

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 699**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 47/68 (2007.01)

A61P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2009 PCT/US2009/003838**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2009 WO09158033**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2009 E 09770571 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 2318028**

54 Título: **Antagonistas de activina-ActRIIA soluble y usos para incrementar los niveles de glóbulos rojos**

30 Prioridad:

26.06.2008 US 133368 P

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

05.11.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SHERMAN, MATTHEW, L.;
SEEHRA, JASBIR y
BORGSTEIN, NIELS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 791 699 T3

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

DESCRIPCIÓN

Antagonistas de activina-ActRIIA soluble y usos para incrementar los niveles de glóbulos rojos

5 Antecedentes de la invención

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

Los glóbulos rojos maduros se producen a partir de células madre hematopoyéticas pluripotentes en un proceso denominado eritropoyesis. Después del nacimiento, la eritropoyesis se produce principalmente en la médula ósea y en la pulpa roja del bazo. La acción coordinada de diversas rutas de señalización controla el equilibrio de proliferación, diferenciación, supervivencia y muerte celulares. Bajo condiciones normales, los glóbulos rojos se producen a una tasa que mantiene una masa constante de glóbulos rojos en el cuerpo, y la producción puede incrementarse o reducirse en respuesta a diversos estímulos, incluyendo una tensión de oxígeno o demanda de los tejidos incrementada o reducida. El proceso de la eritropoyesis se inicia con la formación de células precursoras de linaje comprometido y sigue a través de una serie de diferentes tipos de células precursoras. Los estadios finales de la eritropoyesis se producen al liberarse los reticulocitos al torrente sanguíneo y perder sus mitocondrias y ribosomas, asumiendo simultáneamente la morfología del glóbulo rojo maduro. Un nivel elevado de reticulocitos, o una proporción reticulocito:eritrocito elevada, en la sangre es indicativa de tasas de producción elevadas de glóbulos rojos.

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

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

El tratamiento con Epo típicamente causa un incremento de las hemoglobinas de aproximadamente 1 a 3 g/dl en seres humanos sanos durante un periodo de semanas. Al administrarla en individuos anémicos, dicho régimen de tratamiento con frecuencia proporciona incrementos sustanciales de hemoglobina y de los niveles de glóbulos rojos y conduce a una mejora de la calidad de vida y prolongación de la supervivencia. Epo no resulta uniformemente eficaz, y muchos individuos son refractarios a incluso dosis elevadas (Hori et al., Nephrol. Dial. Transplant 15, 43-50, 2000). Más de 50% de los pacientes con cáncer presenta una respuesta inadecuada a Epo; aproximadamente 10% de los pacientes de enfermedad renal de estadio terminal son hiporrespondedores (Glaspy et al., J. Clin. Oncol. 15, 1218-1234, 1997; Demetri et al. J. Clin. Oncol. 16, 3412-3425, 1998) y menos de 10% de los pacientes con síndrome mielodisplásico responden favorablemente (Estey, Curr. Opin. Hematol. 10, 60-67, 2003). Varios factores, incluyendo la inflamación, la deficiencia de hierro y vitaminas, una diálisis inadecuada, la toxicidad del aluminio y el hiperparatiroidismo, pueden predecir una mala respuesta terapéutica, aunque los mecanismos moleculares de resistencia a la Epo todavía no se entienden por completo.

De esta manera, es un objetivo de la presente exposición proporcionar composiciones alternativas para incrementar los niveles de glóbulos rojos en los pacientes.

55 Descripción resumida de la invención

La presente invención proporciona un antagonista de activina-ActRIIA para la utilización en el tratamiento de anemia asociada a mielofibrosis en un paciente que lo necesita, en el que el antagonista comprende un polipéptido ActRIIA soluble que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- a) una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica a SEC ID n° 3,
- b) una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica a SEC ID n° 2, y
- c) una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica a SEC ID n° 7.

65

El polipéptido ActRIIa puede comprender una secuencia de aminoácidos por lo menos 95% idéntica a SEC ID nº 3, por lo menos 95% idéntica a SEC ID nº 2, o por lo menos 95% idéntica a SEC ID nº 7. El polipéptido puede presentar una o más de las características siguientes: i) se une a un ligando de ActRIIa con una K_D de por lo menos 10^{-7} M, y ii) inhibe la señalización de ActRIIa en la célula.

El antagonista puede ser una proteína de fusión, incluyendo, además del dominio de polipéptido ActRIIa, una o más partes polipeptídicas que potencian una o más de estabilidad *in vivo*, semivida *in vivo*, incorporación/administración, localización o distribución en los tejidos, formación de complejos proteicos y/o purificación. La proteína de fusión puede comprender una parte polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en: un dominio Fc de inmunoglobulina y una albúmina sérica.

El polipéptido puede comprender uno o más residuos aminoácidos modificados seleccionados de: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con una fracción lípido y un aminoácido conjugado con un agente derivatizante orgánico.

