha divulgación en virtud de una invención previa o por cualquier otro motivo. Todas las declaraciones sobre la fecha o la representación del contenido de estos documentos se basan en la información disponible para los solicitantes y no constituyen ninguna admisión en cuanto a la exactitud de las fechas o el contenido de estos documentos.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes.

Algunas realizaciones de la tecnología descrita en el presente documento pueden definirse de acuerdo con cualquiera de los siguientes párrafos numerados:

1. Un método para tratar una afección relacionada con la edad, comprendiendo el método administrar a un sujeto una composición que aumenta el nivel de polipéptido GDF11 en el sujeto.

2. El método del párrafo 1, en el que la afección relacionada con la edad se selecciona del grupo que consiste en: una afección cardiovascular; envejecimiento del corazón; envejecimiento del músculo esquelético; y envejecimiento del cerebro.

3. El método de cualquiera de los párrafos 1-2, en el que el sujeto tiene o ha sido diagnosticado con una afección seleccionada del grupo que consiste en:

insuficiencia cardíaca diastólica; hipertrofia cardíaca; hipertrofia cardíaca relacionada con la edad; la hipertensión; enfermedad valvular; estenosis aórtica; miocardiopatía hipertrófica genética; o rigidez del corazón debido al envejecimiento.

4. El método de cualquiera de los párrafos 1-3, en el que el nivel de polipéptido GDF11 es el nivel de GDF11 en la circulación del sujeto.

5. El método de cualquiera de los párrafos 1-3, en el que el nivel de polipéptido GDF11 es el nivel de GDF11 en el tejido cardíaco del sujeto.

6. El método de cualquiera de los párrafos 1-5, en el que la composición comprende un polipéptido GDF11.

7. El método de cualquiera de los párrafos 1-6, en el que la composición comprende un polipéptido GDF11 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 14.

8. El método de cualquiera de los párrafos 1-6, en el que la composición comprende un polipéptido GDF11 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 2.

9. El método de cualquiera de los párrafos 1-6, en el que la composición comprende un polipéptido GDF11 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

10. El método de cualquiera de los párrafos 1-6, en el que la composición comprende un polipéptido GDF11 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

11. El método de cualquiera de los párrafos 1-10, en el que la composición comprende homodímeros de polipéptidos GDF11 que comprenden la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID NO: 1, 2, 14 o 15.

12. El método de cualquiera de los párrafos 1-11, en el que la composición comprende complejos de polipéptidos GDF11 que comprenden la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO 1, 2, 14 o 15.

13. El método de cualquiera de los párrafos 1-12, en el que la composición comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido GDF11.

14. El método de cualquiera de los párrafos 1-13, en el que la composición se administra a través de una vía seleccionada del grupo que consiste en:

por vía intravenosa; por vía subcutánea; intraarterial; y arteria intracoronaria.

15. El método de cualquiera de los párrafos 1-14, en el que el nivel de GDF11 se incrementa al menos en un 100 %.

16. El método de cualquiera de los párrafos 1-15, en el que el nivel de GDF11 se incrementa al menos al 75 % de un nivel de referencia saludable.

17. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido GDF11 aislado y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

18. El uso de un polipéptido GDF11 para el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en: una afección cardiovascular; envejecimiento del corazón; envejecimiento del músculo esquelético; envejecimiento del cerebro; insuficiencia cardíaca diastólica; hipertrofia cardíaca; hipertrofia cardíaca relacionada con la edad; la hipertensión; enfermedad valvular; estenosis aórtica; miocardiopatía hipertrófica genética; o rigidez del corazón debido al envejecimiento.

19. El método del párrafo 18, en el que el nivel de polipéptido GDF11 es el nivel de GDF11 en la circulación del sujeto.

20. El método de cualquiera de los párrafos 18-19, en el que el nivel de polipéptido GDF11 es el nivel de GDF11 en el tejido cardíaco del sujeto.

21. El método de cualquiera de los párrafos 18-20, en el que la composición comprende un polipéptido GDF11.

22. El método de cualquiera de los párrafos 18-21, en el que la composición comprende un polipéptido GDF11 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 14.

23. El método de cualquiera de los párrafos 18-22, en el que la composición comprende un polipéptido GDF11 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 2.

24. El método de cualquiera de los párrafos 18-22, en el que la composición comprende un polipéptido GDF11 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

25. El método de cualquiera de los párrafos 18-22, en el que la composición comprende un polipéptido GDF11 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

26. El método de cualquiera de los párrafos 18-25, en el que la composición comprende homodímeros de polipéptidos GDF11 que comprenden la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID NO: 1, 2, 14 o 15.

27. El método de cualquiera de los párrafos 18-26, en el que la composición comprende complejos de polipéptidos GDF11 que comprenden la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO 1, 2, 14 o 15.

28. El método de cualquiera de los párrafos 18-27, en el que la composición comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido GDF11.

29. El método de cualquiera de los párrafos 18-28, en el que la composición se administra a través de una vía seleccionada del grupo que consiste en:

por vía intravenosa; por vía subcutánea; intraarterial; y arteria intracoronaria.

30. El método de cualquiera de los párrafos 18-29, en el que el nivel de GDF11 se incrementa al menos en un 100 %.

31. El método de cualquiera de los párrafos 18-30, en el que el nivel de GDF11 se incrementa al menos al 75 % de un nivel de referencia saludable.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Identificación del factor 11 de diferenciación del crecimiento como factor circulante que revierte la hipertrofia cardíaca relacionada con la edad

La forma más común de insuficiencia cardíaca ocurre con la función sistólica normal, no tiene un tratamiento específico y con frecuencia involucra hipertrofia cardíaca en ancianos. Para aclarar los mecanismos biológicos que impulsan la hipertrofia cardíaca en el envejecimiento, la influencia de los factores circulantes se evaluó mediante parabiosis heterocrónica, una técnica quirúrgica en la que la unión de animales de diferentes edades conduce a una circulación compartida. Después de 4 semanas de exposición a la circulación de ratones jóvenes, la hipertrofia cardíaca en ratones viejos regresó dramáticamente, acompañada de un tamaño reducido de cardiomiocitos y remodelación molecular. La reversión de la hipertrofia relacionada con la edad no fue atribuible a los efectos hemodinámicos o conductuales de la parabiosis, lo que implica un factor transmitido por la sangre. Usando

proteómica modificada basada en aptámero, el miembro de la superfamilia de TGF β , GDF11, se identificó como un factor circulante en ratones jóvenes que disminuye con la edad. El tratamiento de ratones viejos para restaurar el GDF11 a niveles juveniles recapituló los efectos de la parabiosis y la hipertrofia inversa relacionada con la edad, proporcionando una nueva oportunidad terapéutica para el envejecimiento cardíaco.

Entre las enfermedades y trastornos asociados con la edad avanzada, uno de los más debilitantes es la pérdida de la función cardíaca normal que conduce a la insuficiencia cardíaca. La insuficiencia cardíaca afecta aproximadamente al 1 % de las personas mayores de 50 años y a más del 5 % de las personas mayores de 75 años. Con el continuo aumento en la proporción de personas mayores en nuestra población (Schocken et al., 2008), la insuficiencia cardíaca relacionada con la edad se está volviendo cada vez más frecuente.

La mayor parte de la insuficiencia cardíaca relacionada con la edad ocurre en el contexto de la función sistólica normal. Esta afección a menudo se asocia con hipertrofia cardíaca y se denomina "insuficiencia cardíaca diastólica", en contraste con la "insuficiencia cardíaca sistólica" (Aurigemma, 2006). Aunque se ha avanzado en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca sistólica, con mejoras sustanciales en el resultado en las últimas dos décadas, el progreso en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca diastólica ha sido mucho más difícil de alcanzar (Hunt et al., 2009). De hecho, se puede argumentar que no existen terapias específicas para pacientes que experimentan el "endurecimiento" ventricular asociado con la disfunción diastólica que acompaña al envejecimiento (Kitzman y Daniel, 2007).

La evidencia emergente indica que los factores sistémicos influyen profundamente en el envejecimiento de los tejidos. Algunos de estos datos han surgido del modelo experimental de parabiosis, que se desarrolló por primera vez en el siglo XIX (Finerty, 1952). En parabiosis, dos ratones se unen quirúrgicamente, de modo que desarrollen una circulación sanguínea compartida con un intercambio rápido y continuo de células y factores solubles a niveles fisiológicos a través de su sistema circulatorio común (Wright et al., 2001). La pareja de animales puede tener la misma edad (parabiontes isocrónicos) o diferentes edades (parabiontes heterocrónicos). Debido a que los ratones parabióticos están conectados únicamente a través de su circulación común, la parabiosis es un modelo poderoso para determinar si los factores circulantes pueden alterar la función del tejido (Balsam et al., 2004; Brack et al., 2007; Conboy et al., 2005; Eggan et al., 2006; Ruckh et al., 2012; Sherwood et al., 2004; Villeda et al., 2011; Wagers et al., 2002; Wright et al., 2001). Los experimentos de parabiosis heterocrónica sugieren que las señales transmitidas por la sangre de una circulación joven pueden afectar significativamente a la función de los tejidos en envejecimiento, según lo indicado por la restauración de la activación apropiada y la función de las células satélite "viejas" del músculo esquelético y reparación muscular exitosa después de una lesión tras la exposición a un medio sistémico "juvenil" (Conboy et al., 2005). A la inversa, exponer un ratón joven a un ambiente sistémico antiguo puede inhibir la miogénesis (Brack et al., 2008) y la neurogénesis (Villeda et al., 2011) en el ratón joven.

En esta ocasión, usando un modelo de parabiosis, está demostrado que la hipertrofia cardíaca relacionada con la edad puede revertirse mediante la exposición a un ambiente circulatorio joven. Estos experimentos revelan que la hipertrofia cardíaca del envejecimiento está mediada, al menos en parte, por factores circulantes, y condujo al descubrimiento de que el GDF11 sistémico, un miembro de la familia de TGF β , puede revertir la hipertrofia cardíaca relacionada con la edad. Estos datos indican que al menos algún componente de la insuficiencia cardíaca relacionada con la edad es de naturaleza hormonal y reversible.

RESULTADOS

La parabiosis heterocrónica revierte la hipertrofia cardíaca relacionada con la edad. Los inventores plantearon la hipótesis de que los factores circulantes específicos de un ratón joven podrían revertir el envejecimiento cardíaco. Para ensayar esta hipótesis, se generaron pares parabióticos heterocrónicos (HP), en los que ratones hembra C57BL/6 jóvenes (Y-HP, 2 meses) se unieron quirúrgicamente a parejas de viejas (O-HP, 23 meses), y los compararon con pares de parabióticos isocrónicos (IP) (jóvenes-jóvenes, Y-IP, o viejos-viejos, O-IP), se unieron a edades idénticas y a ratones no emparejados de edad y sexo como controles (Y joven y O viejo) (Figura 1A). El envejecimiento cardíaco en ratones C57BL/6 recapitula el envejecimiento cardíaco humano, incluido el desarrollo de hipertrofia cardíaca relacionada con la edad (Dai et al., 2009) de manera independiente del género. Las parejas parabióticas se mantuvieron durante 4 semanas antes del análisis, y se usaron marcadores congénicos para distinguir las células sanguíneas de los socios de edad avanzada (CD45.2 +) frente a las parejas jóvenes (CD45.1 +) (Wright et al., 2001). Esta estrategia permitió monitorizar el quimerismo sanguíneo en las parejas; sin embargo, dado que los ratones CD45.1+ viejos no están disponibles comercialmente, solo se usaron ratones CD45.2 + para generar pares viejos isocrónicos. Los ratones se sacrificaron 4 semanas después de la unión y se confirmó la circulación cruzada en la mayoría de las parejas (> 90 %) midiendo la frecuencia de células sanguíneas derivadas de donantes de un compañero (CD45.1 +) en la sangre o el bazo de la otra pareja (CD45.2 +) (Figura 5).

El efecto llamativo de una circulación joven en los corazones viejos fue inmediatamente evidente en la inspección visual. Los corazones de ratones viejos expuestos a una circulación joven (O-HP) durante 4 semanas fueron notablemente más pequeños que los corazones de ratones O-IP. Esta observación se confirmó mediante comparación enmascarada de secciones histológicas de eje corto tomadas del ventrículo medio (Figura 1B). Los corazones se pesaron en el momento del sacrificio y la masa cardíaca se normalizó a la longitud de la tibia, un

método estándar que corrige las diferencias en el tamaño del marco corporal (Yoshioka et al., 2007) y que es más apropiado que la normalización al peso corporal cuando se usan ratones más viejos (Jackson et al., 2012; Yin et al., 1982). La relación entre el peso del corazón y la longitud de la tibia fue significativamente menor en los ratones viejos expuestos a una circulación joven (O-HP) en comparación con los ratones viejos expuestos a una circulación vieja (O-IP), después de 4 semanas de parabiosis ($7,93 \pm 0,19$ frente a $9,61 \pm 0,21$ mm/mg, $P < 0,05$, Figura 1C).

A continuación se probó si la regresión general de la hipertrofia cardíaca se debió a cambios en la hipertrofia celular al realizar un análisis morfométrico enmascarado de secciones histológicas cardíacas (datos no mostrados). No se encontraron diferencias significativas en el área de la sección transversal de miocitos cardíacos del VI en ratones jóvenes de ninguna de las tres condiciones experimentales ($186,7 \pm 4,9 \mu\text{m}^2$ en Y, $243,1 \pm 12,1 \mu\text{m}^2$ en Y-IP, $232,2 \pm 16,4 \mu\text{m}^2$ en Y-HP). Como se esperaba de los datos publicados (Dai et al., 2009), el área transversal de miocitos cardíacos promedio fue significativamente mayor en los corazones de los controles isocrónicos viejos ($357,8625,8 \mu\text{m}^2$) y no parabióticos ($348,3612,6 \mu\text{m}^2$) (Figura 2A). Sin embargo, los corazones en envejecimiento de ratones expuestos a una circulación joven durante 4 semanas (O-HP) mostró una reducción significativa en el tamaño de los miocitos en comparación con los corazones O-IP ($220,4 \pm 21,9$ frente a $357,8 \pm 25,8 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Por tanto, la exposición a una circulación joven revierte el fenotipo celular hipertrófico de los corazones envejecidos al fenotipo morfológico típico de un ratón adulto joven.

Para evaluar los posibles efectos específicos del sexo, estos experimentos se repitieron usando ratones macho y se observó una regresión similar en la hipertrofia relacionada con la edad después de la exposición a una circulación joven (Figura 2B). Estos datos indican que el género no es un factor en la reversión de la hipertrofia relacionada con la edad por una circulación joven. Por tanto, la hipertrofia cardíaca dependiente de la edad puede revertirse tanto en hombres como en mujeres a través de la actividad de factores sistémicos, y el impacto sorprendente de tales factores juveniles en esta patología relacionada con la edad es evidente con solo 4 semanas de parabiosis.

La reversión de la hipertrofia cardíaca en ratones viejos expuestos a una circulación joven no se explica por una reducción en la presión arterial. Una pregunta crucial planteada por estos datos es si un efecto hemodinámico puede mediar la hipertrofia cardíaca reducida observada en ratones de edad avanzada después de parabiosis heterocrónica. Para explorar el problema hemodinámico en el contexto de la parabiosis, se generaron parejas parabióticas heterocrónicas hembras (jóvenes, 2 meses y viejas, 21 meses) y se compararon con un número igual de parejas parabióticas isocrónicas jóvenes y viejas y con controles no parabióticos emparejados por sexo y edad, utilizando marcadores congénicos para confirmar el desarrollo de la circulación cruzada (Figura 6A).

Los ratones se unieron durante 10 semanas y durante este período se realizaron mediciones no invasivas de la presión arterial utilizando un sistema computarizado de manguito en la cola (BP-2000, Visitech Systems, Apex, NC) (Krege et al., 1995) que se modificó para contener ratones parabióticos. En los controles no parabiosados (Figura 3A), se observó una presión arterial sistólica significativamente menor en ratones hembra de edad avanzada (23 meses y 21 meses, $n = 32$) en comparación con hembras jóvenes CD45.2 ($n = 8$ semanas) ($n = 12$) ($98,3 \pm 1,8$ frente a $129,962,0$ mmHg, $P < 0,05$), pero no se observaron diferencias al comparar CD45.2 de edad avanzada con ratones hembra CD45.1 jóvenes ($n = 16$) ($98,3 \pm 1,8$ frente a $104,1 \pm 1,9$ mmHg, $P = \text{ns}$). No hubo diferencias en la frecuencia cardíaca entre los grupos (Figura 3A). Estos datos sugieren que las diferencias en la presión arterial o la frecuencia cardíaca en el momento del ingreso al estudio es poco probable que expliquen los cambios resultantes en el tamaño de los miocitos y la masa ventricular global observada en ratones O-HP.

Para abordar aún más el posible impacto de los cambios hemodinámicos en los ratones parabióticos, se realizaron mediciones no invasivas de la presión arterial en puntos de tiempo en serie en parejas heterocrónicas y se compararon con parejas isocrónicas jóvenes y viejas durante 10 semanas. No se detectó ningún cambio con el tiempo en la presión arterial de ratones jóvenes de ninguno de los grupos (Figura 3B). Por el contrario, los ratones envejecidos expuestos a una circulación joven (O-HP) mostraron un aumento significativo en la presión arterial sistólica a las 7 y 10 semanas, y los miembros ancianos de parejas isocrónicas exhibieron un aumento significativo de la presión arterial a las 7 semanas, en relación con las mediciones de referencia. Por último, se obtuvieron trazados hemodinámicos intraarteriales terminales mediante cateterizaciones simultáneas con micromanómetro, realizadas después de que los ratones se hubieran unido durante 10 semanas. En estos estudios, la presión arterial media no difirió significativamente entre ninguno de los grupos (Figura 3C). La circulación cruzada se confirmó después de la eutanasia midiendo la frecuencia de las células sanguíneas derivadas de donantes de un compañero (CD45.1 +) en el bazo del otro compañero (CD45.2 +) (datos no mostrados) y evaluación de la masa cardíaca confirmó que los ratones O-HP en este experimento de 10 semanas también mostraron una reducción significativa en el índice de longitud del corazón-tibia en comparación con los controles anteriores (Figura 6B). Además, el tamaño cardíaco no se modificó en ratones jóvenes unidos durante 10 semanas a una pareja vieja, indicando que la exposición prolongada a una circulación envejecida no indujo hipertrofia en ratones jóvenes, como se podría predecir si los ratones jóvenes sirvieran como sumidero para un factor hipertrófico producido por los ratones viejos (Figura 6B). Por último, consistente con estas mediciones directas de la presión arterial en ratones parabióticos, los niveles circulantes de angiotensina II y aldosterona no fueron diferentes en animales involucrados en parabiosis heterocrónica en comparación con sus homólogos de la misma edad unidos en parabiosis isocrónica (datos no mostrados). Por tanto, es poco probable que los cambios en el eje renina-angiotensina-aldosterona (RAA), bien conocido por su capacidad para regular la presión arterial y el volumen, contribuyan a la remodelación del miocardio

en parabiontes heterocrónicos envejecidos.

Tomados en conjunto, estos datos demuestran claramente que la reversión observada de la hipertrofia cardíaca en ratones viejos expuestos a una circulación joven no puede explicarse por una simple reducción de la presión sanguínea o la modulación de los efectores conocidos de la presión sanguínea en los ratones más viejos. Estos datos implican además un factor anti-hipertrofico producido por ratones jóvenes (en lugar de la dilución de un factor pro-hipertrofia producido por ratones viejos) en la remodelación cardíaca inducida por parabiosis heterocrónica.

Las diferencias en la presión arterial entre los ratones CD45.1 y CD45.2 jóvenes no explican la reversión de la hipertrofia cardíaca. Debido a que los ratones CD45.1 jóvenes tienen una presión arterial significativamente más baja al inicio del estudio en comparación con los ratones CD45.2 jóvenes, los experimentos de parabiosis se repitieron utilizando exclusivamente ratones CD45.2 para generar pares heterocrónicos en los que se unieron ratones hembra CD45.2 jóvenes (Y-HP, 2 meses) con parejas CD45.2 de edad avanzada (O-HP, 23 meses). Estos ratones heterocrónicos se compararon con parejas isocrónicas (Y-IP, 2 meses, u O-IP, 23 meses), después de 4 semanas de parabiosis. Como los ratones en este experimento eran genéticamente idénticos, la citometría de flujo no se pudo usar para verificar el establecimiento del quimerismo en estos pares; sin embargo, la amplia experiencia con este modelo respalda firmemente la conclusión de que la circulación cruzada se establece efectivamente en parejas completamente isogénicas (Pietramaggiore et al., 2009).

Como en estudios previos, la exposición a la circulación de ratones CD45.2 jóvenes a través de la parabiosis condujo a una reducción de la relación entre el peso del corazón y la longitud de la tibia en ratones CD45.2 O-HP ($n = 18$) en comparación con los animales O-IP ($n = 22$) ($8,03 \pm 0,38$ frente a $9,07 \pm 0,24$ mm/mg, $P < 0,05$, Figura 10 A). El área de sección transversal de cardiomiocitos también se redujo significativamente en ratones O-HP en comparación con O-IP ($286,3 \pm 22,7$ frente a $366,4 \pm 25,4 \mu m^2$, $P < 0,05$, Figura 10 B). Las parejas de parejas heterogéneas que usan solo ratones CD45.2 también mostraron un perfil de presión arterial después de 4 semanas que era comparable a los ratones O-HP que se habían unido a parejas jóvenes CD45.1 (Figura 10C-10D). También, similar a los resultados obtenidos usando parejas jóvenes CD45.1, la parabiosis heterocrónica no indujo cambios en la relación peso/tibia del corazón (Figura 10A), tamaño de cardiomiocitos (Figura 10B) o presión arterial en ratones CD45.2 jóvenes unidos a parejas de edad avanzada (Figura 10C-10D). Estos datos demuestran que la regresión de la hipertrofia cardíaca observada en ratones viejos expuestos a una circulación joven no puede explicarse por las diferencias de presión arterial observadas en ratones CD45.1 y CD45.2 C57B1/6 jóvenes.

La parabiosis heterocrónica está asociada con la remodelación molecular. La hipertrofia cardíaca se asocia con una expresión alterada de varios marcadores cardíacos. Para evaluar la reversión de la hipertrofia en ratones O-HP a nivel molecular, la expresión transcripcional cardíaca del péptido natriurético auricular (ANP) y el péptido natriurético cerebral (BNP), se cuantificaron los marcadores moleculares de hipertrofia de miocitos (Figuras 4A-4B). Se detectó una reducción significativa en los niveles de transcripción de ANP y BNP en los corazones de ratones viejos expuestos a una circulación joven, en comparación con los controles isocrónicos de la misma edad. Los niveles de transcripción de la ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico (SERCA-2), cuya expresión puede variar con la edad (Dai et al., 2009) y es funcionalmente importante para la relajación diastólica normal, también se cuantificaron. La expresión de SERCA-2 se incrementó significativamente en los corazones de ratones envejecidos expuestos a una circulación joven (O-HP) en comparación con los controles de O-IP (Figura 4C). Estos datos proporcionan evidencia adicional de que los factores circulantes jóvenes modifican las vías moleculares discretas asociadas con la hipertrofia de los miocitos cardíacos y la función diastólica.

Los cambios de comportamiento asociados con la parabiosis no explican la reversión de la hipertrofia cardíaca en ratones heterocrónicos. Aunque el modelo de parabiosis se ha utilizado para estudios fisiológicos durante más de un siglo (Finerty, 1952), se consideró la posibilidad de que las restricciones físicas del emparejamiento parabiótico introdujeran cambios de comportamiento que contribuyeron a la reversión observada de la hipertrofia cardíaca. Por tanto, se desarrolló una técnica quirúrgica descrita en el presente documento como "parabiosis simulada", por lo que los ratones se unen quirúrgicamente mientras dejan la piel intacta, de forma tal que no desarrollen una circulación compartida (Figura 11A). Parejas parabióticas heterocrónicas simuladas, en el que se unieron ratones hembra jóvenes (2 meses) a parejas de edad (23 meses) y se compararon con pares parabióticos isócronos simulados (jóvenes o viejos) y con parejas parabióticas heterocrónicas e isocrónicas emparejadas por edad (Figura 11A- 11C). Los corazones de las parejas simuladas se analizaron después de 4 semanas, como en experimentos anteriores. A diferencia de la unión parabiótica convencional, en la que se estableció la circulación cruzada efectiva, no se encontró una diferencia significativa en la relación entre el peso cardíaco y la longitud de la tibia en ratones de edad avanzada involucrados en la parabiosis heterocrónica simulada, en comparación con las simuladas isocrónicas envejecidas ($9,38 \pm 0,39$ frente a $9,63 \pm 0,22$ mm/mg, $P = ns$) (Figura 11B). Estos datos indican que se requiere la circulación cruzada y el intercambio de factores transmitidos por la sangre para revertir la hipertrofia cardíaca relacionada con la edad. Este hallazgo también se confirmó a nivel celular, dado que el tamaño de los cardiomiocitos en las farolas heterocrónicas envejecidas no difirió del tamaño de los miocitos en las simuladas isocrónicas envejecidas ($352,9 \pm 18,9$ frente a $355,0 \pm 9,5 \mu m^2$, $P = ns$) (Figura 11C). Por último, los niveles de transcritos de ANP, BNP y SERCA-2 se evaluaron en parejas operadas simuladas. Los niveles de estos marcadores moleculares de hipertrofia aumentaron significativamente (ANP) o no se alteraron (BNP y SERCA-2) en las simuladas heterocrónicas viejas en comparación con las simuladas isocrónicas viejas (datos no mostrados), lo que indica que

la remodelación molecular asociada con la hipertrofia cardíaca reducida no ocurre en ausencia de una circulación compartida.

El factor de diferenciación de crecimiento 11 se reduce en la circulación de ratones envejecidos y la parabiosis heterocrónica restablece los niveles "juveniles". Los estudios descritos anteriormente sugieren fuertemente que las diferencias en los factores transmitidos por la sangre en ratones jóvenes versus viejos subyacen a la remodelación cardíaca inducida observada en ratones viejos después de la parabiosis heterocrónica. Para identificar candidatos que podrían explicar la regresión de la hipertrofia cardíaca en ratones viejos expuestos a una circulación juvenil, se realizó una serie de exámenes de suero y plasma recolectados de ratones jóvenes o viejos involucrados en parabiosis isocrónica o heterocrónica (duración de 4 semanas). Con plasma de parabiontes viejos expuestos a una circulación joven o de controles isocrónicos, se realizaron perfiles metabólicos de 69 aminoácidos y aminas; y análisis de lipidómica, evaluando 142 lípidos de 9 clases de lípidos: lisofosfatidilcolinas, lisofosfatidiletanolaminas, esfingomielinas, fosfatidilcolinas, diacilgliceroles, ésteres de colesterol, fosfatidiletanolaminas, fosfatidil-inositoles y triacilgliceroles. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre los ratones parabióticos heterocrónicos e isocrónicos en la pantalla metabólica o lipidómica (datos no mostrados). Un análisis de proteómica a gran escala (SomaLogic, Inc. Boulder, CO) se realizó a continuación, utilizando tecnología basada en un aptámero para evaluar cuantitativamente muestras de plasma de 10 ratones jóvenes (2 meses) y 10 viejos (23 meses). Este enfoque reveló 13 analitos que distinguían de manera fiable a los ratones jóvenes de los viejos (Tabla 1). De estos candidatos, uno (factor de diferenciación de crecimiento 11, GDF11, un miembro de la superfamilia de activina/TGFβ de factores de crecimiento y diferenciación) se confirmó en análisis de ratones parabióticos isocrónicos y heterocrónicos para mostrar abundancia diferencial en el plasma sanguíneo de parejas isocrónicas de edad avanzada frente a parejas isocrónicas y un perfil de expresión más "juvenil" en animales viejos heterocrónicos (Figura 12A).

Para dilucidar posibles mecanismos para la reducción dependiente de la edad en el GDF11 circulante, su expresión se analizó en varios tejidos y poblaciones celulares. Los datos sugieren una expresión amplia, como se informó anteriormente (McPherron, 2010), con el bazo que muestra los niveles más altos de ARNm de GDF11 (Figura 13A). La expresión de GDF11 se examinó a continuación en función de la edad, comparando los tejidos de ratones C57B1/6 viejos (24 meses) y jóvenes (3 meses) (Figuras 13B-13C). Se detectó una disminución significativa tanto en la expresión del gen GDF11 como en los niveles de proteína GDF11 en los bazos de ratones viejos. Estos datos sugieren que una reducción en el GDF11 esplénico podría contribuir a la disminución del GDF11 circulante en ratones viejos, aunque como el GDF11 se produce en muchos órganos (McPherron, 2010), los cambios en la expresión en otros tejidos y órganos también pueden contribuir.

GDF11 previene la hipertrofia cardíaca in vitro y suprime la fosforilación del factor de transcripción Forkhead. A continuación se probó si GDF11 presentaba propiedades anti-hipertroóficas en cardiomiocitos neonatales cultivados usando un ensayo de incorporación de leucina. Después de la inanición sérica, se trataron los cardiomiocitos de rata neonata fueron durante 24 h con GDF11 recombinante (rGDF11) o la miostatina de la proteína de la superfamilia TGFβ estrechamente relacionada a tres concentraciones diferentes, seguido de 24 horas de exposición a 3H-leucina y fenilefrina (50 μM). Se observó una inhibición significativa y reproducible de la incorporación de ³H-leucina inducida por fenilefrina en miocitos tratados con rGDF11 50 nM, un efecto que no se observó después del tratamiento con miostatina a la misma concentración (Figura 12B). La capacidad de rGDF11 o miostatina para activar las vías de TGFβ también se probó en cardiomiocitos derivados de células madre pluripotenciales inducidas humanas, como se mostró anteriormente en tejidos no cardíacos (Tsuchida et al., 2008). Las células se estimularon durante 15 minutos con medios libres de suero (Control) o con los mismos medios que contenían rGDF11 (50 nM) o miostatina (50 nM). Las células estimuladas con rGDF11 o con miostatina exhibieron un aumento significativo en pSMAD2 y pSMAD3, consistente con la activación de la vía TGFβ y la supresión de la fosforilación del factor de transcripción de Forkhead (Figura 12C). Tomados en conjunto, estos datos sugieren que GDF11 tiene un efecto anti-hipertroífico directo a nivel del miocito cardíaco.

GDF11 revierte la hipertrofia cardíaca relacionada con la edad in vivo. La tinción inmunohistoquímica de secciones cardíacas de ratón con anticuerpos específicos para GDF11 demostró evidencia de GDF11 en las membranas plasmáticas de los cardiomiocitos, y específicamente en los discos intercalados, lo que avala el concepto de que GDF11 tiene efectos específicos a nivel del cardiomiocito (datos no mostrados). Junto con la evidencia *in vitro* (Figura 12B-12C) que respalda la señalización mediada por GDF11 en cardiomiocitos, estos datos proporcionaron la justificación para probar si la restauración de los niveles "juveniles" de GDF11 circulante en ratones de edad avanzada podría revertir la hipertrofia cardíaca relacionada con la edad. Para determinar la dosis óptima, la vía y el intervalo de administración de rGDF11, se realizó un estudio de dosis-respuesta, administrando la proteína a ratones mediante inyección intraperitoneal en bolo (i.p.) a dosis que varían de 0,005 a 0,1 mg/kg (datos no mostrados). Solo a la dosis más alta (0,1 mg/kg) se observó un aumento reproducible en el nivel plasmático de GDF11 1 hora después de la inyección (Figura 14). Adicionalmente, el análisis de muestras de plasma recolectadas en serie durante 48 h después de un solo i.p. administración de 0.1 mg/kg rGDF11, indicó que los niveles de GDF11 se elevaron de manera persistente durante aproximadamente 24 h después de esta inyección única (Figura 14).

Basándose en estos resultados, se diseñó un estudio aleatorizado, enmascarado y controlado por vehículo para evaluar los efectos de rGDF11 en los parámetros macroscópicos e histológicos de la hipertrofia cardíaca. Los

ratones hembra viejos (23 meses) (C57B1/6) recibieron una inyección intraperitoneal diaria de rGDF11 (0.1 mg/kg) o solución salina durante 30 días (n = 16 por grupo). La relación entre el peso del corazón y la longitud de la tibia fue significativamente menor en ratones viejos inyectados con rGDF11 en comparación con el grupo de control inyectado con solución salina (Figura 12D). El análisis morfométrico demostró además que el tratamiento con rGDF11 resultó en cardiomiocitos significativamente más pequeños en comparación con los controles a los que se inyectó solución salina (Figura 12E).

También se investigaron los cambios moleculares en los corazones de ratones envejecidos tratados con rGDF11. Se detectó una reducción significativa del BNP y una tendencia similar en el ANP, ambos marcadores moleculares asociados con la hipertrofia cardíaca (Figura 12F). A la inversa, los niveles de transcripción de SERCA-2, que se correlacionan con la función diastólica (Dai et al., 2009), aumentaron en los corazones tratados con rGDF11 en relación con los controles pareados por edad tratados con solución salina. Este patrón de disminución inducida por rGDF11 en los marcadores moleculares de hipertrofia y aumento en la expresión de SERCA-2 se asemeja al patrón observado en ratones viejos expuestos a una circulación joven por parabiosis. Se realizó una evaluación ecocardiográfica de ratones C56B1/6 machos de 24 meses de edad que fueron aleatorizados para recibir una inyección intraperitoneal diaria de rGDF11 (0,1 mg/Kg) o vehículo durante 30 días. Ninguno de los parámetros funcionales que evaluamos fue significativamente diferente entre los dos grupos (Tabla 2).

GDF11 no previene la hipertrofia cardíaca después de una sobrecarga de presión in vivo. Para determinar si el efecto de GDF11 en los cardiomiocitos es específico para la hipertrofia cardíaca relacionada con la edad, Ratones hembra C56B1/6 de 2 meses de edad fueron sometidos a constricción aórtica transversal y luego aleatorizados para recibir una inyección IP diaria de rGDF11 (0,1 mg/Kg) o vehículo durante 30 días. Se realizó una evaluación ecocardiográfica a los 15 días y luego antes del sacrificio (Figura 15C). Después de 30 días, se sacrificó a los ratones y se extrajeron los corazones para evaluación histológica y molecular. La morfometría cardíaca se evaluó midiendo la relación peso cardíaco/longitud de tibia: no hubo reducción significativa en la hipertrofia en ratones sometidos a bandas aórticas y tratados durante 30 días con rGDF11 (n = 10) en comparación con los corazones de ratones que recibieron solo vehículo (n = 9) (P = 0,4, Figura 15 A). Adicionalmente, El área de la sección transversal de los cardiomiocitos no fue significativamente diferente (Figura 15B). Se evaluó el desarrollo de fibrosis cardíaca y no detectó ninguna diferencia entre los dos grupos (datos no mostrados). Estos datos sugieren que GDF11 no previene todas las formas de hipertrofia cardíaca.

ANÁLISIS

La hipertrofia ventricular izquierda es una característica importante del envejecimiento cardíaco, que contribuye a la disfunción diastólica y la insuficiencia cardíaca con función sistólica preservada (Lakatta y Levy, 2003). Un estudio de autopsia de sujetos ancianos sin hipertensión o enfermedad cardiovascular clínicamente evidente realizado por Anversa y sus colegas describe el agrandamiento de los cardiomiocitos y la disminución del número de cardiomiocitos, sin un cambio en la masa miocárdica total, un patrón que fue más pronunciado en los machos (Olivetti et al., 1995). Un estudio transversal de una población de pacientes similar, sin embargo, sugiere un aumento en el grosor de la pared ventricular izquierda en ambos sexos (Lakatta y Levy, 2003). Los pacientes con disfunción diastólica tienden a ser mayores y tienen más probabilidades de ser obesos, diabéticos, hipertensos y de sexo femenino, en comparación con pacientes con disfunción sistólica (Owan y Redfield, 2005), lo que sugiere distintos mecanismos patológicos subyacentes.

La hipótesis central de este estudio es que el envejecimiento del fenotipo cardíaco es reversible tras la exposición a factores en una circulación joven. Esta hipótesis se probó utilizando ratones parabióticos quirúrgicamente anastomosados. Se usaron ratones C56B1/6 para estos experimentos porque desarrollan un fenotipo cardíaco relacionado con la edad que se asemeja a los seres humanos. Además, debido a que el género puede desempeñar un papel en la hipertrofia cardíaca fisiológica (Foryst-Ludwig et al., 2011), se realizaron experimentos tanto en machos como en hembras. La exposición de ratones viejos a una circulación joven por parabiosis condujo de manera reproducible a una reversión de la hipertrofia de miocitos cardíacos de manera independiente del género, y este tamaño reducido de cardiomiocitos se tradujo en una reducción de la masa cardíaca global. Esta transformación estructural fue acompañada por una reducción en la expresión génica miocárdica de péptidos natriuréticos conocidos por promover la remodelación cardíaca desadaptativa y un aumento en Ca²⁺ + ATPasa (SERCA-2), cuya expresión es integral para la relajación miocárdica y, por lo tanto, la función diastólica normal. En conjunto, estos datos son consistentes con el concepto de que los factores presentes en una circulación joven pueden revertir aspectos estructurales y moleculares críticos del envejecimiento cardíaco.

Con la transferencia circulatoria de una sustancia soluble que emerge como un mecanismo probable de regresión de hipertrofia cardíaca en ratones parabióticos viejos, se realizó una búsqueda sistemática para identificar los factores candidatos presentes en niveles más altos en la sangre de ratones jóvenes que podrían ser la base del efecto anti-hipertrofico. El análisis proteómico identificó varios factores con niveles que cambian con la edad, y no puede excluirse que otros factores también participen en el efecto observado en la parabiosis heterocrónica; sin embargo, GDF11 surgió como un fuerte candidato de una serie de análisis de detección que comparaban los perfiles de lípidos, metabolitos y proteínas de señalización presentes en plasma joven frente al viejo. Mientras que la expresión de GDF11 es detectable en diversos tejidos, el bazo muestra la concentración más alta y exhibe una disminución

dependiente de la edad en los niveles de GDF11. Por tanto, el bazo puede contribuir a la circulación de GDF11 y una producción relacionada con la edad o un defecto secretor en el bazo podría participar en la reducción de la circulación de GDF11 en ratones viejos.

- 5 Un estudio reciente muestra que el tratamiento de ratones caquéxicos con proteína soluble ActRIIB (sActRIIB), que antagoniza la señalización por GDF11 (así como por miostatina, activina y otros miembros de la familia de TGF β , dada la promiscuidad de los receptores (Tsuchida et al., 2008) revierte la atrofia cardíaca en animales con tumor (Zhou et al., 2010). Junto con los datos proteómicos, este estudio apoyó aún más la noción de que GDF11 actúa como un mediador de la actividad antihipertrófica sistémica encontrada en ratones jóvenes. Además, los datos
- 10 histológicos (datos no mostrados) sugirieron la unión de GDF11 a cardiomiocitos *in vivo*. Se realizó un estudio aleatorizado controlado por vehículo, administrando rGDF11 a ratones viejos durante 30 días. Esta terapia con rGDF11 condujo a una regresión significativa de la hipertrofia cardíaca en ratones viejos, como lo indican tanto las mediciones de peso cardíaco como los análisis morfométricos.
- 15 Además, la demostración de que rGDF11, pero no la miostatina, inducía una inhibición dependiente de la dosis de hipertrofia mediada por fenilefrina en miocitos cardíacos neonatales, *in vitro*, sugiere que GDF11 tiene efectos específicos y directos a nivel del miocito cardíaco. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, sin embargo, tanto rGDF11 como miostatina estimularon las vías de señalización de TGF β en cardiomiocitos, lo que sugiere que la activación de los factores anti-hipertróficos de FoxO puede promover la degradación de proteínas mediada por
- 20 proteasomas (Sandri et al., 2004)

La observación de que la miostatina regula negativamente la masa muscular esquelética condujo al desarrollo de estrategias terapéuticas para la atrofia muscular relacionada con la edad y el cáncer al bloquear la señalización de la miostatina. De forma interesante, aunque los ratones nulos en miostatina no han demostrado consistentemente

25 cambios importantes en la masa cardíaca durante el envejecimiento (Cohn et al., 2007; Jackson et al., 2012), el tratamiento con un antagonista soluble de ActRIIB conduce a un aumento de la masa muscular esquelética y cardíaca, lo que sugiere que los efectos cardíacos de este antagonista pueden surgir de la inhibición de un ligando que no sea miostatina. De hecho, a pesar de la señalización a través de combinaciones similares de receptores de activina, GDF11 y miostatina exhiben muchas funciones no superpuestas. Los ratones nulos en miostatina muestran

30 un aumento sustancial de la masa del músculo esquelético, mientras que los ratones nulos en GDF11 exhiben anomalías esqueléticas y renales y mueren dentro de las 24 horas posteriores al nacimiento (McPherron et al., 1999). Por tanto, se contempla que los efectos antagonistas de ActRIIB informados sobre el miocardio (Zhou et al., 2010) pueden deberse a la inhibición de la señalización de GDF11 e independientemente de los efectos sobre la miostatina.

35 GDF11 fue ineficaz para prevenir la hipertrofia cardíaca en el contexto de sobrecarga de presión. De forma interesante, los estudios preliminares de los inventores sugieren que el tratamiento con GDF 11 puede influir en los fenotipos del envejecimiento en otros tejidos, tal como el músculo esquelético.

40 En resumen, el análisis de la remodelación inversa en los corazones de ratones parabióticos heterocrónicos condujo a la identificación de GDF 11 como un factor circulante regulado por edad con potentes propiedades antihipertróficas. Estos estudios implican a GDF11 en la hipertrofia cardíaca relacionada con la edad (Tabla 1). Adicionalmente, el GDF11 estimula la fosforilación de la proteína diana (SMAD2/3) en los cardiomiocitos derivados de células pluripotenciales humanas (Figura 12C). Los resultados descritos en el presente documento proporcionan

45 posibilidades terapéuticas para dirigirse a la hipertrofia cardíaca del envejecimiento mediante la restauración de los niveles juveniles de GDF 11 circulante.

Procedimientos experimentales:

50 **Animales.** Se obtuvieron ratones C57B1/6 envejecidos (21-23 meses) del Instituto Nacional sobre el Envejecimiento (NIA); se obtuvieron ratones jóvenes (2 meses) C57B1/6 (CD45.1-CD45.2 +) o jóvenes B6.SJL (CD45.1 + CD45.2-) de JAX.

Parabiosis. La parabiosis se realizó como se describió anteriormente (Bunster y Meyer, 1933; Ruckh et al., 2012). El quimerismo sanguíneo se confirmó en un subconjunto de pares parabióticos mediante citometría de flujo que mide la frecuencia de células sanguíneas derivadas de donantes de un compañero (CD45.1 +) en el bazo del otro

55 compañero (CD45.2 +). Las células derivadas de la pareja normalmente representaban el 40-50 % de los esplenocitos, consistente con el establecimiento de la circulación cruzada parabiótica. Debido a que los ratones viejos CD45.1 + no están disponibles comercialmente, no podríamos utilizar este método para verificar el establecimiento del quimerismo en parejas parabióticas isocrónicas.

60

Parabiosis simulada. La parabiosis simulada se realizó como una modificación del procedimiento de parabiosis (Bunster y Meyer, 1933; Ruckh et al., 2012) para lograr la unión quirúrgica sin el desarrollo de una circulación compartida. Los ratones fueron anestesiados para la relajación muscular completa y se unieron mediante una

65 modificación de la técnica de Bunster y Meyer. Después de afeitar los aspectos laterales correspondientes de cada ratón, se hicieron incisiones cutáneas coincidentes desde el olécranon hasta la articulación de la rodilla de cada

ratón, y la fascia subcutánea se diseccionó sin rodeos para crear aproximadamente 1/2 cm de piel libre. Las articulaciones del olécranon y la rodilla se unieron con una única sutura de prolene 2-0. La sutura se pasó secuencialmente a través de la piel y la articulación del primer ratón, a través de un disco de silicio para separar la piel de los dos ratones, y luego a través de la piel y la articulación del segundo ratón. La sutura se ligó, de forma tal que el disco de silicio separó la piel de cada ratón en la articulación y sin ningún contacto entre las aletas cutáneas de cada ratón. Las incisiones de la piel se cerraron con grapas. Las suturas de prolene que conectan a los ratones fueron reforzadas con grapas de malla.