La proteína de fusión puede ser una proteína de fusión ActRIIa-Fc que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- a) la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 3,
- b) la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2,
- c) la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 7.

El polipéptido puede unirse a activina, que puede ser activina A o activina B. El polipéptido puede unirse a GDF11.

En parte, la exposición demuestra que los antagonistas de activina, así como los antagonistas de ActRIIa (colectivamente, "antagonistas de activina-ActRIIa") pueden utilizarse para incrementar los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina. En parte, la exposición demuestra que los antagonistas de activina-ActRIIa pueden incrementar los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina y también incrementar la densidad ósea. Dicho efecto dual presenta ventajas particulares en que los pacientes que presentan tanto anemia como pérdida ósea, tales como muchos pacientes de cáncer (en los que la anemia y la pérdida ósea pueden ser una consecuencia del tumor o una consecuencia de la radiación o quimioterapia), los pacientes con osteoporosis y los pacientes con insuficiencia renal. En particular, la exposición demuestra que una forma soluble de ActRIIa actúa como un inhibidor de la activina y, al administrarla *in vivo*, incrementa los niveles de glóbulos rojos. Aunque la ActRIIa soluble puede afectar a los niveles de glóbulos rojos mediante un mecanismo diferente del antagonismo de la activina, la exposición sin embargo demuestra que pueden seleccionarse agentes terapéuticos deseables basándose en el antagonismo de la activina o en el antagonismo de ActRIIa o ambos. Dichos agentes se denominan colectivamente antagonistas de activina-ActRIIa. Por lo tanto, en la presente memoria se dan a conocer métodos para utilizar antagonistas de activina-ActRIIa, incluyendo, por ejemplo, polipéptidos ActRIIa de unión a activina, anticuerpos anti-activina, anticuerpos anti-ActRIIa, moléculas pequeñas y aptámeros con diana en activina o ActRIIa, y ácidos nucleicos que reducen la expresión de activina o ActRIIa, para incrementar los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina en los pacientes y para tratar trastornos asociados a los niveles bajos de glóbulos rojos y hemoglobina en pacientes que lo necesitan, o que presentan efectos combinados sobre el hueso y los glóbulos rojos. Tal como se indica en la solicitud de patente US nº 2007-0249022 A1 (nº de serie 11/603.485) y en las solicitudes publicadas de patente nº WO 2008/100384 y nº WO 2007/062188, los antagonistas de activina-ActRIIa pueden utilizarse para fomentar el crecimiento óseo e incrementar la densidad ósea. Tal como se indica en la presente memoria, los efectos de los antagonistas de activina-ActRIIa sobre los niveles de glóbulos rojos son más rápidos y se producen a dosis más bajas que los efectos de dichos antagonistas sobre el hueso. De esta manera, en la presente memoria se dan a conocer métodos para utilizar un antagonista de activina-ActRIIa para incrementar los niveles de glóbulos rojos o hemoglobina sin causar un incremento significativo de la densidad ósea. Por ejemplo, un método puede causar un incremento inferior a 3%, 5%, 10% o 15% de la densidad ósea. Dicho efecto selectivo puede conseguirse mediante la utilización de, por ejemplo, dosis más bajas de antagonista de activina-ActRIIa, dosis menos frecuentes o mediante la utilización de un antagonista de activina-ActRIIa con una semivida en suero más corta a dosis y frecuencias que se calculan que proporcionan una concentración en suero más baja. Adicionalmente, dado que los antagonistas de activina-ActRIIa estimulan tanto el crecimiento óseo como incrementos de los niveles de glóbulos rojos, la exposición proporciona métodos para fomentar el crecimiento óseo e incrementar los niveles de glóbulos rojos, particularmente en pacientes con trastornos que se caracterizan por anemia y pérdida de hueso, tales como las enfermedades intestinales inflamatorias, la artritis reumatoide, el mieloma múltiple, la pérdida ósea relacionada con el cáncer y el tratamiento del cáncer y muchas formas de insuficiencia renal, incluyendo la enfermedad renal de estadio terminal.

La exposición proporciona polipéptidos que comprenden un polipéptido ActRIIa de unión a activina soluble que se une a la activina. Los polipéptidos ActRIIa pueden formularse en forma de una preparación farmacéutica que comprende el polipéptido ActRIIa de unión a activina y un portador farmacéuticamente aceptable. El polipéptido ActRIIa de unión a activina puede unirse a la activina con una K_D inferior a 1 micromolar o inferior a 100, 10 o 1 nanomolar. Opcionalmente, el polipéptido ActRIIa de unión a activina se une selectivamente a la activina frente a GDF11 y/o GDF8, y opcionalmente con una K_D que es por lo menos 10 veces, 20 veces o 50 veces inferior con respecto a la activa que con respecto a GDF11 y/o GDF8. Aunque sin deseo de restringirse a ningún mecanismo particular de