Evaluación morfométrica del tamaño de los cardiomiocitos. Los corazones de los ratones se fijaron con paraformaldehído al 4 %, se incluyeron en parafina, se seccionaron y se tiñeron con ácido peryódico Schiff (PAS). La tinción, el escaneo y la cuantificación se llevaron a cabo de forma ciega utilizando 5 secciones seleccionadas al azar del corazón.

Presión arterial no invasiva. Un sistema computarizado de manguito en la cola (BP-2000, Visitech Systems, Apex, NC) se modificó para permitir la medición simultánea de la presión arterial de ambos miembros de la pareja parabiótica. Los ratones o parejas de ratones no operados fueron entrenados durante 5 días consecutivos en el dispositivo precalentado de la cola para adaptarlos al procedimiento, seguido de mediciones de frecuencia cardíaca y presión arterial sistólica.

Mediciones neurohormonales. Los niveles circulantes de angiotensina II y aldosterona en muestras de suero se midieron mediante ELISA (Enzo Life Sciences International, INC., EE. UU.)

Análisis proteómico. Las muestras de plasma EDTA (20 µl) de 20 ratones se analizaron en la plataforma de descubrimiento de proteómica SomaLogic™ (SOMAscan), que usa SOMAmers™ para medir 1001 proteínas simultáneamente. SOMAmers™ (aptámeros modificados de baja velocidad lenta) son reactivos de unión a proteínas basados en ácido nucleico evolucionados a través de SELEX™ (Tuerk y Gold, 1990) para unir objetivos proteicos. SOMAscan™ transforma la concentración de proteínas en la matriz en una cantidad relativa de SOMAmers™, a través de la unión de equilibrio y la eliminación de SOMAmers™ y proteínas no unidas. La cantidad de SOMAmer™ se mide por hibridación con microarrays (para una descripción completa, véase (Gold et al., 2010))

Ensayo de hipertrofia de miocitos cardíacos in vitro. Se aislaron miocitos cardíacos neonatales de ratas CD1 posnatales del día 1 (Charles River) (Seki et al., 2009). Aproximadamente 36 horas después de la siembra en placas, los miocitos cardíacos se privaron de suero durante 24 horas en DMEM bajo en glucosa suplementado con ITS (Laboratorios PAA). Los miocitos cardíacos se pretrataron con miostatina (R&D Systems) o rGDF11 (Peprotech) durante 24 horas, antes de tratar con fenilefrina (50 µM, Sigma) y analizar la síntesis/hipertrofia de proteínas con ³H-leucina (1 µCi/ml, Moravsek). Los tratamientos con rGDF11 y miostatina continuaron durante el período de exposición a fenilefrina y ³H-leucina. 24 horas después de marcar con ³H-leucina, las células se lavaron con PBS helado y se fijaron con ácido tricloroacético al 10 % helado durante 45 minutos a 4 °C. Las células se lisaron con NaOH 0,05 M y se analizaron por centelleo líquido.

Análisis estadísticos. La comparación de datos se sometió a ANOVA unidireccional y corrección de Bonferroni post-hoc o prueba t de Student, suponiendo una distribución de dos colas y variaciones desiguales. Se asignó significación estadística para p < 0,05; los resultados se muestran como error estándar de la media.

Citometría de flujo. Toda la citometría de flujo se realizó en esplenocitos no fijados recién aislados mantenidos en hielo durante todos los pasos de incubación. Las células se bloquearon con HBSS/FBS al 2 % durante 10 minutos antes de la resuspensión a una concentración de 1x10 células por 250 µl. Las células se incubaron durante 30 minutos en anticuerpos primarios directamente conjugados específicos para CD45.1 (eBioscience) y CD45.2 (eBioscience) y se lavaron dos veces en HBSS, antes del análisis de flujo. Los anticuerpos de control de isotipo conjugado se usaron en todos los experimentos.

Análisis de la expresión génica. Para cuantificar los genes de expresión comúnmente inducidos por estímulos hipertróficos, se extirparon los corazones de los diferentes grupos experimentales y se congelaron en nitrógeno líquido 4 semanas después de la cirugía. El ARN se extrajo con reactivo Trizol (Sigma), se transcribió a ADNc con el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems) usando cebadores aleatorios, y posteriormente analizado por PCR en tiempo real en un sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7300 usando SYBR Green™ (Applied Biosystems) o TaqMan™ (Applied Biosystems) y cebadores para ANP (izquierda: 5'-TCGTCTTGGCCTTTTGGCT-3' (SEQ ID NO: 10); derecha: 5'-TCCAGGTGGTCTAGCAGGTTCT-3' (SEQ ID NO: 11)), BNP (izquierda: 5'-AGGGAGAACACGGCATCATT-3' (SEQ ID NO: 12); derecha: 5'-GACAGCACCTTCAGGAGAT-3' (SEQ ID NO: 13)), SERCA-2 (izquierda: 5'-TGGAACAACCCGGTAAAGAGT-3' (SEQ ID NO: 16); derecha: 5'-CACCAGGGGCATAATGAGCAG-3' (SEQ ID NO: 17)), GDF11 (MmOI 159973 ml TaqMan Gene Expression Assays, Life technologies). Los resultados se normalizaron a la expresión de la proteína de unión a TATA y se presentaron como un aumento de veces respecto a los animales isocrónico jóvenes basados en el método ΔΔCt.

Análisis de perfiles metabólicos y lipídicos. *Análisis LC-MS/MS.* El perfil metabólico plasmático se realizó en un

espectrómetro de masas de triple cuadrupolo triple QTRAP 4000 (Applied Biosystems/Sciex, Foster City, CA) con una fuente de electropulverización Turbo V acoplada a un sistema HPLC que incluye un muestreador automático PAL HTS (Leap Technologies, Carrboro, NC) y una bomba binaria de la serie 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Este sistema LC-MS/MS se utilizó para el análisis de metabolitos polares empleando cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) y también para el análisis de lípidos, cada uno de los cuales requiere distintos métodos de extracción de plasma, Métodos de adquisición LS/MS y configuraciones de instrumentos. El software MultiQuant v. 2.0.2 (AB SCIEX, Foster City, CA) se utilizó para la integración automática de picos y los picos de metabolitos también se revisaron manualmente para determinar la calidad de la integración (Roberts et al., 2012). *HILIC*: La cromatografía líquida de interacción hidrofílica es adecuada para analizar metabolitos hidrofílicos; incluyendo aminoácidos, nucleótidos y neurotransmisores. Se extrajeron diez microlitros de plasma con 90 µl de 74,9: 24,9:0,2 vol/vol/vol de acetonitrilo/metanol/ácido fórmico que contiene 0,2 µg/ml (concentración final) de valina-d8 marcada isotópicamente y fenilalanina-d8 (Sigma-Aldrich; St Louis, MO). Las muestras se sometieron a agitación en vórtex durante 30 segundos, se centrifugaron (10 minutos, 10.000 rpm, 4 °C) y los sobrenadantes se inyectaron directamente en el sistema LC/MS. Las muestras se sometieron a cromatografía de interacción hidrofílica utilizando una columna de sílice Atlantis HILIC™ de 150 x 2,1 mm (Waters, Milford, MA): fase móvil A, formiato de amonio 10 mM y ácido fórmico al 0,1 %; y fase móvil B, acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 %. La columna se eluyó isocráticamente con un 5 % de fase móvil A durante 0,5 minutos seguido de un gradiente lineal hasta un 60 % de fase móvil durante 10 minutos y luego nuevamente al 5 % de fase móvil A durante 17 minutos. La ionización por electropulverización (ESI) se usó en el modo de iones de monitorización de reacción múltiple positiva (MRM). Se optimizaron los potenciales de reducción y las energías de colisión para cada metabolito mediante la infusión de estándares de referencia antes de los análisis de la muestra. El voltaje de pulverización iónica fue de 5 kV, la temperatura de la fuente fue de 425 °C y la ventana de MRM se ajustó a 70 ms. El ácido fórmico, acetato de amonio y los disolventes de calidad LC/MS y valina-d8 se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), con el resto de estándares analíticos marcados isotópicamente obtenidos de Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, MA). Las muestras se procesaron en un orden aleatorio para minimizar la variación interna y se espaciaron mediante muestras de plasma agrupadas de ratón para dar cuenta de la deriva temporal en todos los metabolitos analizados. Las áreas de pico estándar internas se monitorizaron para el control de calidad y se volvieron a analizar muestras individuales con áreas de pico que difieren de la media del grupo en más de 2 desviaciones estándar. Los metabolitos analizados se seleccionaron basándose en los siguientes criterios: 1) identidad estructural conocida; 2) distribución a través de múltiples vías bioquímicas; 3) medición confiable usando LC/MS de manera de alto rendimiento; y 4) baja tasa de falta en nuestra plataforma (<1 %).

Análisis de los lípidos: Se extrajeron diez microlitros de plasma con 190 µl de isopropanol que contenía 0,25 µg/ml (concentración final) de 1-dodecanoil-2-tridecanoil-sn-glicero-3-fosfolina (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL). Tras la centrifugación, los sobrenadantes fueron inyectados directamente, seguido de cromatografía de fase inversa utilizando una columna Prosphere HP C4 de 150 x 3,0 mm (Grace, Columbia, MD): fase móvil A, 95:5:0,1 vol/vol/vol 10 mM acetato de amonio/metanol/ácido acético; y fase móvil B, 99:9:0,1 vol/vol metanol/ácido acético. La columna se eluyó isocráticamente con 80 % de fase móvil A durante 2 minutos seguido de un gradiente lineal hasta 20 % de fase móvil A durante 1 minuto, un gradiente lineal a 0 % de fase móvil A durante 12 minutos, luego 10 minutos a 0 % de fase móvil A y un gradiente lineal a 80 % de fase móvil A durante 9 minutos. Los análisis de MS se llevaron a cabo usando ionización por electropulverización y escaneos Q1 en el modo de iones positivos. El voltaje de pulverización de iones fue de 5,0 kV, la temperatura de la fuente fue de 400 °C y el potencial de descolgamiento fue de 70 V. Para cada analito lipídico, el primer número indica el número total de carbonos en la (s) cadena (s) de lípido acilo y el segundo número (después del colon) indica el número total de dobles enlaces en la (s) cadena (s) de lípido acilo.

Inmunohistoquímica. Los corazones de los ratones se fijaron con paraformaldehído al 4 %, se incluyeron en parafina, se seccionaron y se tiñeron con métodos de microscopia inmunohistoquímica estándar como se describió anteriormente. Se usó un paso de recuperación de antígeno en todos los experimentos, calentando muestras en un tampón a base de citrato (Dako) a 95 °C durante 20 min. Los anticuerpos primarios se usaron de la siguiente manera: un anticuerpo GDF11 de conejo 1:500 (Abcam) Se usó un anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado seguido de reactivo ABC y DAB (Vector Laboratories) para inmunohistoquímica.

Cardiomiocitos humanos derivados de células madre pluripotenciales inducidas. Los cardiomiocitos humanos derivados de células madre pluripotenciales inducidas (iPSC-CM) se obtuvieron de Cellular Dynamics International (CDI) y se cultivaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, las células se colocaron en placas a ~ 580,000 células viables por pocillo en placas de 6 pocillos recubiertas con fibronectina de 5 µg/ml en medio de placas CDI. El medio se cambió después de 2 días a Medio de mantenimiento CDI, y se realizaron 2 cambios adicionales con este medio los días 4 y 6 después de la siembra en placas. En este último punto, se observó que las células latían de manera homogénea. A los 7 días de la siembra en placas, el medio se cambió a DMEM libre de suero (baja glucosa) y las células se incubaron durante 24 h adicionales. En este momento, las células se expusieron a medios libres de suero de control, o al mismo medio con miostatina 50 nM (Peprotech) o rGDF11 50 nM (Peprotech) durante 15 minutos. Se recogieron los lisados y se realizaron análisis occidentales utilizando métodos estándar. Los anticuerpos utilizados fueron de Cell Signaling Technology: phospho-FoxO1/FoxO3a (9464), phospho-SMAD2 (3108), phospho-SMAD3 (9520), GAPDH (2118).

Análisis de transferencia Western. Los análisis de transferencia Western se realizaron como se describió anteriormente (Seki et al., 2009). Las membranas (fluoruro de polivinilideno, PerkinElmer Life Sciences) se incubaron con anticuerpos primarios (anti-GDF1 1 diluido 1: 1000, de Abcam) y detectado con anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano picante (1:2000, de Bio-Rad) y quimioluminiscencia mejorada (PerkinElmer Life Sciences). Los análisis de transferencia Western de bazo se realizaron con membranas (membrana de PVDF de inmunotransferencia, Bio-Rad) incubado con anticuerpos primarios (anti-GDF 11, Abcam, Dilución 1:500 y alfa-tubulina, Sigma, dilución 1:1000) y detectado con anticuerpos conjugados con IRDye (dilución 1:10000, Li-Cor). Las membranas fueron escaneadas con Odyssey CLx Infrared Imaging System (Li-Cor) y cuantificadas por densitometría con el Image Studio Software (Li-Cor).

Constricción aórtica transversal y ecocardiografía. La cirugía de constricción aórtica transversal (TAC) y la ecocardiografía se realizaron en estudios in vivo utilizando protocolos enmascarados.

Bibliografía:

- Aurigemma, G.P. (2006). Diastolic heart failure--a common and lethal condition by any name. *N Engl J Med* 355, 308-310.
- Balsam, L.B., Wagers, A.J., Christensen, J.L., Kofidis, T., Weissman, I.L., y Robbins, R. C. (2004). Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428, 668-673.
- Brack, A.S., Conboy, M.J., Roy, S., Lee, M., Kuo, C.J., Keller, C., y Rando, T.A. (2007). Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* 317, 807-810.
- Bunster, E., y Meyer, R.K. (1933). An improved method of parabiosis. *The Anatomical Record* 57, 339-343.
- Cohn, R.D., Liang, H.Y., Shetty, R., Abraham, T., y Wagner, K.R. (2007). Myostatin does not regulate cardiac hypertrophy or fibrosis. *Neuromuscul Disord* 17, 290-296.
- Conboy, I.M., Conboy, M.J., Wagers, A.J., Girma, E.R., Weissman, I.L., y Rando, T.A. (2005). Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 433, 760-764.
- Dai, D.F., Santana, L.F., Vermulst, M., Tomazela, D.M., Emond, M.J., MacCoss, M.J., Gollahon, K., Martin, G.M., Loeb, L. A., Ladiges, W.C., et al. (2009). Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging. *Circulation* 119, 2789-2797.
- Eggan, K., Jurga, S., Gosden, R., Min, I.M., y Wagers, A. J. (2006). Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature* 441, 1109-1114.
- Finerty, J.C. (1952). Parabiosis in physiological studies. *Physiol Rev* 32, 277-302.
- Foryst-Ludwig, A., Kreissl, M.C., Sprang, C., Thalke, B., Bohm, C., Benz, V., Gurgun, D., Dragun, D., Schubert, C., Mai, K., et al. (2011). Sex differences in physiological cardiac hypertrophy are associated with exercise-mediated changes in energy substrate availability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301, H115-122.
- Gold, L., Ayers, D., Bertino, J., Bock, C., Bock, A., Brody, E.N., Carter, J., Dalby, A.B., Eaton, B.E., Fitzwater, T., et al. (2010). Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery. *PLoS One* 5, e15004.
- Hunt, S.A., Abraham, W.T., Chin, M.H., Feldman, A.M., Francis, G.S., Ganiats, T.G., Jessup, M., Konstam, M.A., Mancini, D.M., Michl, K., et al. (2009). 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation* 119, e391-479.
- Jackson, M.F., Luong, D., Vang, D.D., Garikipati, D.K., Stanton, J.B., Nelson, O.L., y Rodgers, B.D. (2012). The aging myostatin null phenotype: reducción de la adiposidad, la hipertrofia cardíaca, enhanced cardiac stress response, and sexual dimorphism. *J Endocrinol* 213, 263-275.
- Kitzman, D.W., and Daniel, K.R. (2007). Diastolic heart failure in the elderly. *Clin Geriatr Med* 23, 83-106.
- Krege, J.H., Hodgin, J.B., Hagaman, J.R., y Smithies, O. (1995). A noninvasive computerized sistema del manguito en la cola for measuring blood pressure in mice. *Hypertension* 25, 1111-1115.
- Lakatta, E.G., and Levy, D. (2003). Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Parte II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation* 107, 346-354.
- McPherron, A.C. (2010). Metabolic Functions of Myostatin and Gdf11. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem* 10, 217-231.
- McPherron, A.C., Lawler, A.M., y Lee, S.J. (1999). Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11. *Nat Genet* 22, 260-264.
- Olivetti, G., Giordano, G., Corradi, D., Melissari, M., Lagrasta, C., Gambert, S.R., y Anversa, P. (1995). Gender differences and aging: effects on the human heart. *J Am Coll Cardiol* 26, 1068-1079.
- Owan, T.E., y Redfield, M.M. (2005). Epidemiology of diastolic heart failure. *Prog Cardiovasc Dis* 47, 320-332.
- Pietramaggiore, G., Scherer, S.S., Alperovich, M., Chen, B., Orgill, D.P., y Wagers, A. J. (2009). Improved cutaneous healing in diabetic mice exposed to healthy peripheral circulation. *J Invest Dermatol* 129, 2265-2274.
- Ruckh, J.M., Zhao, J.W., Shadrach, J.L., van Wijngaarden, P., Rao, T.N., Wagers, A.J., y Franklin, R.J. (2012). Rejuvenation of regeneration in the aging central nervous system. *Cell Stem Cell* 10, 96-103.
- Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S.H., y Goldberg, A.L. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117, 399-412.
- Schocken, D.D., Benjamin, E. J., Fonarow, G.C., Krumholz, H.M., Levy, D., Mensah, G.A., Narula, J., Shor, E.S., Young, J.B., y Hong, Y. (2008). Prevention of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association Councils on Epidemiology and Prevention, Clinical Cardiology, Cardiovascular Nursing, and High

Blood Pressure Research; Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group; and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group. *Circulation* 117, 2544-2565.

Seki, K., Sanada, S., Kudinova, A. Y., Steinhauser, M.L., Handa, V., Gannon, J., y Lee, R.T. (2009). Interleukin-33 prevents apoptosis and improves survival after experimental myocardial infarction through ST2 signaling. *Circ Heart Fail* 2, 684-691.

Sherwood, R.I., Christensen, J.L., Conboy, I.M., Conboy, M.J., Rando, T.A., Weissman, I.L., y Wagers, A. J. (2004). Isolation of Adult Mouse Myogenic Progenitors; Functional Heterogeneity of Cells within and Engrafting Skeletal Muscle. *Cell* 119, 543-554.

Souza, T.A., Chen, X., Guo, Y., Sava, P., Zhang, J., Hill, J.J., Yaworsky, P.J., y Qiu, Y. (2008). Proteomic identification and functional validation of activins and bone morphogenetic protein 11 as candidate novel muscle mass regulators. *Mol Endocrinol* 22, 2689-2702.

Tsuchida, K., Nakatani, M., Uezumi, A., Murakami, T., y Cui, X. (2008). Signal transduction pathway through activin receptors as a therapeutic target of musculoskeletal diseases and cancer. *Endocr J* 55, 11-21.

Tuerk, C., and Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249, 505-510.

Villeda, S.A., Luo, J., Mosher, K.I., Zou, B., Britschgi, M., Bieri, G., Stan, T.M., Fainberg, N., Ding, Z., Eggel, A., et al. (2011). The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477, 90-94.

Wagers, A.J., Sherwood, R.I., Christensen, J.L., y Weissman, I.L. (2002). Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297, 2256-2259.

Wright, D.E., Wagers, A.J., Gulati, A. P., Johnson, F.L., y Weissman, I.L. (2001). Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* 294, 1933-1936.

Yin, F.C., Spurgeon, H.A., Rakusan, K., Weisfeldt, M.L., y Lakatta, E.G. (1982). Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol* 243, H941-947.

Yoshioka, J., Imahashi, K., Gabel, S.A., Chutkow, W.A., Burds, A.A., Gannon, J., Schulze, P.C., MacGillivray, C., Londres, R.E., Murphy, E., et al. (2007). Targeted deletion of thioredoxin-interacting protein regulates cardiac dysfunction in response to pressure overload. *Circ Res* 101, 1328-1338.

Zhou, X., Wang, J.L., Lu, J., Song, Y., Kwak, K.S., Jiao, Q., Rosenfeld, R., Chen, Q., Boone, T., Simonet, W.S., et al. (2010). Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell* 142, 531-543.

Roberts, L.D., Souza, A.L., Gerszten, R.E., and Clish, C.B. (2012). Targeted metabolomics. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 30, Unit 30 32 31-24.

Seki, K., Sanada, S., Kudinova, A. Y., Steinhauser, M.L., Handa, V., Gannon, J., y Lee, R.T. (2009). Interleukin-33 prevents apoptosis and improves survival after experimental myocardial infarction through ST2 signaling. *Circ Heart Fail* 2, 684-691.

Tabla 1: Lista de analitos séricos identificados por análisis proteómico. La tabla resume los 13 analitos que distinguen fácilmente ratones jóvenes de ratones viejos.

Analitos séricos (SOMAscan)
<i>Collectina renal 1</i>
<i>Catepsina D</i>
<i>proteína 4 relacionada con dickkopf</i>
Proteína de membrana de eritrocitos 4.1 \ Proteína 4.1R
<i>Esterasa D</i>
Factor de diferenciación de crecimiento 11 \ BMP-11
<i>Hemoglobina</i>
<i>Proteína accesoria del receptor de interleucina-1 \ IL-1 RAcP \ IL1 R3</i>
Miembro D del grupo 2 de células citolíticas naturales NKG2D
<i>Sustrato 1 de toxina botulínica C3 relacionada con Ras</i>
Proteína nuclear de unión a GTP Ran ARA24
TIMP3 Inhibidor tisular de metaloproteinasas 3
<i>Timidilato sintasa</i>

Tabla 2: Datos ecocardiográficos después de 30 días de tratamiento con rGDF11 o vehículo en ratones macho C57Bl/6 de 23 meses. No se observaron diferencias significativas en los parámetros ecocardiográficos. AWT = espesor de la pared anterior; PWT = espesor de la pared posterior; EDD = dimensión telediastólica; ESD = dimensión telesistólica; FS = acortamiento fraccional. Los datos se muestran como media ± S.E.M.

	Vehículo (n-7)	GDF11 (n-6)
AWT (mm)	1,39±0,02	1,39 ± 0,01
PWT (mm)	1,10 ± 0,02	1,09±0,04
ESD (mm)	1,25 ± 0,04	1,25 ± 0,03
EDD (mm)	2,99 ± 0,09	3,2.0±0,05
FS (%)	57,9 ± 1,6	60,9 ± 1,1

EJEMPLO 2: GDF11

Tal como se describe en el presente documento, la hipertrofia cardíaca del envejecimiento puede revertirse rápidamente en cuestión de semanas mediante la exposición a una circulación sanguínea joven. Los datos presentados anteriormente en el presente documento sugieren que existe un factor circulante que se transfiere del ratón joven al ratón viejo a través de la circulación compartida que es responsable de la regresión rápida de la hipertrofia cardíaca.

Se realizó una búsqueda imparcial de factores circulantes presentes en ratones jóvenes que podrían explicar la regresión de la hipertrofia cardíaca observada en ratones parabioticos. Se recogió suero de ratones genéticamente idénticos de los dos grupos de edad utilizados en los experimentos de parabiosis, adultos jóvenes y ratones ancianos. Usando una plataforma de proteómica basada en un aptámero (Somalogic), Se identificó un factor llamado Factor de diferenciación de crecimiento (GDF) 11 que se redujo significativamente en ratones viejos, en comparación con ratones jóvenes. Los niveles plasmáticos de GDF11 se midieron mediante ELISA en ratones Young (2 meses) y Old (23 meses). Los niveles circulantes de GDF11 fueron significativamente mayores en ratones jóvenes ($43,7 \pm 12,7$ ng/ml) en comparación con los ratones viejos ($17,4 \pm 3,9$ ng/ml) (Figura 7A). Estos resultados fueron confirmados por análisis Western en plasma de ratones jóvenes ($n = 3$) y viejos ($n = 3$). Una banda de 12,5 kDa correspondiente a la forma madura de GDF11 es claramente visible en ratones jóvenes y menos intensa en ratones viejos (5 μ l de plasma cargado en cada carril) (Figura 7B). Adicionalmente, se demostró que la exposición de un ratón viejo a una circulación joven resultó en la restauración del GDF11 circulante a niveles similares a los ratones jóvenes (datos no mostrados). A partir de estos datos, surge una asociación inversa clara entre el GDF11 circulante y la hipertrofia cardíaca. Además, La restauración de GDF11 circulante por parabiosis se asocia con una regresión en la hipertrofia cardíaca. Estos datos indican que una reducción en GDF11 con el envejecimiento puede desempeñar un papel en la hipertrofia cardíaca relacionada con la edad, y que un aumento en GDF11 puede prevenir y/o revertir esta hipertrofia.

La administración de GDF11 activo puede inducir la regresión de la hipertrofia cardíaca y mejorar la función diastólica y la insuficiencia cardíaca clínica. El GDF11, con o sin aminoácidos u otras modificaciones destinadas a reducir la degradación proteolítica y prolongar la semivida, puede usarse para tratar la hipertrofia cardíaca y la insuficiencia cardíaca diastólica, incluido el asociado con la hipertensión, envejecimiento, cardiomiopatía hipertrófica genética y enfermedad valvular. en el presente documento se describe una estrategia terapéutica para restaurar los niveles juveniles de GDF11 en pacientes con insuficiencia cardíaca diastólica de cualquier etiología.

Bibliografía:

1. D. Lloyd-Jones et al., Circulation 121, e46 (23 de febrero de 2010).
2. F. Bursi et al., JAMA 296, 2209 (8 de noviembre de 2006).
3. J. S. Gottdiener et al., Ann Intern Med 137, 631 (Oct 15, 2002).
4. M. M. Redfield et al., JAMA 289, 194 (Jan 8, 2003).
5. T. E. Owan et al., N Engl J Med 355, 251 (Jul 20, 2006).
6. S. Stewart, K. MacIntyre, D. J. Hole, S. Capewell, J. J. McMurray, Eur J Heart Fail 3, 315 (Jun, 2001).
7. S. A. Hunt et al., Circulation 119, e391 (Apr 14, 2009).
8. M. Ouzounian, D. S. Lee, P. P. Liu, Nat Clin Pract Cardiovasc Med 5, 375 (julio de 2008).
9. J. C. Finerty, Physiol Rev 32, 277 (julio de 1952).

EJEMPLO 3

El GDF11 también puede influir en los fenotipos del envejecimiento en otros tejidos. Estos efectos se han explorado en varios tejidos diferentes, incluida la piel, músculo esquelético y cerebro.

En el músculo esquelético, GDF11 puede revertir el deterioro relacionado con la edad de la integridad genómica de las células madre musculares, Función miogénica y capacidad regenerativa.

EJEMPLO 4

5 Los niveles séricos de proteína GDF11 en humanos normales se determinaron usando la tecnología apatmer descrita en el Ejemplo 1. Los niveles en seres humanos dependen del género, pero caen por encima de los 70 años tanto en hombres como en mujeres.

LISTADO DE SECUENCIAS

10	<110> THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC. EL PRESIDENTE Y LOS SIGUIENTES DE HARVARD COLLEGE
	<120> FACTOR DE DIFERENCIACIÓN DE CRECIMIENTO (GDF) PARA EL TRATAMIENTO DE LA INSUFICIENCIA CARÍACA DIASTÓLICA
15	<130> 043214-073892-PCT
	<140>
	<141>
20	<150> 61/649.962 <151> 22/05/2012
	<150> 61/612.550 <151> 19/03/2012
25	<160> 26
	<170> PatentIn versión 3.5
30	<210> 1 <211> 407 <212> PRT <213> Homo sapiens
35	<400> 1

ES 2 779 698 T3

Met	Val	Leu	Ala	Ala	Pro	Leu	Leu	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	1	5	10	15
Glu	Leu	Arg	Pro	Arg	Gly	Glu	Ala	Ala	Glu	Gly	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	20	25	30	
Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Val	Gly	Gly	Glu	Arg	Ser	35	40	45	
Ser	Arg	Pro	Ala	Pro	Ser	Val	Ala	Pro	Glu	Pro	Asp	Gly	Cys	Pro	Val	50	55	60	
Cys	Val	Trp	Arg	Gln	His	Ser	Arg	Glu	Leu	Arg	Leu	Glu	Ser	Ile	Lys	65	70	75	80
Ser	Gln	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	Arg	Leu	Lys	Glu	Ala	Pro	Asn	Ile	Ser	85	90	95	
Arg	Glu	Val	Val	Lys	Gln	Leu	Leu	Pro	Lys	Ala	Pro	Pro	Leu	Gln	Gln	100	105	110	
Ile	Leu	Asp	Leu	His	Asp	Phe	Gln	Gly	Asp	Ala	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	115	120	125	
Phe	Leu	Glu	Glu	Asp	Glu	Tyr	His	Ala	Thr	Thr	Glu	Thr	Val	Ile	Ser	130	135	140	

ES 2 779 698 T3

Met	Ala	Gln	Glu	Thr	Asp	Pro	Ala	Val	Gln	Thr	Asp	Gly	Ser	Pro	Leu	145	150	155	160
Cys	Cys	His	Phe	His	Phe	Ser	Pro	Lys	Val	Met	Phe	Thr	Lys	Val	Leu	165	170	175	
Lys	Ala	Gln	Leu	Trp	Val	Tyr	Leu	Arg	Pro	Val	Pro	Arg	Pro	Ala	Thr	180	185	190	
Val	Tyr	Leu	Gln	Ile	Leu	Arg	Leu	Lys	Pro	Leu	Thr	Gly	Glu	Gly	Thr	195	200	205	
Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Arg	Arg	His	Ile	Arg	Ile	Arg	Ser	Leu	210	215	220	
Lys	Ile	Glu	Leu	His	Ser	Arg	Ser	Gly	His	Trp	Gln	Ser	Ile	Asp	Phe	225	230	235	240
Lys	Gln	Val	Leu	His	Ser	Trp	Phe	Arg	Gln	Pro	Gln	Ser	Asn	Trp	Gly	245	250	255	
Ile	Glu	Ile	Asn	Ala	Phe	Asp	Pro	Ser	Gly	Thr	Asp	Leu	Ala	Val	Thr	260	265	270	
Ser	Leu	Gly	Pro	Gly	Ala	Glu	Gly	Leu	His	Pro	Phe	Met	Glu	Leu	Arg	275	280	285	
Val	Leu	Glu	Asn	Thr	Lys	Arg	Ser	Arg	Arg	Asn	Leu	Gly	Leu	Asp	Cys	290	295	300	
Asp	Glu	His	Ser	Ser	Glu	Ser	Arg	Cys	Cys	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Val	305	310	315	320
Asp	Phe	Glu	Ala	Phe	Gly	Trp	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys	Arg	Tyr	325	330	335	
Lys	Ala	Asn	Tyr	Cys	Ser	Gly	Gln	Cys	Glu	Tyr	Met	Phe	Met	Gln	Lys	340	345	350	
Tyr	Pro	His	Thr	His	Leu	Val	Gln	Gln	Ala	Asn	Pro	Arg	Gly	Ser	Ala	355	360	365	
Gly	Pro	Cys	Cys	Thr	Pro	Thr	Lys	Met	Ser	Pro	Ile	Asn	Met	Leu	Tyr	370	375	380	
Phe	Asn	Asp	Lys	Gln	Gln	Ile	Ile	Tyr	Gly	Lys	Ile	Pro	Gly	Met	Val				

ES 2 779 698 T3

385

390

395

400

Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
405

5

<210> 2
<211> 383
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 779 698 T3

Ala	Glu	Gly	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	1	5	10	15
Ala	Gly	Val	Gly	Gly	Glu	Arg	Ser	Ser	Arg	Pro	Ala	Pro	Ser	Val	Ala		20	25	30	
Pro	Glu	Pro	Asp	Gly	Cys	Pro	Val	Cys	Val	Trp	Arg	Gln	His	Ser	Arg		35	40	45	
Glu	Leu	Arg	Leu	Glu	Ser	Ile	Lys	Ser	Gln	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	Arg		50	55	60	
Leu	Lys	Glu	Ala	Pro	Asn	Ile	Ser	Arg	Glu	Val	Val	Lys	Gln	Leu	Leu		65	70	75	80
Pro	Lys	Ala	Pro	Pro	Leu	Gln	Gln	Ile	Leu	Asp	Leu	His	Asp	Phe	Gln		85	90	95	
Gly	Asp	Ala	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Leu	Glu	Glu	Asp	Glu	Tyr	His		100	105	110	
Ala	Thr	Thr	Glu	Thr	Val	Ile	Ser	Met	Ala	Gln	Glu	Thr	Asp	Pro	Ala		115	120	125	
Val	Gln	Thr	Asp	Gly	Ser	Pro	Leu	Cys	Cys	His	Phe	His	Phe	Ser	Pro		130	135	140	
Lys	Val	Met	Phe	Thr	Lys	Val	Leu	Lys	Ala	Gln	Leu	Trp	Val	Tyr	Leu		145	150	155	160
Arg	Pro	Val	Pro	Arg	Pro	Ala	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Ile	Leu	Arg	Leu		165	170	175	
Lys	Pro	Leu	Thr	Gly	Glu	Gly	Thr	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Arg		180	185	190	
Arg	His	Ile	Arg	Ile	Arg	Ser	Leu	Lys	Ile	Glu	Leu	His	Ser	Arg	Ser		195	200	205	

ES 2 779 698 T3

Gly His Trp Gln Ser Ile Asp Phe Lys Gln Val Leu His Ser Trp Phe
210 215 220

Arg Gln Pro Gln Ser Asn Trp Gly Ile Glu Ile Asn Ala Phe Asp Pro
225 230 235 240

Ser Gly Thr Asp Leu Ala Val Thr Ser Leu Gly Pro Gly Ala Glu Gly
245 250 255

Leu His Pro Phe Met Glu Leu Arg Val Leu Glu Asn Thr Lys Arg Ser
260 265 270

Arg Arg Asn Leu Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Ser Glu Ser Arg
275 280 285

Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp
290 295 300

Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Gln
305 310 315 320

Cys Glu Tyr Met Phe Met Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Gln
325 330 335

Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys
340 345 350

Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile
355 360 365

Tyr Gly Lys Ile Pro Gly Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
370 375 380

<210> 3

<211> 4260

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

ES 2 779 698 T3

tccccgcccc ccagtcctcc ctccccctccc ctccagcatg gtgctcgcgg ccccgctgct	60
gctgggcttc ctgctcctcg ccctggagct gcggccccgg ggggaggcgg ccgagggccc	120
cgcggcggcg gcggcggcgg cggcggcggc ggcagcggcg ggggtcgggg gggagcgctc	180
cagccggcca gccccgtccg tggcgcccg gcccgaacggc tgccccgtgt gcgtttggcg	240
gcagcacagc cgcgagctgc gcctagagag catcaagtcg cagatcttga gcaaactgcg	300
gctcaaggag gcgccaaca tcagccgcga ggtggtgaag cagctgctgc ccaaggcgcc	360

gccgctgcag	cagatcctgg	acctacacga	cttcacagggc	gacgcgctgc	agcccagagga	420
cttcctggag	gaggacgagt	accacgccac	caccgagacc	gtcattagca	tggcccagga	480
gacggaccca	gcagtacaga	cagatggcag	ccctctctgc	tgccattttc	acttcagccc	540
caaggtgatg	ttcacaaagg	tactgaaggc	ccagctgtgg	gtgtacctac	ggcctgtacc	600
ccgcccagcc	acagtctacc	tgcagatctt	gcgactaaaa	cccctaactg	gggaagggac	660
cgcaggggga	gggggcggag	gccggcgtca	catccgtatc	cgctcactga	agattgagct	720
gcactcacgc	tcaggccatt	ggcagagcat	cgacttcaag	caagtgtctac	acagctgggt	780
ccgccagcca	cagagcaact	ggggcatcga	gatcaacgcc	tttgatccca	gtggcacaga	840
cctggctgtc	acctccctgg	ggccgggagc	cgaggggctg	catccattca	tggagcttcg	900
agtcctagag	aacacaaaac	gttcccggcg	gaacctgggt	ctggactgcg	acgagcactc	960
aagcgagtcc	cgctgctgcc	gatatccctc	cacagtggac	tttgaggctt	tcggctggga	1020
ctggatcatc	gcacctaaag	gctacaaggc	caactactgc	tccggccagt	gcgagtacat	1080
gttcatgcaa	aaatatccgc	ataccatttt	ggtgcagcag	gccaatccaa	gaggctctgc	1140
tggggccctgt	tgtaccccc	ccaagatgtc	cccaatcaac	atgctctact	tcaatgacaa	1200
gcagcagatt	atctacggca	agatccctgg	catggtgggtg	gatcgctgtg	gctgctctta	1260
aggtggggga	tagaggatgc	ctccccaca	gacctaccc	caagaccctc	agccctgccc	1320
ccatcccccc	aagccctaga	gctccctcca	ctcttcccgc	gaacatcaca	ccgttccccg	1380
accaagccgt	gtgcaataca	acagagggag	gcaggtggga	attgaggggtg	aggggtttgg	1440
gggaaagggg	aagcaggggc	atagtcaggg	tggggagtg	ttgaagtttg	cagatgagaa	1500
ggtttgacaa	aaagacagag	agatgtagag	acagtgatag	agacagagga	acaaaaagag	1560
cagcagttag	aaggcaaaag	gagaggcaga	agagacagac	gaggcagaga	caaaacactg	1620
agaaagagac	tgaatatggag	taataaatga	aagccccaca	ccaagcctcc	tttcttccac	1680
tggcaaggtg	aggggcttgg	tatagtttgg	ggagatcccc	tgactattca	gtaggagaag	1740
aaatcaaaaa	tccattcttt	tctccttctc	tccctccaac	agtggccagg	ggaaggggaa	1800
gtgagggcag	gggcaaaaag	atgtgggaat	ttttatttat	ttatttattg	tgacttttca	1860
tttttttgg	atgtggcttt	actggaatag	gagggccccc	gcccactgtg	ccccgtttat	1920
cccttattcc	ccaaaccctg	ctctcccca	cacctactca	cttaagcact	tgtataaagc	1980
ctccaggggt	gggaatggga	gtaaagggca	agagggcgga	cacatgaagt	ttagtttcta	2040
acccatcatc	accctaactc	aaccttttct	gagccaaatg	gcttgaattg	aagccagttg	2100
tcatggaaat	agtaagaggt	tagggtttaa	gagctgggga	tgcggggggtg	ggagagagaa	2160
ccctcaacat	ccaggatcta	tataatgaga	gctactttta	accctcaggt	ccaccctcat	2220

gatgctgagt	tatttagcca	gaggggtgcag	cctgcttatg	cccaaattcc	ctcagccaag	2280
agagagacca	aagagcctct	ggaatggccc	tgctcccagc	ctctatcttc	aggtcaatta	2340
gagagagtat	agagacccca	gagtcccctg	ggtctggaaa	gcgttaggag	aggtcaagaa	2400
aggagcagta	aggaggctga	aggttacagg	gcatttgaat	ccaaatcact	gctctgggct	2460
agggaataga	gccagcagac	caaggtggga	aggattctgg	aagggggaca	ttttagtctc	2520
ctaaccctcaa	agctcagggt	ggaagagggg	agaacaagga	agcagagtgt	ataattattt	2580
tttcctttta	tttttggaat	ctaacagtac	ctggcagcag	ggaggggaaa	gtacagtggg	2640
gaaaagcatc	tgacaaggcc	agttagaaca	gaggatggga	aggatggaga	ctcccgggct	2700
tggaaggcta	ggaagcaggc	agagactggg	tgccatttca	agtcactagc	taggcccatt	2760
cattcctccc	acaaccctga	cccattctcc	tctggactca	ctgtgcctca	gtttcttccc	2820
ctcaatggaa	tgagaaatga	cagcaccgcg	cacagccaag	agatgaattc	tgagcactta	2880
ccacgggcac	tttatggaca	taaaatacct	ctcgctgtgg	gacagataac	cagggcacca	2940
gagtagtggt	gaagagatgt	gaggcttaag	aggagtcaca	ggcttcagag	tacaagttcc	3000
cctctgcctc	ccagctggac	agtgcctaga	agccaaggag	ttgagaatct	cctgatccac	3060
accctatcct	tacttcacca	ccaggcctct	tggctccagg	caagagctta	gaggatgtca	3120
ggagaggtgg	gggtaagaat	cttcagcaaa	actgtcactc	taagtagagc	cagcagttac	3180
gggtctgata	aaaacagtac	tgaactaaag	taaagcccaa	gctggtgagc	aaaactggat	3240
ggctcattct	tcccaagagc	atgactctcc	cccttggcca	gttggtggaa	ggggcaaagg	3300
tatgtgacca	cccttgagaa	ggtgatgttg	gtgagcttta	acatcttatt	cctattctta	3360
tagtgagaaa	gtgaaacaag	atctttcagt	agaggaatgg	gcagggctgt	taggctcttc	3420
agcttgccct	cacccatata	gcagctatgc	taaccccaag	cctctctggc	cctgttcttc	3480
atccttcctt	ctgccccaat	cctgaaggac	aagacacacc	cggccatcaa	caccactcac	3540
atttccttgg	tggaaggaaa	ggaacagaga	agtgaagaac	agatacctcc	ctccaaggtc	3600
aaatgcctcg	tgatcttggc	agagtaggga	ttgggcaata	agcatcaggt	atcttccttc	3660
tacagattct	agagagctgg	ggcattaaat	atgggggaca	cttagaatac	agctccttaa	3720
ataccaccaa	ataaagacct	ttgtgtgtgt	gtgggtgggtg	gggggggggc	aggggtcttt	3780
ctcttatgaa	cataaatctg	tgagctgaag	tctcattccc	ctgttcctcc	ctacccccaa	3840
agaggcacag	agtgaaggga	cttggggggc	acagctcagc	aaccagtggt	gagttagcac	3900
cccctcccac	cttatgatgt	gtgtggacct	ggccagtgcc	cctctgaaca	tatcattatt	3960
agtgtaat	tcatcttttt	tgtgtatttg	tcacattgtg	tgcatgacag	cctttgttaa	4020
gggtgtctga	ggagtatgga	gctgacaggg	gcattggaat	gccaggaaag	aacttcttca	4080
actgagatca	aggcttcctg	gaggggaacca	ctgcaaaaag	gccatcaggc	agttttcaag	4140

ES 2 779 698 T3

ttatgtgaca gagggcaaag acggccatag ggtgctctga gttttgggat ggtcacatga 4200

cacaatccag cacttgaacc tgaaaaaaaa aataaaagcg gtcaaagagt ttagaattca 4260

<210> 4

<211> 247

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Arg Gly Asn Leu Ala Leu Val Gly Val Leu Ile Ser Leu Ala Phe
1 5 10 15

Leu Ser Leu Leu Pro Ser Gly His Pro Gln Pro Ala Gly Asp Asp Ala
20 25 30

Cys Ser Val Gln Ile Leu Val Pro Gly Leu Lys Gly Asp Met Gly Asp
35 40 45

Lys Gly Gln Lys Gly Ser Val Gly Arg His Gly Lys Ile Gly Pro Ile
50 55 60

Gly Ser Lys Gly Glu Lys Gly Asp Ser Gly Asp Ile Gly Pro Pro Gly
65 70 75 80

Pro Asn Gly Glu Pro Gly Leu Pro Cys Glu Cys Ser Gln Leu Arg Lys
85 90 95

Ala Ile Gly Glu Met Asp Asn Gln Val Ser Gln Leu Thr Ser Glu Leu
100 105 110

Lys Phe Ile Lys Asn Ala Val Ala Gly Val Arg Glu Thr Glu Ser Lys
115 120 125

Ile Tyr Leu Leu Val Lys Glu Glu Lys Arg Tyr Ala Asp Ala Gln Leu
130 135 140

Ser Cys Gln Gly Arg Gly Gly Thr Leu Ser Met Pro Lys Asp Glu Ala
145 150 155 160

Ala Asn Gly Leu Met Ala Ala Tyr Leu Ala Gln Ala Gly Leu Ala Arg
165 170 175

Val Phe Ile Gly Ile Asn Asp Leu Glu Lys Glu Gly Ala Phe Val Tyr
180 185 190

Ser Asp His Ser Pro Met Arg Thr Phe Asn Lys Trp Arg Ser Gly Glu
195 200 205

ES 2 779 698 T3

Pro Asn Asn Ala Tyr Asp Glu Glu Asp Cys Val Glu Met Val Ala Ser
210 215 220

Gly Gly Trp Asn Asp Val Ala Cys His Thr Thr Met Tyr Phe Met Cys
225 230 235 240

Glu Phe Asp Lys Glu Asn Met
245

5
<210> 5
<211> 412
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

ES 2 779 698 T3

```

Met Gln Pro Ser Ser Leu Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Leu Ala Ala
1          5          10          15

Pro Ala Ser Ala Leu Val Arg Ile Pro Leu His Lys Phe Thr Ser Ile
          20          25          30

Arg Arg Thr Met Ser Glu Val Gly Gly Ser Val Glu Asp Leu Ile Ala
          35          40          45

Lys Gly Pro Val Ser Lys Tyr Ser Gln Ala Val Pro Ala Val Thr Glu
          50          55          60

Gly Pro Ile Pro Glu Val Leu Lys Asn Tyr Met Asp Ala Gln Tyr Tyr
65          70          75          80

Gly Glu Ile Gly Ile Gly Thr Pro Pro Gln Cys Phe Thr Val Val Phe
          85          90          95

Asp Thr Gly Ser Ser Asn Leu Trp Val Pro Ser Ile His Cys Lys Leu
          100          105          110

Leu Asp Ile Ala Cys Trp Ile His His Lys Tyr Asn Ser Asp Lys Ser
          115          120          125

Ser Thr Tyr Val Lys Asn Gly Thr Ser Phe Asp Ile His Tyr Gly Ser
          130          135          140

Gly Ser Leu Ser Gly Tyr Leu Ser Gln Asp Thr Val Ser Val Pro Cys
145          150          155          160

Gln Ser Ala Ser Ser Ala Ser Ala Leu Gly Gly Val Lys Val Glu Arg
          165          170          175

```

ES 2 779 698 T3

Gln Val Phe Gly Glu Ala Thr Lys Gln Pro Gly Ile Thr Phe Ile Ala
 180 185 190
 Ala Lys Phe Asp Gly Ile Leu Gly Met Ala Tyr Pro Arg Ile Ser Val
 195 200 205
 Asn Asn Val Leu Pro Val Phe Asp Asn Leu Met Gln Gln Lys Leu Val
 210 215 220
 Asp Gln Asn Ile Phe Ser Phe Tyr Leu Ser Arg Asp Pro Asp Ala Gln
 225 230 235 240
 Pro Gly Gly Glu Leu Met Leu Gly Gly Thr Asp Ser Lys Tyr Tyr Lys
 245 250 255
 Gly Ser Leu Ser Tyr Leu Asn Val Thr Arg Lys Ala Tyr Trp Gln Val
 260 265 270
 His Leu Asp Gln Val Glu Val Ala Ser Gly Leu Thr Leu Cys Lys Glu
 275 280 285
 Gly Cys Glu Ala Ile Val Asp Thr Gly Thr Ser Leu Met Val Gly Pro
 290 295 300
 Val Asp Glu Val Arg Glu Leu Gln Lys Ala Ile Gly Ala Val Pro Leu
 305 310 315 320
 Ile Gln Gly Glu Tyr Met Ile Pro Cys Glu Lys Val Ser Thr Leu Pro
 325 330 335
 Ala Ile Thr Leu Lys Leu Gly Gly Lys Gly Tyr Lys Leu Ser Pro Glu
 340 345 350
 Asp Tyr Thr Leu Lys Val Ser Gln Ala Gly Lys Thr Leu Cys Leu Ser
 355 360 365
 Gly Phe Met Gly Met Asp Ile Pro Pro Pro Ser Gly Pro Leu Trp Ile
 370 375 380
 Leu Gly Asp Val Phe Ile Gly Arg Tyr Tyr Thr Val Phe Asp Arg Asp
 385 390 395 400
 Asn Asn Arg Val Gly Phe Ala Glu Ala Ala Arg Leu
 405 410

<210> 6
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 779 698 T3

<400> 6

```

Met Val Ala Ala Val Leu Leu Gly Leu Ser Trp Leu Cys Ser Pro Leu
1          5          10          15

Gly Ala Leu Val Leu Asp Phe Asn Asn Ile Arg Ser Ser Ala Asp Leu
20          25          30

His Gly Ala Arg Lys Gly Ser Gln Cys Leu Ser Asp Thr Asp Cys Asn
35          40          45

Thr Arg Lys Phe Cys Leu Gln Pro Arg Asp Glu Lys Pro Phe Cys Ala
50          55          60

Thr Cys Arg Gly Leu Arg Arg Arg Cys Gln Arg Asp Ala Met Cys Cys
65          70          75          80

Pro Gly Thr Leu Cys Val Asn Asp Val Cys Thr Thr Met Glu Asp Ala
85          90          95

Thr Pro Ile Leu Glu Arg Gln Leu Asp Glu Gln Asp Gly Thr His Ala
100         105         110

Glu Gly Thr Thr Gly His Pro Val Gln Glu Asn Gln Pro Lys Arg Lys
115         120         125

Pro Ser Ile Lys Lys Ser Gln Gly Arg Lys Gly Gln Glu Gly Glu Ser
130         135         140

Cys Leu Arg Thr Phe Asp Cys Gly Pro Gly Leu Cys Cys Ala Arg His
145         150         155         160

Phe Trp Thr Lys Ile Cys Lys Pro Val Leu Leu Glu Gly Gln Val Cys
165         170         175

Ser Arg Arg Gly His Lys Asp Thr Ala Gln Ala Pro Glu Ile Phe Gln
180         185         190

Arg Cys Asp Cys Gly Pro Gly Leu Leu Cys Arg Ser Gln Leu Thr Ser
195         200         205

Asn Arg Gln His Ala Arg Leu Arg Val Cys Gln Lys Ile Glu Lys Leu
210         215         220

```

5

<210> 7

<211> 864

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

ES 2 779 698 T3

<400> 7

Met Thr Thr Glu Lys Ser Leu Val Thr Glu Ala Glu Asn Ser Gln His
1 5 10 15

Gln Gln Lys Glu Glu Gly Glu Glu Ala Ile Asn Ser Gly Gln Gln Glu
20 25 30

Pro Gln Gln Glu Glu Ser Cys Gln Thr Ala Ala Glu Gly Asp Asn Trp
35 40 45

Cys Glu Gln Lys Leu Lys Ala Ser Asn Gly Asp Thr Pro Thr His Glu
50 55 60

Asp Leu Thr Lys Asn Lys Glu Arg Thr Ser Glu Ser Arg Gly Leu Ser
65 70 75 80

Arg Leu Phe Ser Ser Phe Leu Lys Arg Pro Lys Ser Gln Val Ser Glu
85 90 95

Glu Glu Gly Lys Glu Val Glu Ser Asp Lys Glu Lys Gly Glu Gly Gly
100 105 110

Gln Lys Glu Ile Glu Phe Gly Thr Ser Leu Asp Glu Glu Ile Ile Leu
115 120 125

Lys Ala Pro Ile Ala Ala Pro Glu Pro Glu Leu Lys Thr Asp Pro Ser
130 135 140

Leu Asp Leu His Ser Leu Ser Ser Ala Glu Thr Gln Pro Ala Gln Glu
145 150 155 160

Glu Leu Arg Glu Asp Pro Asp Phe Glu Ile Lys Glu Gly Glu Gly Leu
165 170 175

Glu Glu Cys Ser Lys Ile Glu Val Lys Glu Glu Ser Pro Gln Ser Lys
180 185 190

Ala Glu Thr Glu Leu Lys Ala Ser Gln Lys Pro Ile Arg Lys His Arg
195 200 205

Asn Met His Cys Lys Val Ser Leu Leu Asp Asp Thr Val Tyr Glu Cys
210 215 220

Val Val Glu Lys His Ala Lys Gly Gln Asp Leu Leu Lys Arg Val Cys
225 230 235 240

Glu His Leu Asn Leu Leu Glu Glu Asp Tyr Phe Gly Leu Ala Ile Trp

ES 2 779 698 T3

245										250					255				
Asp	Asn	Ala	Thr	Ser	Lys	Thr	Trp	Leu	Asp	Ser	Ala	Lys	Glu	Ile	Lys				
			260					265					270						
Lys	Gln	Val	Arg	Gly	Val	Pro	Trp	Asn	Phe	Thr	Phe	Asn	Val	Lys	Phe				
		275					280					285							
Tyr	Pro	Pro	Asp	Pro	Ala	Gln	Leu	Thr	Glu	Asp	Ile	Thr	Arg	Tyr	Tyr				
	290					295					300								
Leu	Cys	Leu	Gln	Leu	Arg	Gln	Asp	Ile	Val	Ala	Gly	Arg	Leu	Pro	Cys				
305					310					315					320				
Ser	Phe	Ala	Thr	Leu	Ala	Leu	Leu	Gly	Ser	Tyr	Thr	Ile	Gln	Ser	Glu				
				325					330					335					
Leu	Gly	Asp	Tyr	Asp	Pro	Glu	Leu	His	Gly	Val	Asp	Tyr	Val	Ser	Asp				
			340					345					350						
Phe	Lys	Leu	Ala	Pro	Asn	Gln	Thr	Lys	Glu	Leu	Glu	Glu	Lys	Val	Met				
		355					360					365							
Glu	Leu	His	Lys	Ser	Tyr	Arg	Ser	Met	Thr	Pro	Ala	Gln	Ala	Asp	Leu				
	370					375					380								
Glu	Phe	Leu	Glu	Asn	Ala	Lys	Lys	Leu	Ser	Met	Tyr	Gly	Val	Asp	Leu				
385					390				395						400				
His	Lys	Ala	Lys	Asp	Leu	Glu	Gly	Val	Asp	Ile	Ile	Leu	Gly	Val	Cys				
				405					410					415					
Ser	Ser	Gly	Leu	Leu	Val	Tyr	Lys	Asp	Lys	Leu	Arg	Ile	Asn	Arg	Phe				
			420					425					430						
Pro	Trp	Pro	Lys	Val	Leu	Lys	Ile	Ser	Tyr	Lys	Arg	Ser	Ser	Phe	Phe				
		435					440					445							
Ile	Lys	Ile	Arg	Pro	Gly	Glu	Gln	Glu	Gln	Tyr	Glu	Ser	Thr	Ile	Gly				
	450					455					460								
Phe	Lys	Leu	Pro	Ser	Tyr	Arg	Ala	Ala	Lys	Lys	Leu	Trp	Lys	Val	Cys				
465					470					475					480				
Val	Glu	His	His	Thr	Phe	Phe	Arg	Leu	Thr	Ser	Thr	Asp	Thr	Ile	Pro				
				485					490					495					

ES 2 779 698 T3

Lys Ser Lys Phe Leu Ala Leu Gly Ser Lys Phe Arg Tyr Ser Gly Arg
 500 505 510
 Thr Gln Ala Gln Thr Arg Gln Ala Ser Ala Leu Ile Asp Arg Pro Ala
 515 520 525
 Pro His Phe Glu Arg Thr Ala Ser Lys Arg Ala Ser Arg Ser Leu Asp
 530 535 540
 Gly Ala Ala Ala Val Asp Ser Ala Asp Arg Ser Pro Arg Pro Thr Ser
 545 550 555 560
 Ala Pro Ala Ile Thr Gln Gly Gln Val Ala Glu Gly Gly Val Leu Asp
 565 570 575
 Ala Ser Ala Lys Lys Thr Val Val Pro Lys Ala Gln Lys Glu Thr Val
 580 585 590
 Lys Ala Glu Val Lys Lys Glu Asp Glu Pro Pro Glu Gln Ala Glu Pro
 595 600 605
 Glu Pro Thr Glu Ala Trp Lys Val Glu Lys Thr His Ile Glu Val Thr
 610 615 620
 Val Pro Thr Ser Asn Gly Asp Gln Thr Gln Lys Leu Ala Glu Lys Thr
 625 630 635 640
 Glu Asp Leu Ile Arg Met Arg Lys Lys Lys Arg Glu Arg Leu Asp Gly
 645 650 655
 Glu Asn Ile Tyr Ile Arg His Ser Asn Leu Met Leu Glu Asp Leu Asp
 660 665 670
 Lys Ser Gln Glu Glu Ile Lys Lys His His Ala Ser Ile Ser Glu Leu
 675 680 685
 Lys Lys Asn Phe Met Glu Ser Val Pro Glu Pro Arg Pro Ser Glu Trp
 690 695 700
 Asp Lys Arg Leu Ser Thr His Ser Pro Phe Arg Thr Leu Asn Ile Asn
 705 710 715 720
 Gly Gln Ile Pro Thr Gly Glu Gly Pro Pro Leu Val Lys Thr Gln Thr
 725 730 735
 Val Thr Ile Ser Asp Asn Ala Asn Ala Val Lys Ser Glu Ile Pro Thr
 740 745 750

ES 2 779 698 T3

Lys Asp Val Pro Ile Val His Thr Glu Thr Lys Thr Ile Thr Tyr Glu
755 760 765

Ala Ala Gln Thr Asp Asp Asn Ser Gly Asp Leu Asp Pro Gly Val Leu
770 775 780

Leu Thr Ala Gln Thr Ile Thr Ser Glu Thr Pro Ser Ser Thr Thr Thr
785 790 795 800

Thr Gln Ile Thr Lys Thr Val Lys Gly Gly Ile Ser Glu Thr Arg Ile
805 810 815

Glu Lys Arg Ile Val Ile Thr Gly Asp Ala Asp Ile Asp His Asp Gln
820 825 830

Val Leu Val Gln Ala Ile Lys Glu Ala Lys Glu Gln His Pro Asp Met
835 840 845

Ser Val Thr Lys Val Val Val His Gln Glu Thr Glu Ile Ala Asp Glu
850 855 860

<210> 8
<211> 282
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Ala Leu Lys Gln Ile Ser Ser Asn Lys Cys Phe Gly Gly Leu Gln
1 5 10 15

Lys Val Phe Glu His Asp Ser Val Glu Leu Asn Cys Lys Met Lys Phe
20 25 30

Ala Val Tyr Leu Pro Pro Lys Ala Glu Thr Gly Lys Cys Pro Ala Leu
35 40 45

Tyr Trp Leu Ser Gly Leu Thr Cys Thr Glu Gln Asn Phe Ile Ser Lys
50 55 60

Ser Gly Tyr His Gln Ser Ala Ser Glu His Gly Leu Val Val Ile Ala
65 70 75 80

Pro Asp Thr Ser Pro Arg Gly Cys Asn Ile Lys Gly Glu Asp Glu Ser
85 90 95

Trp Asp Phe Gly Thr Gly Ala Gly Phe Tyr Val Asp Ala Thr Glu Asp
100 105 110

5

10

ES 2 779 698 T3

Pro Trp Lys Thr Asn Tyr Arg Met Tyr Ser Tyr Val Thr Glu Glu Leu
115 120 125

Pro Gln Leu Ile Asn Ala Asn Phe Pro Val Asp Pro Gln Arg Met Ser
130 135 140

Ile Phe Gly His Ser Met Gly Gly His Gly Ala Leu Ile Cys Ala Leu
145 150 155 160

Lys Asn Pro Gly Lys Tyr Lys Ser Val Ser Ala Phe Ala Pro Ile Cys
165 170 175

Asn Pro Val Leu Cys Pro Trp Gly Lys Lys Ala Phe Ser Gly Tyr Leu
180 185 190

Gly Thr Asp Gln Ser Lys Trp Lys Ala Tyr Asp Ala Thr His Leu Val
195 200 205

Lys Ser Tyr Pro Gly Ser Gln Leu Asp Ile Leu Ile Asp Gln Gly Lys
210 215 220

Asp Asp Gln Phe Leu Leu Asp Gly Gln Leu Leu Pro Asp Asn Phe Ile
225 230 235 240

Ala Ala Cys Thr Glu Lys Lys Ile Pro Val Val Phe Arg Leu Gln Glu
245 250 255

Gly Tyr Asp His Ser Tyr Tyr Phe Ile Ala Thr Phe Ile Thr Asp His
260 265 270

Ile Arg His His Ala Lys Tyr Leu Asn Ala
275 280

<210> 9
<211> 147
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

ES 2 779 698 T3

Met Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Ser Ala Val Thr Ala Leu Trp
1 5 10 15

Gly Lys Val Asn Val Asp Glu Val Gly Gly Glu Ala Leu Gly Arg Leu
20 25 30

Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Glu Ser Phe Gly Asp
35 40 45

Leu Ser Thr Pro Asp Ala Val Met Gly Asn Pro Lys Val Lys Ala His

50

55

60

Gly Lys Lys Val Leu Gly Ala Phe Ser Asp Gly Leu Ala His Leu Asp
65 70 75 80

Asn Leu Lys Gly Thr Phe Ala Thr Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys
85 90 95

Leu His Val Asp Pro Glu Asn Phe Arg Leu Leu Gly Asn Val Leu Val
100 105 110

Cys Val Leu Ala His His Phe Gly Lys Glu Phe Thr Pro Pro Val Gln
115 120 125

Ala Ala Tyr Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Asn Ala Leu Ala His
130 135 140

Lys Tyr His
145

5 <210> 10
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 10
tcgtcttggc ctttggct 19

15 <210> 11
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

25 <400> 11
tccaggtggt ctagcaggtt ct 22

<210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

 10 <400> 12
 agggagaaca cggcatcatt 20

 <210> 13
 <211> 19
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 20
 <400> 13
 gacagcacct tcaggagat 19

 <210> 14
 <211> 109
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 14
 30

 Asn Leu Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Ser Glu Ser Arg Cys Cys
 1 5 10 15

 Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile
 20 25 30

 Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys Glu
 35 40 45

 Tyr Met Phe Met Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Gln Gln Ala
 50 55 60

 Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser
 65 70 75 80

 Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly
 85 90 95

 Lys Ile Pro Gly Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
 100 105

 <210> 15
 <211> 274
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 15

ES 2 779 698 T3

Ala Glu Gly Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

Ala Gly Val Gly Gly Glu Arg Ser Ser Arg Pro Ala Pro Ser Val Ala
20 25 30

ES 2 779 698 T3

Pro Glu Pro Asp Gly Cys Pro Val Cys Val Trp Arg Gln His Ser Arg
 35 40 45
 Glu Leu Arg Leu Glu Ser Ile Lys Ser Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg
 50 55 60
 Leu Lys Glu Ala Pro Asn Ile Ser Arg Glu Val Val Lys Gln Leu Leu
 65 70 75 80
 Pro Lys Ala Pro Pro Leu Gln Gln Ile Leu Asp Leu His Asp Phe Gln
 85 90 95
 Gly Asp Ala Leu Gln Pro Glu Asp Phe Leu Glu Glu Asp Glu Tyr His
 100 105 110
 Ala Thr Thr Glu Thr Val Ile Ser Met Ala Gln Glu Thr Asp Pro Ala
 115 120 125
 Val Gln Thr Asp Gly Ser Pro Leu Cys Cys His Phe His Phe Ser Pro
 130 135 140
 Lys Val Met Phe Thr Lys Val Leu Lys Ala Gln Leu Trp Val Tyr Leu
 145 150 155 160
 Arg Pro Val Pro Arg Pro Ala Thr Val Tyr Leu Gln Ile Leu Arg Leu
 165 170 175
 Lys Pro Leu Thr Gly Glu Gly Thr Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg
 180 185 190
 Arg His Ile Arg Ile Arg Ser Leu Lys Ile Glu Leu His Ser Arg Ser
 195 200 205
 Gly His Trp Gln Ser Ile Asp Phe Lys Gln Val Leu His Ser Trp Phe
 210 215 220
 Arg Gln Pro Gln Ser Asn Trp Gly Ile Glu Ile Asn Ala Phe Asp Pro
 225 230 235 240
 Ser Gly Thr Asp Leu Ala Val Thr Ser Leu Gly Pro Gly Ala Glu Gly
 245 250 255
 Leu His Pro Phe Met Glu Leu Arg Val Leu Glu Asn Thr Lys Arg Ser
 260 265 270
 Arg Arg

<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 16
tggaacaacc cggtaaagag t 21

10 <210> 17
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

20 <400> 17
caccaggggc ataagagca g 21

<210> 18
<211> 337
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens

<400> 18

Cys	Asn	Ala	Cys	Thr	Trp	Arg	Gln	Asn	Thr	Lys	Ser	Ser	Arg	Ile	Glu
1				5					10					15	

Ala	Ile	Lys	Ile	Gln	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	Arg	Leu	Glu	Thr	Ala	Pro
			20					25					30		

Asn	Ile	Ser	Lys	Asp	Val	Ile	Arg	Gln	Leu	Leu	Pro	Lys	Ala	Pro	Pro
		35					40					45			

Leu	Arg	Glu	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Asp	Val	Gln	Arg	Asp	Asp	Ser	Ser
	50					55					60				

Asp	Gly	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Tyr	His	Ala	Thr	Thr	Glu	Thr	Ile
65					70					75					80

Ile	Thr	Met	Pro	Thr	Glu	Ser	Asp	Phe	Leu	Met	Gln	Val	Asp	Gly	Lys
				85					90					95	

Pro	Lys	Cys	Cys	Phe	Phe	Lys	Phe	Ser	Ser	Lys	Ile	Gln	Tyr	Asn	Lys
			100					105					110		

Val	Val	Lys	Ala	Gln	Leu	Trp	Ile	Tyr	Leu	Arg	Pro	Val	Glu	Thr	Pro
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

30

ES 2 779 698 T3

115	120	125
Thr Thr Val Phe Val Gln Ile Leu Arg Leu Ile Lys Pro Met Lys Asp 130 135 140		
Gly Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Arg Ser Leu Lys Leu Asp Met Asn Pro 145 150 155 160		
Gly Thr Gly Ile Trp Gln Ser Ile Asp Val Lys Thr Val Leu Gln Asn 165 170 175		
Trp Leu Lys Gln Pro Glu Ser Asn Leu Gly Ile Glu Ile Lys Ala Leu 180 185 190		
Asp Glu Asn Gly His Asp Leu Ala Val Thr Phe Pro Gly Pro Gly Glu 195 200 205		
Asp Gly Leu Asn Pro Phe Leu Glu Val Lys Val Thr Asp Thr Pro Lys 210 215 220		
Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu 225 230 235 240		
Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly 245 250 255		
Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser 260 265 270		
Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu 275 280 285		
Val His Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro 290 295 300		
Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln 305 310 315 320		
Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys 325 330 335		
Ser		

<210> 19
 <211> 361
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

 <400> 19

ES 2 779 698 T3

Arg Ser Ser Arg Pro Ala Pro Ser Ala Pro Pro Glu Pro Asp Gly Cys
 1 5 10 15
 Pro Val Cys Val Trp Arg Gln His Ser Arg Glu Leu Arg Leu Glu Ser
 20 25 30
 Ile Lys Ser Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Lys Glu Ala Pro Asn
 35 40 45
 Ile Ser Arg Glu Val Val Lys Gln Leu Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu
 50 55 60
 Gln Gln Ile Leu Asp Leu His Asp Phe Gln Gly Asp Ala Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Leu Glu Glu Asp Glu Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr Val
 85 90 95
 Ile Ser Met Ala Gln Glu Thr Asp Pro Ala Val Gln Thr Asp Gly Ser
 100 105 110
 Pro Leu Cys Cys His Phe His Phe Ser Pro Lys Val Met Phe Thr Lys
 115 120 125
 Val Leu Lys Ala Gln Leu Trp Val Tyr Leu Arg Pro Val Pro Arg Pro
 130 135 140
 Ala Thr Val Tyr Leu Gln Ile Leu Arg Leu Lys Pro Leu Thr Gly Glu
 145 150 155 160
 Gly Thr Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Arg His Ile Arg Ile Arg
 165 170 175
 Ser Leu Lys Ile Glu Leu His Ser Arg Ser Gly His Trp Gln Ser Ile
 180 185 190
 Asp Phe Lys Gln Val Leu His Ser Trp Phe Arg Gln Pro Gln Ser Asn
 195 200 205
 Trp Gly Ile Glu Ile Asn Ala Phe Asp Pro Ser Gly Thr Asp Leu Ala
 210 215 220
 Val Thr Ser Leu Gly Pro Gly Ala Glu Gly Leu His Pro Phe Met Glu
 225 230 235 240
 Leu Arg Val Leu Glu Asn Thr Lys Arg Ser Arg Arg Asn Leu Gly Leu

ES 2 779 698 T3

				245					250					255		
Asp	Cys	Asp	Glu 260	His	Ser	Ser	Glu	Ser 265	Arg	Cys	Cys	Arg	Tyr 270	Pro	Leu	
Thr	Val	Asp 275	Phe	Glu	Ala	Phe	Gly 280	Trp	Asp	Trp	Ile	Ile 285	Ala	Pro	Lys	
Arg	Tyr 290	Lys	Ala	Asn	Tyr	Cys 295	Ser	Gly	Gln	Cys	Glu 300	Tyr	Met	Phe	Met	
Gln 305	Lys	Tyr	Pro	His	Thr 310	His	Leu	Val	Gln	Gln 315	Ala	Asn	Pro	Arg	Gly 320	
Ser	Ala	Gly	Pro	Cys 325	Cys	Thr	Pro	Thr	Lys 330	Met	Ser	Pro	Ile	Asn 335	Met	
Leu	Tyr	Phe	Asn 340	Asp	Lys	Gln	Gln	Ile 345	Ile	Tyr	Gly	Lys	Ile 350	Pro	Gly	
Met	Val 355	Val	Asp	Arg	Cys	Gly	Cys 360	Ser								

<210> 20
<211> 147
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

ES 2 779 698 T3

```

Met Gly His Phe Thr Glu Glu Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ser Leu Trp
1      5      10      15

Gly Lys Val Asn Val Glu Asp Ala Gly Gly Glu Thr Leu Gly Arg Leu
      20      25      30

Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Asp Ser Phe Gly Asn
      35      40      45

Leu Ser Ser Ala Ser Ala Ile Met Gly Asn Pro Lys Val Lys Ala His
      50      55      60

Gly Lys Lys Val Leu Thr Ser Leu Gly Asp Ala Thr Lys His Leu Asp
65      70      75      80

Asp Leu Lys Gly Thr Phe Ala Gln Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys
      85      90      95

Leu His Val Asp Pro Glu Asn Phe Lys Leu Leu Gly Asn Val Leu Val
      100      105      110

Thr Val Leu Ala Ile His Phe Gly Lys Glu Phe Thr Pro Glu Val Gln
      115      120      125

Ala Ser Trp Gln Lys Met Val Thr Ala Val Ala Ser Ala Leu Ser Ser
      130      135      140

Arg Tyr His
145

```

5 <210> 21
 <211> 570
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 21

ES 2 779 698 T3

Met	Thr	Leu	Leu	Trp	Cys	Val	Val	Ser	Leu	Tyr	Phe	Tyr	Gly	Ile	Leu	1	5	10	15
Gln	Ser	Asp	Ala	Ser	Glu	Arg	Cys	Asp	Asp	Trp	Gly	Leu	Asp	Thr	Met	20	25	30	
Arg	Gln	Ile	Gln	Val	Phe	Glu	Asp	Glu	Pro	Ala	Arg	Ile	Lys	Cys	Pro	35	40	45	
Leu	Phe	Glu	His	Phe	Leu	Lys	Phe	Asn	Tyr	Ser	Thr	Ala	His	Ser	Ala	50	55	60	
Gly	Leu	Thr	Leu	Ile	Trp	Tyr	Trp	Thr	Arg	Gln	Asp	Arg	Asp	Leu	Glu	65	70	75	80
Glu	Pro	Ile	Asn	Phe	Arg	Leu	Pro	Glu	Asn	Arg	Ile	Ser	Lys	Glu	Lys	85	90	95	
Asp	Val	Leu	Trp	Phe	Arg	Pro	Thr	Leu	Leu	Asn	Asp	Thr	Gly	Asn	Tyr	100	105	110	
Thr	Cys	Met	Leu	Arg	Asn	Thr	Thr	Tyr	Cys	Ser	Lys	Val	Ala	Phe	Pro	115	120	125	
Leu	Glu	Val	Val	Gln	Lys	Asp	Ser	Cys	Phe	Asn	Ser	Pro	Met	Lys	Leu	130	135	140	
Pro	Val	His	Lys	Leu	Tyr	Ile	Glu	Tyr	Gly	Ile	Gln	Arg	Ile	Thr	Cys	145	150	155	160
Pro	Asn	Val	Asp	Gly	Tyr	Phe	Pro	Ser	Ser	Val	Lys	Pro	Thr	Ile	Thr	165	170	175	

ES 2 779 698 T3

Trp Tyr Met Gly Cys Tyr Lys Ile Gln Asn Phe Asn Asn Val Ile Pro
 180 185 190
 Glu Gly Met Asn Leu Ser Phe Leu Ile Ala Leu Ile Ser Asn Asn Gly
 195 200 205
 Asn Tyr Thr Cys Val Val Thr Tyr Pro Glu Asn Gly Arg Thr Phe His
 210 215 220
 Leu Thr Arg Thr Leu Thr Val Lys Val Val Gly Ser Pro Lys Asn Ala
 225 230 235 240
 Val Pro Pro Val Ile His Ser Pro Asn Asp His Val Val Tyr Glu Lys
 245 250 255
 Glu Pro Gly Glu Glu Leu Leu Ile Pro Cys Thr Val Tyr Phe Ser Phe
 260 265 270
 Leu Met Asp Ser Arg Asn Glu Val Trp Trp Thr Ile Asp Gly Lys Lys
 275 280 285
 Pro Asp Asp Ile Thr Ile Asp Val Thr Ile Asn Glu Ser Ile Ser His
 290 295 300
 Ser Arg Thr Glu Asp Glu Thr Arg Thr Gln Ile Leu Ser Ile Lys Lys
 305 310 315 320
 Val Thr Ser Glu Asp Leu Lys Arg Ser Tyr Val Cys His Ala Arg Ser
 325 330 335
 Ala Lys Gly Glu Val Ala Lys Ala Ala Lys Val Lys Gln Lys Val Pro
 340 345 350
 Ala Pro Arg Tyr Thr Val Glu Leu Ala Cys Gly Phe Gly Ala Thr Val
 355 360 365
 Leu Leu Val Val Ile Leu Ile Val Val Tyr His Val Tyr Trp Leu Glu
 370 375 380
 Met Val Leu Phe Tyr Arg Ala His Phe Gly Thr Asp Glu Thr Ile Leu
 385 390 395 400
 Asp Gly Lys Glu Tyr Asp Ile Tyr Val Ser Tyr Ala Arg Asn Ala Glu
 405 410 415
 Glu Glu Glu Phe Val Leu Leu Thr Leu Arg Gly Val Leu Glu Asn Glu
 420 425 430

ES 2 779 698 T3

Phe Gly Tyr Lys Leu Cys Ile Phe Asp Arg Asp Ser Leu Pro Gly Gly
435 440 445

Ile Val Thr Asp Glu Thr Leu Ser Phe Ile Gln Lys Ser Arg Arg Leu
450 455 460

Leu Val Val Leu Ser Pro Asn Tyr Val Leu Gln Gly Thr Gln Ala Leu
465 470 475 480

Leu Glu Leu Lys Ala Gly Leu Glu Asn Met Ala Ser Arg Gly Asn Ile
485 490 495

Asn Val Ile Leu Val Gln Tyr Lys Ala Val Lys Glu Thr Lys Val Lys
500 505 510

Glu Leu Lys Arg Ala Lys Thr Val Leu Thr Val Ile Lys Trp Lys Gly
515 520 525

Glu Lys Ser Lys Tyr Pro Gln Gly Arg Phe Trp Lys Gln Leu Gln Val
530 535 540

Ala Met Pro Val Lys Lys Ser Pro Arg Arg Ser Ser Ser Asp Glu Gln
545 550 555 560

Gly Leu Ser Tyr Ser Ser Leu Lys Asn Val
565 570

<210> 22
<211> 216
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

ES 2 779 698 T3

```

Met Gly Trp Ile Arg Gly Arg Arg Ser Arg His Ser Trp Glu Met Ser
1           5           10           15

Glu Phe His Asn Tyr Asn Leu Asp Leu Lys Lys Ser Asp Phe Ser Thr
          20           25           30

Arg Trp Gln Lys Gln Arg Cys Pro Val Val Lys Ser Lys Cys Arg Glu
          35           40           45

Asn Ala Ser Pro Phe Phe Phe Cys Cys Phe Ile Ala Val Ala Met Gly
          50           55           60

Ile Arg Phe Ile Ile Met Val Thr Ile Trp Ser Ala Val Phe Leu Asn
65           70           75           80

Ser Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr Glu Ser Tyr Cys
          85           90           95

Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn Asn Cys Tyr Gln
          100          105          110

Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln Ala Ser Cys Met
          115          120          125

Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys Glu Asp Gln Asp
          130          135          140

Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly Leu Val His Ile
145          150          155          160

Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser Ile Leu Ser Pro
          165          170          175

Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp Cys Ala Leu Tyr
          180          185          190

Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser Thr Pro Asn Thr
          195          200          205

Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val
210          215

```

5 <210> 23
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 779 698 T3

<400> 23

```

Met Gln Ala Ile Lys Cys Val Val Val Gly Asp Gly Ala Val Gly Lys
1           5           10           15

Thr Cys Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Thr Asn Ala Phe Pro Gly Glu Tyr
          20           25           30

Ile Pro Thr Val Phe Asp Asn Tyr Ser Ala Asn Val Met Val Asp Gly
          35           40           45

Lys Pro Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu Asp Tyr
          50           55           60

Asp Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Pro Gln Thr Asp Val Phe Leu Ile
65           70           75           80

Cys Phe Ser Leu Val Ser Pro Ala Ser Phe Glu Asn Val Arg Ala Lys
          85           90           95

Trp Tyr Pro Glu Val Arg His His Cys Pro Asn Thr Pro Ile Ile Leu
          100          105          110

Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Asp Thr Ile Glu Lys
          115          120          125

Leu Lys Glu Lys Lys Leu Thr Pro Ile Thr Tyr Pro Gln Gly Leu Ala
          130          135          140

Met Ala Lys Glu Ile Gly Ala Val Lys Tyr Leu Glu Cys Ser Ala Leu
145           150           155           160

Thr Gln Arg Gly Leu Lys Thr Val Phe Asp Glu Ala Ile Arg Ala Val
          165          170          175

Leu Cys Pro Pro Pro Val Lys Lys Arg Lys Arg Lys Cys Leu Leu Leu
          180          185          190

```

5

<210> 24

<211> 216

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 24

ES 2 779 698 T3

Met Ala Ala Gln Gly Glu Pro Gln Val Gln Phe Lys Leu Val Leu Val
1 5 10 15

Gly Asp Gly Gly Thr Gly Lys Thr Thr Phe Val Lys Arg His Leu Thr
20 25 30

Gly Glu Phe Glu Lys Lys Tyr Val Ala Thr Leu Gly Val Glu Val His
35 40 45

Pro Leu Val Phe His Thr Asn Arg Gly Pro Ile Lys Phe Asn Val Trp
50 55 60

Asp Thr Ala Gly Gln Glu Lys Phe Gly Gly Leu Arg Asp Gly Tyr Tyr
65 70 75 80

Ile Gln Ala Gln Cys Ala Ile Ile Met Phe Asp Val Thr Ser Arg Val
85 90 95

Thr Tyr Lys Asn Val Pro Asn Trp His Arg Asp Leu Val Arg Val Cys
100 105 110

Glu Asn Ile Pro Ile Val Leu Cys Gly Asn Lys Val Asp Ile Lys Asp

115

120

125

Arg Lys Val Lys Ala Lys Ser Ile Val Phe His Arg Lys Lys Asn Leu
130 135 140

Gln Tyr Tyr Asp Ile Ser Ala Lys Ser Asn Tyr Asn Phe Glu Lys Pro
145 150 155 160

Phe Leu Trp Leu Ala Arg Lys Leu Ile Gly Asp Pro Asn Leu Glu Phe
165 170 175

Val Ala Met Pro Ala Leu Ala Pro Pro Glu Val Val Met Asp Pro Ala
180 185 190

Leu Ala Ala Gln Tyr Glu His Asp Leu Glu Val Ala Gln Thr Thr Ala
195 200 205

Leu Pro Asp Glu Asp Asp Asp Leu
210 215

5 <210> 25
<211> 211
<212> PRT

ES 2 779 698 T3

<213> Homo sapiens

<400> 25

Met Thr Pro Trp Leu Gly Leu Ile Val Leu Leu Gly Ser Trp Ser Leu
1 5 10 15

Gly Asp Trp Gly Ala Glu Ala Cys Thr Cys Ser Pro Ser His Pro Gln
20 25 30

Asp Ala Phe Cys Asn Ser Asp Ile Val Ile Arg Ala Lys Val Val Gly
35 40 45

Lys Lys Leu Val Lys Glu Gly Pro Phe Gly Thr Leu Val Tyr Thr Ile
50 55 60

Lys Gln Met Lys Met Tyr Arg Gly Phe Thr Lys Met Pro His Val Gln
65 70 75 80

Tyr Ile His Thr Glu Ala Ser Glu Ser Leu Cys Gly Leu Lys Leu Glu
85 90 95

Val Asn Lys Tyr Gln Tyr Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Asp Gly Lys
100 105 110

Met Tyr Thr Gly Leu Cys Asn Phe Val Glu Arg Trp Asp Gln Leu Thr
115 120 125

Leu Ser Gln Arg Lys Gly Leu Asn Tyr Arg Tyr His Leu Gly Cys Asn
130 135 140

Cys Lys Ile Lys Ser Cys Tyr Tyr Leu Pro Cys Phe Val Thr Ser Lys
145 150 155 160

Asn Glu Cys Leu Trp Thr Asp Met Leu Ser Asn Phe Gly Tyr Pro Gly
165 170 175

Tyr Gln Ser Lys His Tyr Ala Cys Ile Arg Gln Lys Gly Gly Tyr Cys
180 185 190

Ser Trp Tyr Arg Gly Trp Ala Pro Pro Asp Lys Ser Ile Ile Asn Ala
195 200 205

Thr Asp Pro
210

<210> 26

<211> 313

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 779 698 T3

<400> 26

Met	Pro	Val	Ala	Gly	Ser	Glu	Leu	Pro	Arg	Arg	Pro	Leu	Pro	Pro	Ala	1	5	10	15
Ala	Gln	Glu	Arg	Asp	Ala	Glu	Pro	Arg	Pro	Pro	His	Gly	Glu	Leu	Gln	20	25	30	
Tyr	Leu	Gly	Gln	Ile	Gln	His	Ile	Leu	Arg	Cys	Gly	Val	Arg	Lys	Asp	35	40	45	
Asp	Arg	Thr	Gly	Thr	Gly	Thr	Leu	Ser	Val	Phe	Gly	Met	Gln	Ala	Arg	50	55	60	
Tyr	Ser	Leu	Arg	Asp	Glu	Phe	Pro	Leu	Leu	Thr	Thr	Lys	Arg	Val	Phe	65	70	75	80
Trp	Lys	Gly	Val	Leu	Glu	Glu	Leu	Leu	Trp	Phe	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	85	90	95	
Asn	Ala	Lys	Glu	Leu	Ser	Ser	Lys	Gly	Val	Lys	Ile	Trp	Asp	Ala	Asn	100	105	110	
Gly	Ser	Arg	Asp	Phe	Leu	Asp	Ser	Leu	Gly	Phe	Ser	Thr	Arg	Glu	Glu	115	120	125	

ES 2 779 698 T3

Gly Asp Leu Gly Pro Val Tyr Gly Phe Gln Trp Arg His Phe Gly Ala
 130 135 140

Glu Tyr Arg Asp Met Glu Ser Asp Tyr Ser Gly Gln Gly Val Asp Gln
 145 150 155 160

Leu Gln Arg Val Ile Asp Thr Ile Lys Thr Asn Pro Asp Asp Arg Arg
 165 170 175

Ile Ile Met Cys Ala Trp Asn Pro Arg Asp Leu Pro Leu Met Ala Leu
 180 185 190

Pro Pro Cys His Ala Leu Cys Gln Phe Tyr Val Val Asn Ser Glu Leu
 195 200 205

Ser Cys Gln Leu Tyr Gln Arg Ser Gly Asp Met Gly Leu Gly Val Pro
 210 215 220

Phe Asn Ile Ala Ser Tyr Ala Leu Leu Thr Tyr Met Ile Ala His Ile
 225 230 235 240

Thr Gly Leu Lys Pro Gly Asp Phe Ile His Thr Leu Gly Asp Ala His
 245 250 255

Ile Tyr Leu Asn His Ile Glu Pro Leu Lys Ile Gln Leu Gln Arg Glu
 260 265 270

Pro Arg Pro Phe Pro Lys Leu Arg Ile Leu Arg Lys Val Glu Lys Ile
 275 280 285

Asp Asp Phe Lys Ala Glu Asp Phe Gln Ile Glu Gly Tyr Asn Pro His
 290 295 300

Pro Thr Ile Lys Met Glu Met Ala Val
 305 310

REIVINDICACIONES

1. Una composición que aumenta el nivel de polipéptido GDF11 en la circulación o en el tejido cardíaco de un sujeto por encima del nivel de GDF11 en el sujeto antes del tratamiento con la composición, para su uso en un método para tratar una afección cardiovascular relacionada con la edad mediada o caracterizada por hipertrofia cardíaca en un sujeto, comprendiendo el método administrar la composición al sujeto; en donde la composición comprende un polipéptido GDF11 o un ácido nucleico que codifica un polipéptido GDF11; y en el que el sujeto tiene o ha sido diagnosticado con una afección seleccionada del grupo que consiste en: envejecimiento del corazón, insuficiencia cardíaca diastólica, hipertrofia cardíaca relacionada con la edad, o rigidez del corazón debido al envejecimiento.
2. La composición para su uso en el método de la reivindicación 1, en donde la composición comprende un polipéptido GDF11 que comprende la secuencia de aminoácidos de:
 - (a) SEQ ID NO 14,
 - (b) SEQ ID NO 2, o
 - (c) SEQ ID NO: 1.
3. La composición para su uso en el método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la composición comprende homodímeros de polipéptidos GDF11 que comprenden la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID NO: 1, 2 o 14.
4. La composición para su uso en el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la composición comprende heterodímeros de polipéptidos GDF11 que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 1, 2 o 14.
5. La composición para su uso en el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la composición se administra a través de una vía seleccionada del grupo que consiste en: intravenosa, subcutánea, intraarterial y arterial intracoronaria.
6. La composición para su uso en el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el nivel de GDF11 se incrementa en al menos un 100 % sobre el nivel de GDF11 en el sujeto antes del tratamiento con la composición.
7. La composición para su uso en el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el nivel de GDF11 se incrementa al menos al 75 % de un nivel de referencia saludable, en donde el nivel de referencia saludable puede ser el nivel promedio de GDF11 en una población de sujetos humanos que no muestran ningún signo o síntoma de hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca diastólica o afecciones relacionadas.

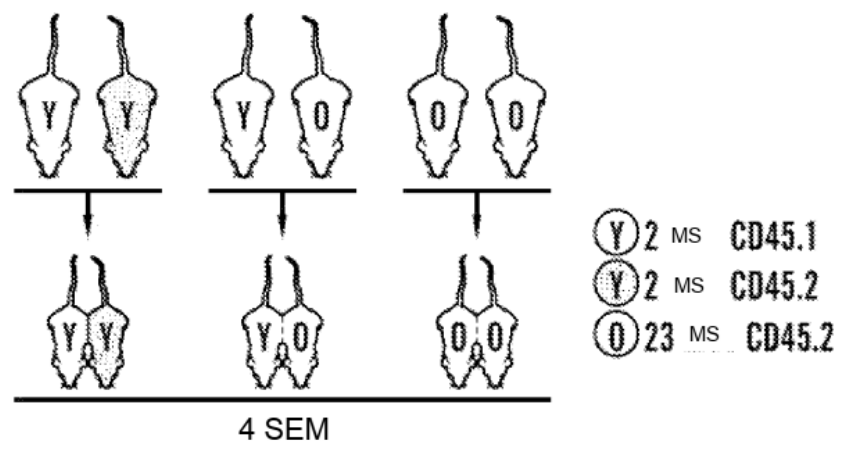


FIG. 1A

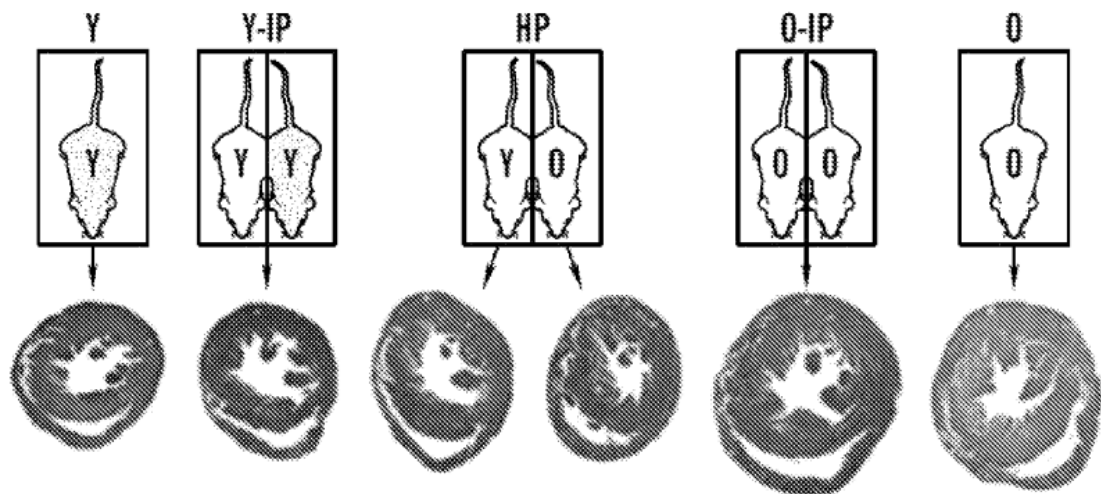
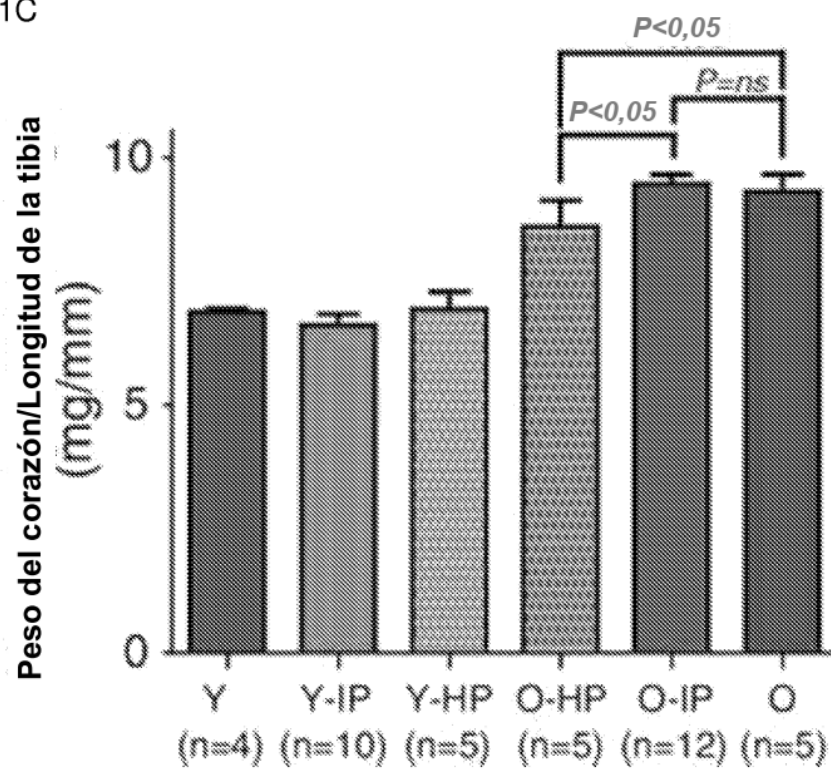


FIG. 1B

Figuras 1A-1C

1C



Figuras 1A-1C (cont.)

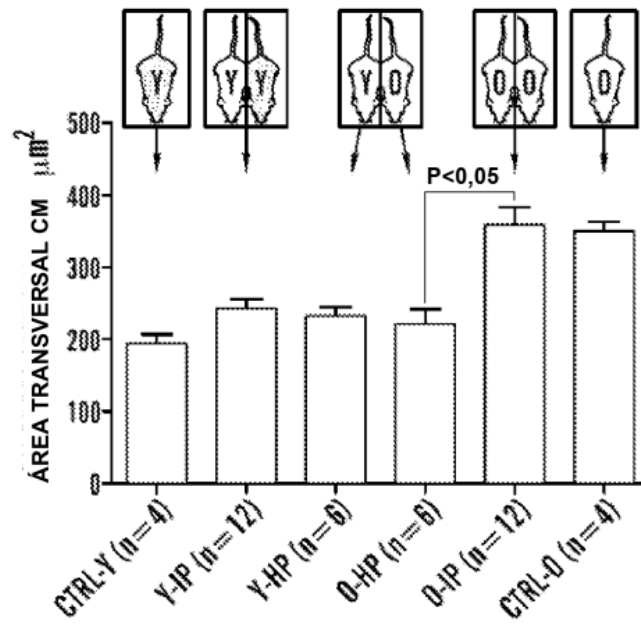


FIG. 2A

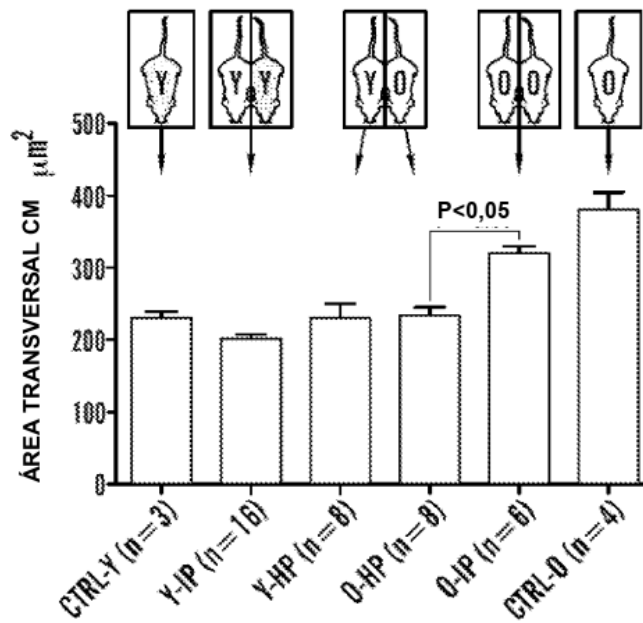


FIG. 2B

Figuras 2A-2B

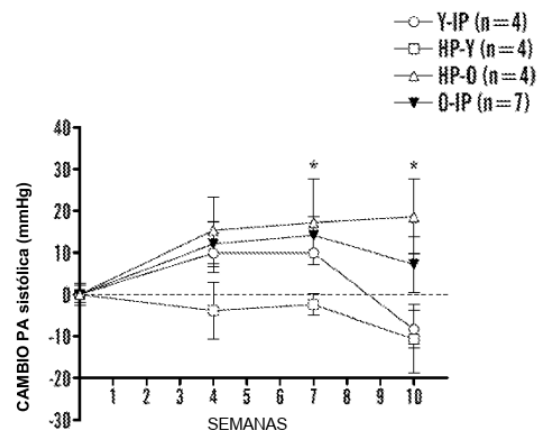
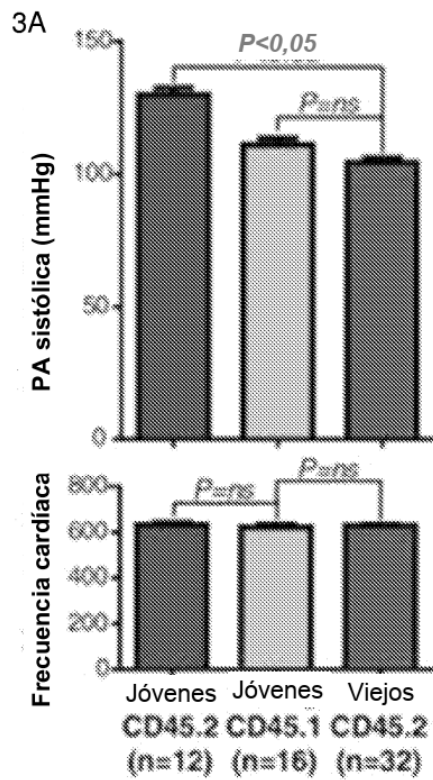


FIG. 3B

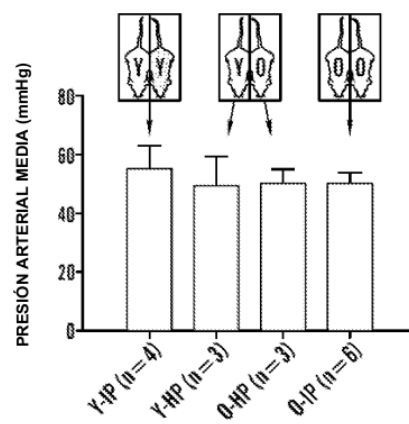
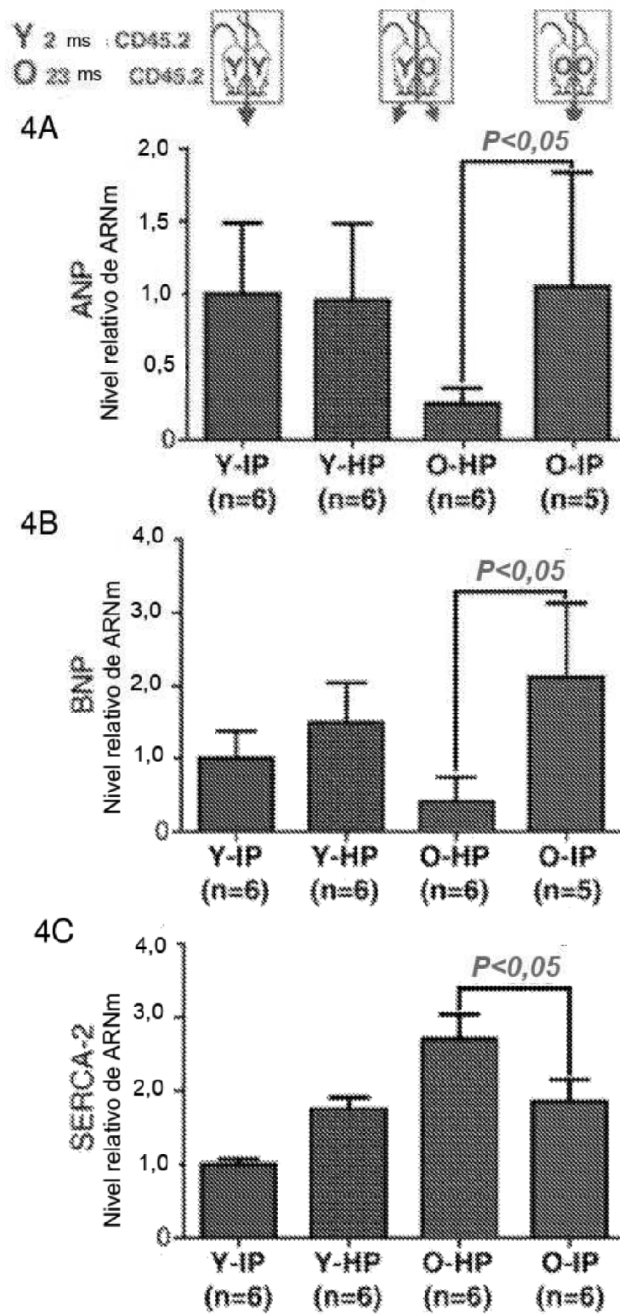


FIG. 3C

Figuras 3A-3C



Figuras 4A-4C

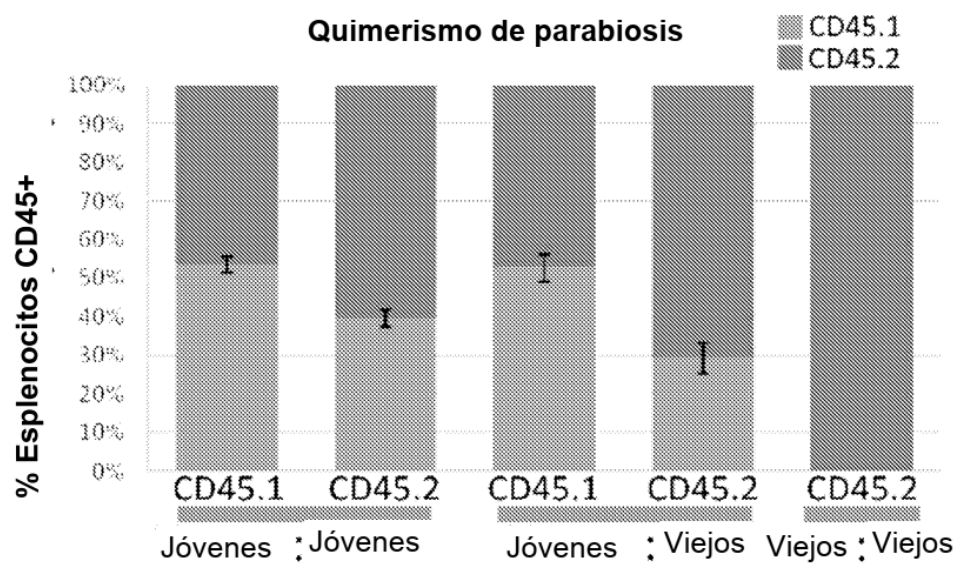


Figura 5

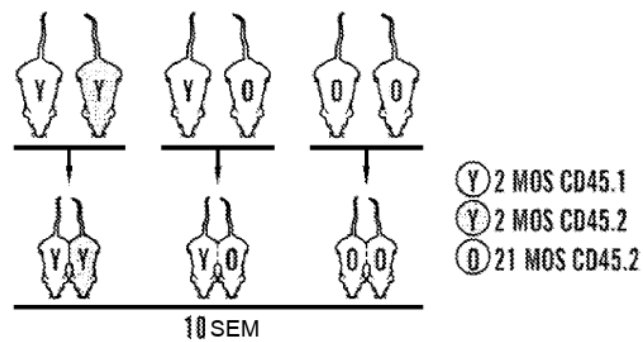


FIG. 6A

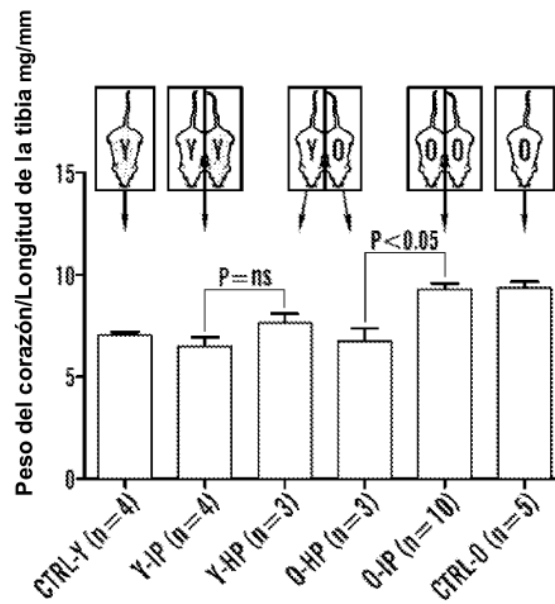
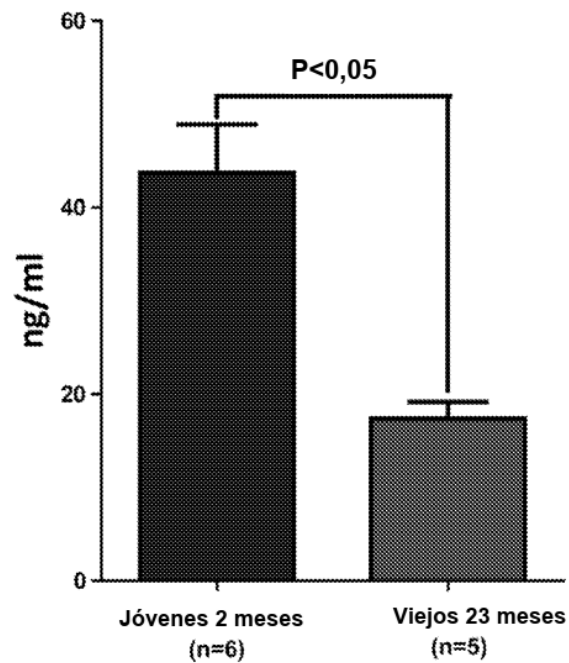


FIG. 6B

Figuras 6A-6B

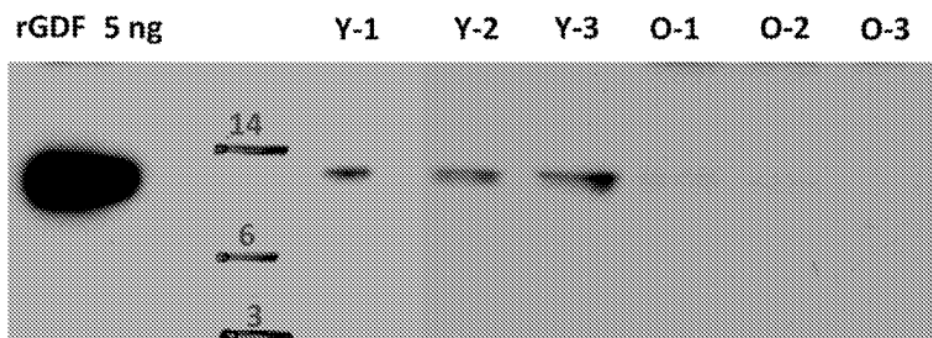
7A

Nivel plasmático de GDF11 mediante ELISA



7B

Nivel plasmático de GDF11 mediante transferencia Western



Figuras 7A-7B

```

>1c1|8305 producto proteico sin nombre
Longitud= 375
Puntuación = 492 bits (1266), Esp. = 3e-177, Método : Ajuste de matriz composicional
Identities = 227/347 (65%), Positivos = 279/347 (80%), Huecos = 11/347 (3%)

Consulta 62 CPVCVWRQHSRELRLRESIKSQILSKLRLKEAPNISREVVKQLLPKAPPLQQLDLHDFQG 121
C C WRQ+++ R+E+IK QILSKLRL+ APNIS++V++QLLPKAPPL+++D +D Q
Sujeto 39 CNACTWRQNTKSSRIEAIKIQLSKLRLKETAPNISKDVIRQLLPKAPPLRELIDQYDVQR 98

Consulta 122 DALQPEDFLEEDEYHATTETVISMAQETDPAVQTDGSPLCCHFHFSKVMFTKVLKAQLW 181
D + LE+D+YHATTET+I+M E+D +Q DG P CC F FS K+ + KV+KAQLW
Sujeto 99 DD-SSDGSLEDDDYHATTETIITPTESDFLMQVDGKPKCCFFKFSSKIQYMKVKAQLW 157

Consulta 162 VYLRFPVFRPATVYLOILRL-KPLTGEGTAGGGGGGRHIRIRSLKIELHSRSGHWQSIDF 240
+YLRPV P TV++QILRL KP+ G R+ IRSLE++++ +G WQSID
Sujeto 158 IYLRFPVETPTTVFVQILRLIKPMK-----GTRYTGIRSLKLDMPGTGIWQSIDV 208

Consulta 241 KQVLHSUFRQPQSNWGLEINAFDPSGTDLAVTSLGPGAEGHPPFMELRVLENTKRSRRL 300
K VL +W +QP+SN GIEI A D +G DLAVT GPG +GL+PF+E++V + KRSRR+
Sujeto 209 KTVLQNWLLKQPESNLGIEIKALDENCHDLAVTFPGPGEDGLNPFLEVVKVDTPKRSRRDF 268

Consulta 301 GLDCDEHSSESRCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGQCEYMFHOKYPHTHLVQ 360
GLDCDEHS+ESRCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSG+CE++F+QKYPHTHLV
Sujeto 269 GLDCDEHSTESRCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFVFLQKYPHTHLVH 328

Consulta 361 QANPRGSAGPCTPTKMSPINHLYFNDKQIIYGKIPGMVVDRCGCS 407
QANPRGSAGPCTPTKMSPINHLYFN K+QIIYGKIP MVVDRCGCS
Sujeto 329 QANPRGSAGPCTPTKMSPINHLYFNGKEQIIYGKIPAMVVDRCGCS 375

```

Figura 8

>1c1 1497 producto proteico sin nombre				
Longitud= 405				
Puntuación= 727 bits (1876), Esp.= 0,0, Método: ajuste de matriz composicional.				
Identities= 359/361 (99 %), Positivos= 359/361 (99 %), Huecos= 0/361 (0 %)				
Consulta	47	RSSRPAPSVAPEDGCPVCVWRQHSRELRLSEIKSQILSKLRLKEAPNISREVVKQLLPK	106	
		RSSRPAPS PEPDGCPCVWRQHSRELRLSEIKSQILSKLRLKEAPNISREVVKQLLPK		
Sujeto	45	RSSRPAPSAPPEPDGCPVCVWRQHSRELRLSEIKSQILSKLRLKEAPNISREVVKQLLPK	104	
Consulta	107	APPLQQILDLDHDFQGDALQPEDFLEEDEYHATTETVISMASETDPVAVQTDGSPLCCHFH	166	
		APPLQQILDLDHDFQGDALQPEDFLEEDEYHATTETVISMASETDPVAVQTDGSPLCCHFH		
Sujeto	105	APPLQQILDLDHDFQGDALQPEDFLEEDEYHATTETVISMASETDPVAVQTDGSPLCCHFH	164	
Consulta	167	SPKVMFTKVLKAQLWVYLRPVPRPATVYLQILRLKPLTGECTAGGGGGGRRHIRIRSLKI	226	
		SPKVMFTKVLKAQLWVYLRPVPRPATVYLQILRLKPLTGECTAGGGGGGRRHIRIRSLKI		
Sujeto	165	SPKVMFTKVLKAQLWVYLRPVPRPATVYLQILRLKPLTGECTAGGGGGGRRHIRIRSLKI	224	
Consulta	227	ELHSRSGHWQSIDFKQVLHSWFRQPSNWGIEINAFDPSGTDLAVTSLGPGAEGHLPFME	286	
		ELHSRSGHWQSIDFKQVLHSWFRQPSNWGIEINAFDPSGTDLAVTSLGPGAEGHLPFME		
Sujeto	225	ELHSRSGHWQSIDFKQVLHSWFRQPSNWGIEINAFDPSGTDLAVTSLGPGAEGHLPFME	284	
Consulta	287	LRVLENTKRSRRNLGLDCDEHSSSRCCRYPLTVDFAFGWDUIIAPKRYKANYCSGQCE	346	
		LRVLENTKRSRRNLGLDCDEHSSSRCCRYPLTVDFAFGWDUIIAPKRYKANYCSGQCE		
Sujeto	285	LRVLENTKRSRRNLGLDCDEHSSSRCCRYPLTVDFAFGWDUIIAPKRYKANYCSGQCE	344	
Consulta	347	YMFQKYPHTHLVQQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNDKQIIYGKIPGMVVDRCGC	406	
		YMFQKYPHTHLVQQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNDKQIIYGKIPGMVVDRCGC		
Sujeto	345	YMFQKYPHTHLVQQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNDKQIIYGKIPGMVVDRCGC	404	
Consulta	407	S	407	
		S		
Sujeto	405	S	405	

Figura 9

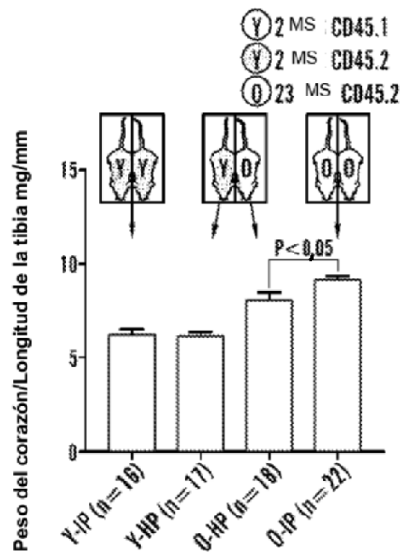


FIG. 10A

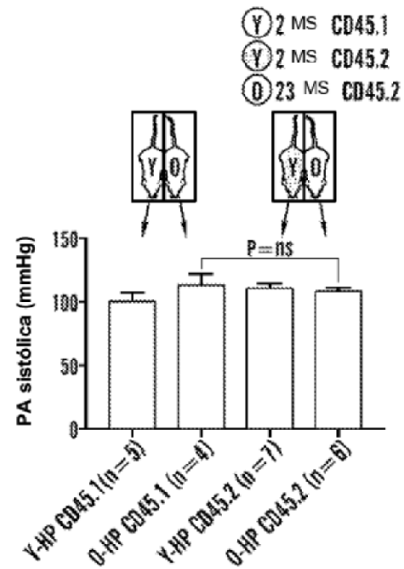


FIG. 10C

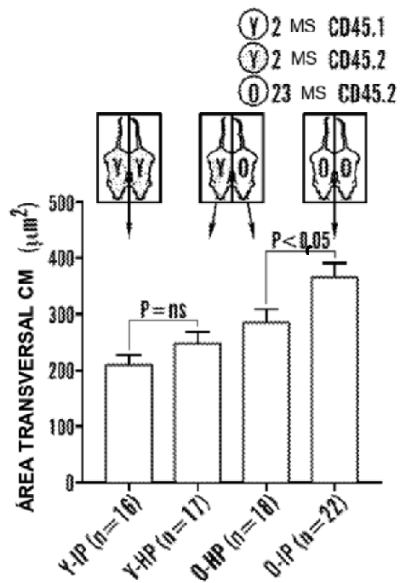


FIG. 10B

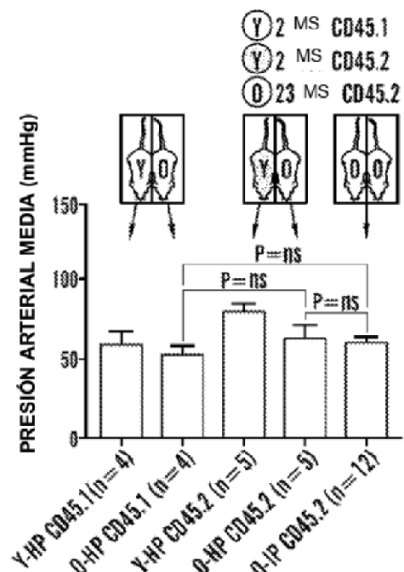


FIG. 10D

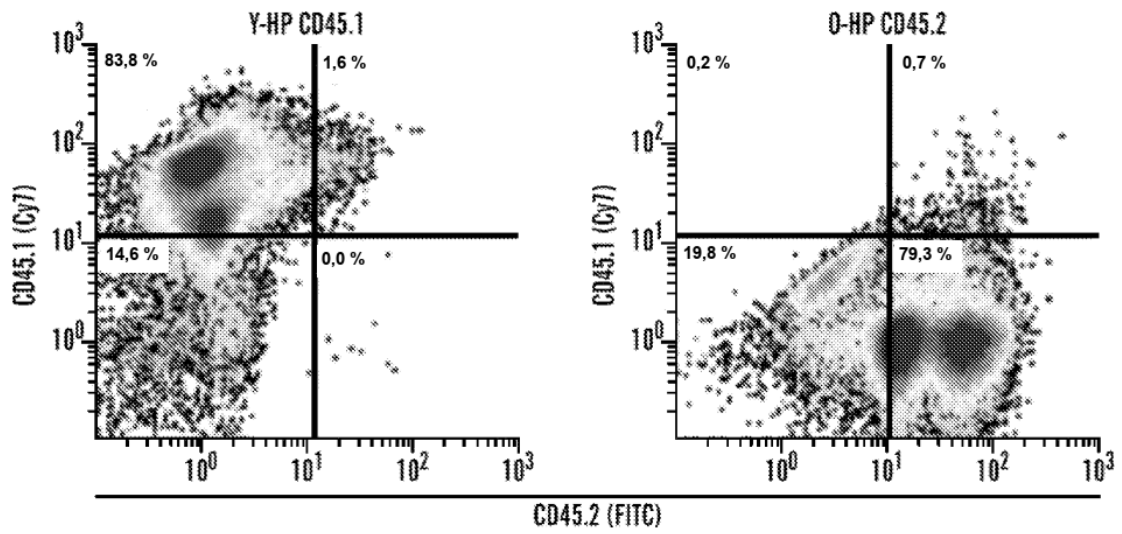


FIG. 11A

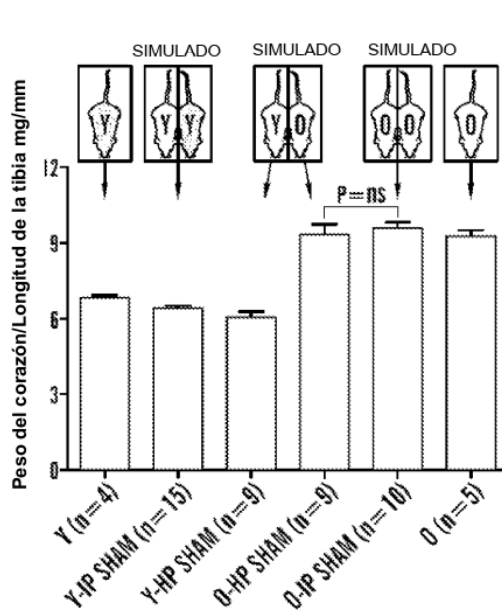


FIG. 11B

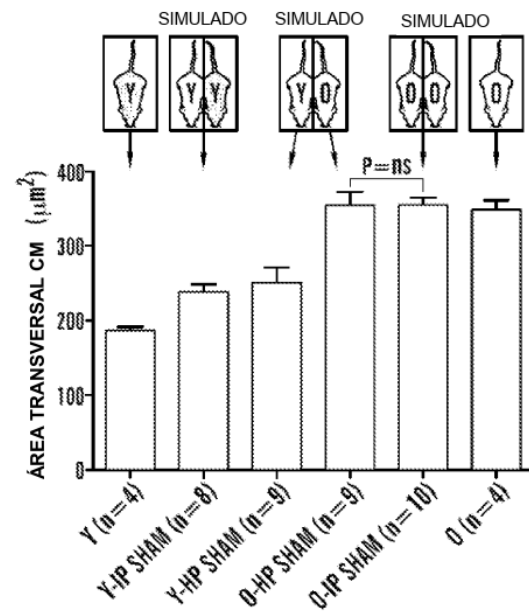
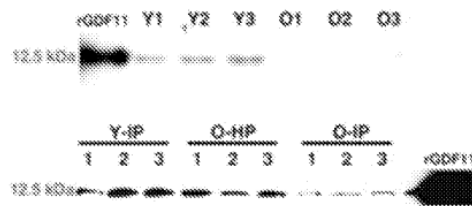


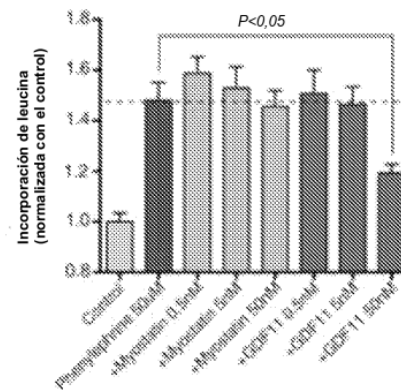
FIG. 11C

Figuras 11A-11C

12A

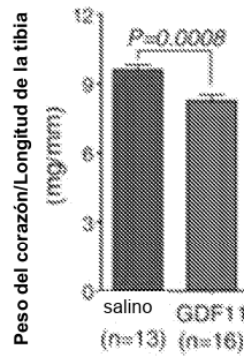
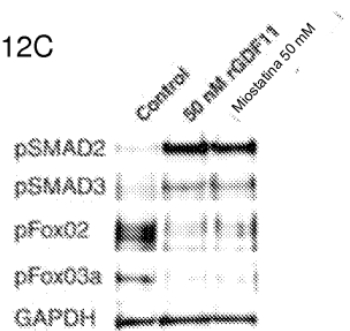


12B

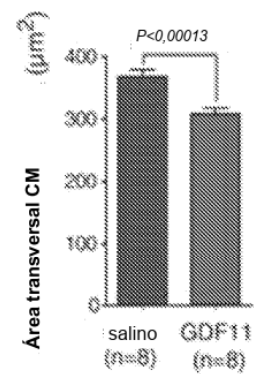


12D

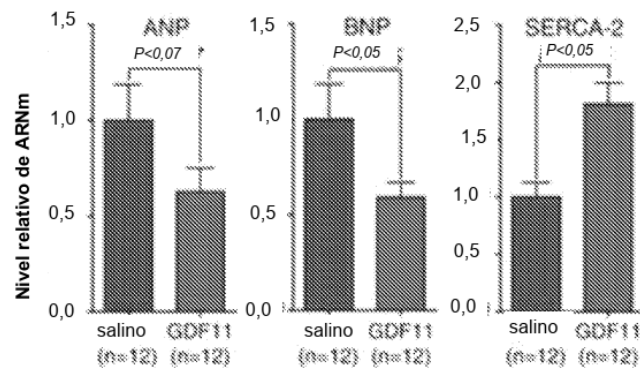
12C



12E

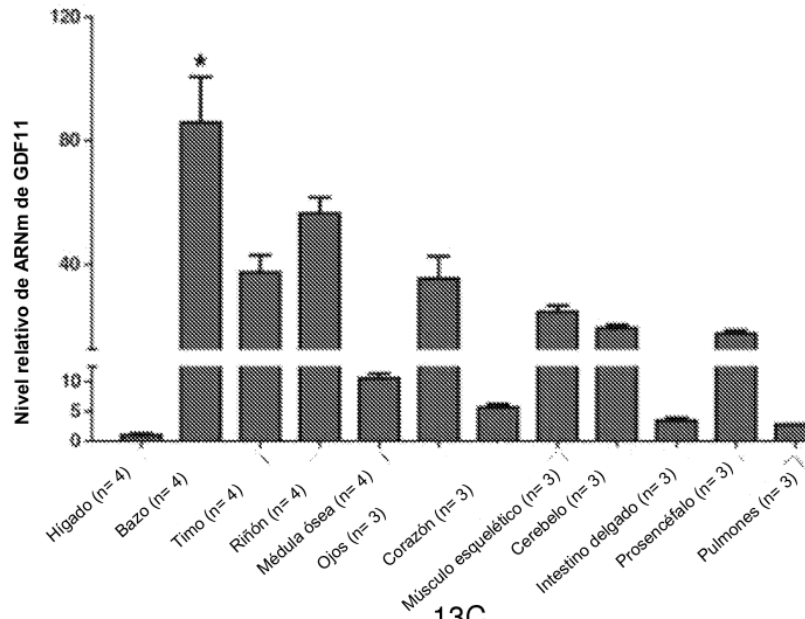


12F

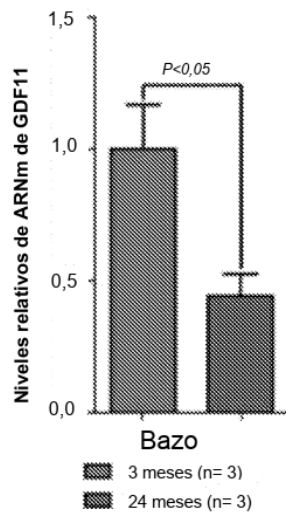


Figuras 12A-12F

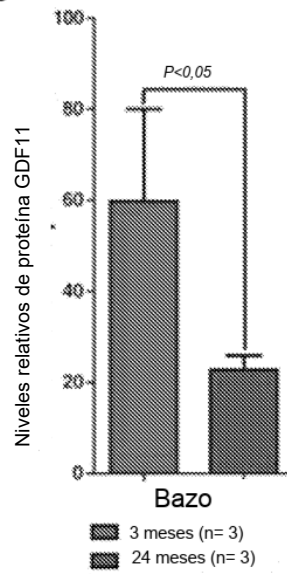
13A



13B



13C



Figuras 13A-13C

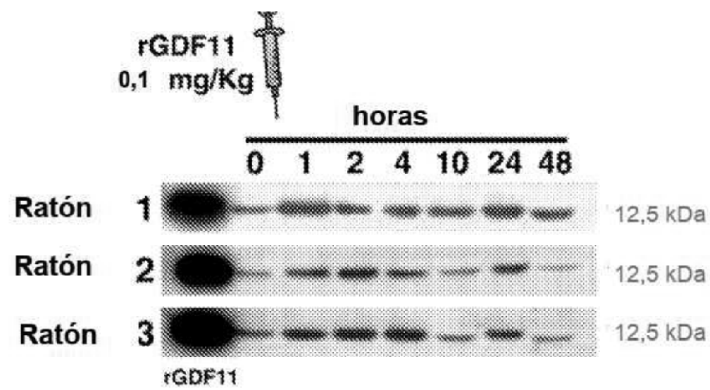
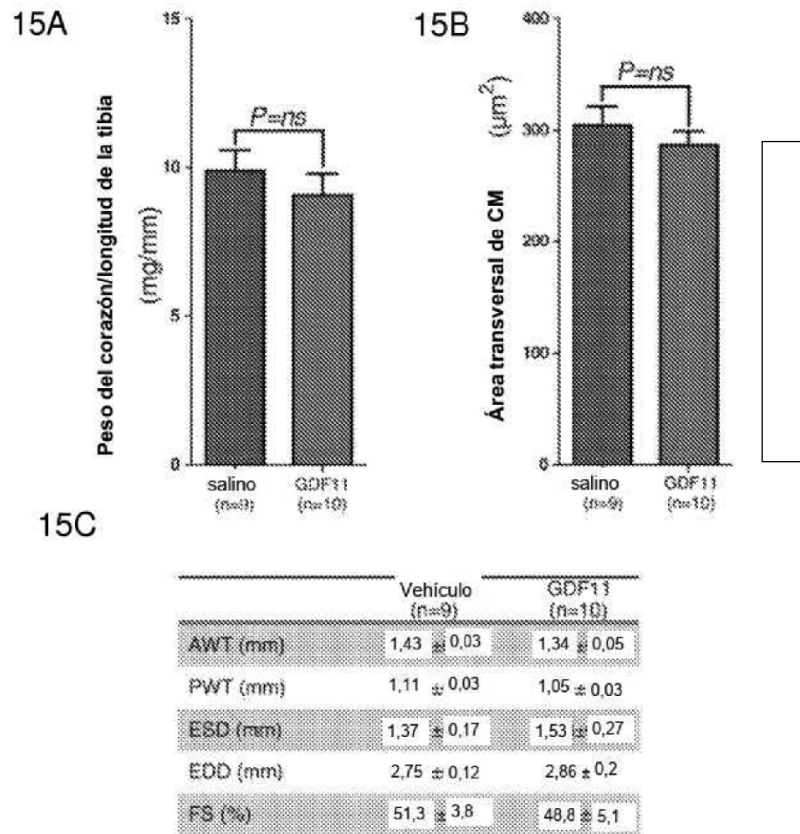


Figura 14



Figuras 15A-15C

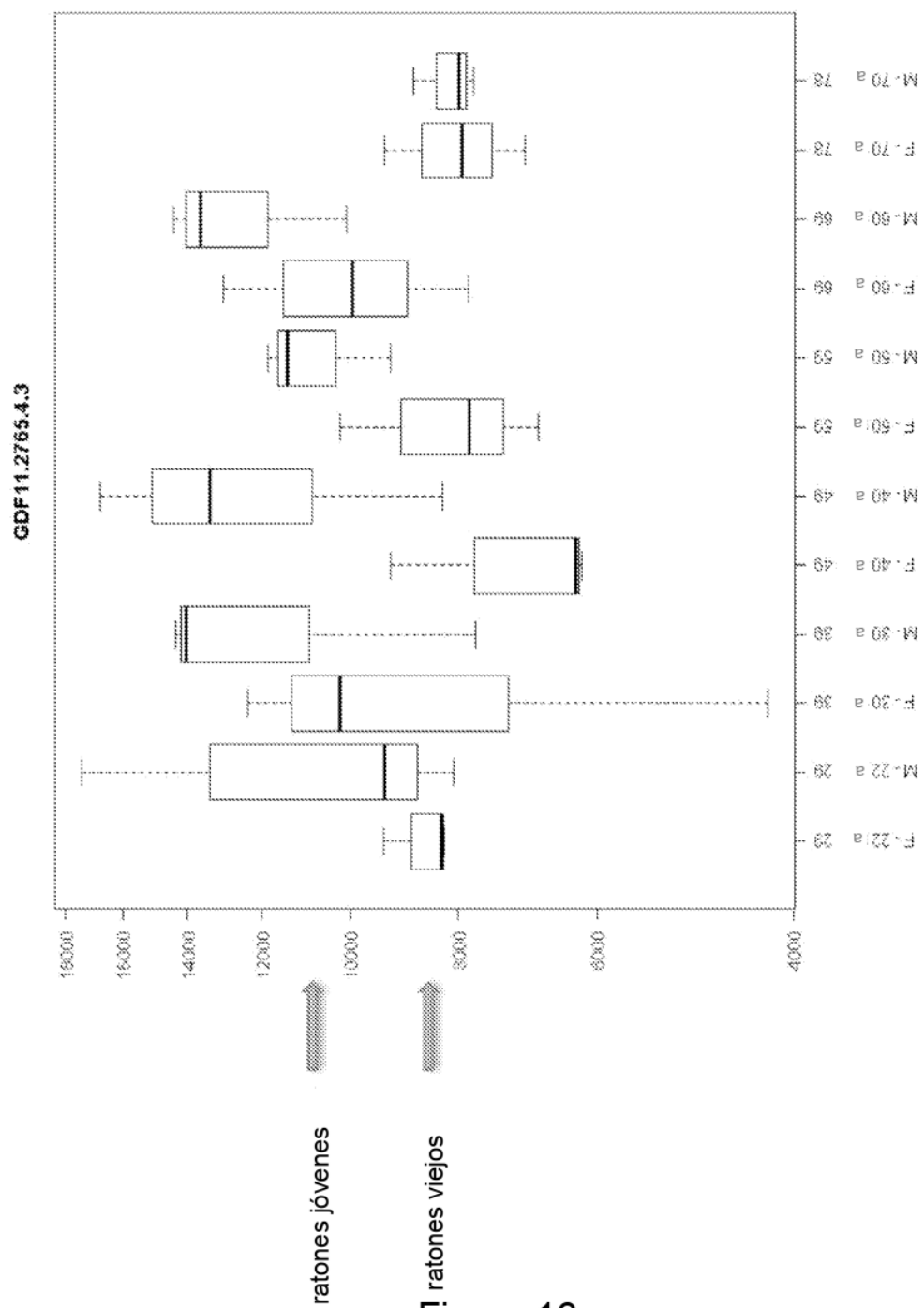


Figura 16