acción, se espera que dicho grado de selectividad para la inhibición de la actividad frente a la inhibición de GDF11/GDF8 en ActRIIa-Fc explica los efectos sobre el hueso o la eritropoyesis sin un efecto consistentemente medible sobre el músculo. En muchos casos, se seleccionará un polipéptido ActRIIa para causar un incremento inferior a 15%, inferior a 10% o inferior a 5% del músculo a dosis que consiguen efectos deseables sobre los niveles de los glóbulos rojos. En otros casos, el efecto sobre el músculo resulta aceptable y no necesita seleccionarse negativamente. La composición puede ser por lo menos 95% pura, con respecto a otros componentes polipeptídicos, según evaluación mediante cromatografía de exclusión por tamaños, y opcionalmente, la composición es por lo menos 98% pura. Un polipéptido ActRIIa de unión a activina para la utilización en dicha preparación puede ser cualquiera de los dados a conocer en la presente memoria, tal como un polipéptido que presenta (es decir, que comprende) una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID n° 2, n° 3, n° 7, n° 12 o n° 13, o que presenta (es decir, que comprende) una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N° 2, n° 3, n° 7, n° 12 o n° 13. Un polipéptido ActRIIa de unión a activina puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido ActRIIa natural, tal como uno que comprende por lo menos 10, 20 o 30 aminoácidos de una secuencia seleccionada de SEC ID n° 1 a n° 3, o una secuencia de SEC ID n° 2, que no presenta los 10 a 15 aminoácidos C-terminales (la "cola").

Un polipéptido ActRIIa de unión a activina soluble puede incluir una o más alteraciones de la secuencia de aminoácidos (p.ej., en el dominio de unión a ligando) respecto a un polipéptido ActRIIa natural. Se proporcionan ejemplos de polipéptidos ActRIIa alterados en el documento n° WO 2006/012627, páginas 59 a 60 y páginas 55 a 58, respectivamente, y en toda la solicitud de patente US n° US 2009-0005308 A1 (n° de serie 12/012.652). La alteración de la secuencia de aminoácidos puede, por ejemplo, alterar la glucosilación del polipéptido al producirlo en una célula de mamífero, insecto u otra célula eucariótica, o alterar el corte proteolítico del polipéptido respecto al polipéptido ActRIIa natural.

Un polipéptido ActRIIa de unión a activina puede ser una proteína de fusión que presenta, como un dominio, un polipéptido ActRIIa (p.ej., una parte de unión a ligando de un ActRIIa) y uno o más dominios adicionales que proporcionan una propiedad deseable, tal como una farmacocinética mejorada, una purificación más sencilla, la dirección a tejidos particulares, etc. Por ejemplo, un dominio de una proteína de fusión puede potenciar una o más de entre estabilidad *in vivo*, semivida *in vivo*, incorporación/administración, localización o distribución en tejidos, formación de complejos de proteínas, multimerización de la proteína de fusión, y/o purificación. Una proteína de fusión de ActRIIa de unión a activina puede incluir un dominio Fc de inmunoglobulina (de tipo salvaje o mutante) o una albúmina sérica u otra parte polipeptídica que proporcione propiedades deseables, tales como una farmacocinética mejorada, una solubilidad mejorada o una estabilidad mejorada. Preferentemente, una fusión de ActRIIa-Fc comprende un conector relativamente no estructurado situado entre el dominio Fc y el dominio ActRIIa extracelular. Dicho conector no estructurado puede ser una secuencia artificial de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos o un tramo de entre 5 y 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos que se encuentran relativamente libres de estructura secundaria, o una mezcla de ambos. Un conector puede ser rico en residuos de glicina y prolina y puede contener, por ejemplo, una secuencia única de treonina/serina y glicinas o secuencias repetitivas de treonina/serina y glicinas (p.ej., TG₄ (SEC ID n° 15) o SG₄ (SEC ID n° 16), singuletes o repeticiones). Una proteína de fusión puede incluir una subsecuencia de purificación, tal como una etiqueta epitopo, una etiqueta FLAG, una secuencia polihistidina y una fusión de GST. Opcionalmente, un polipéptido ActRIIa soluble incluye uno o más residuos aminoácidos modificados seleccionados de: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con una fracción lípido y un aminoácido conjugado con un agente derivatizante orgánico. Una preparación farmacéutica puede incluir además uno o más compuestos adicionales, tales como un compuesto que se utiliza para tratar un trastorno óseo o un compuesto que se utiliza para tratar la anemia. Preferentemente, una preparación farmacéutica se encuentra sustancialmente libre de pirógenos. En general, resulta preferente que se exprese la proteína ActRIIa en una línea celular de mamífero que media convenientemente en la glucosilación natural de la proteína ActRIIa de manera que reduzca la probabilidad de una respuesta inmune desfavorable en el paciente. Las líneas celulares humanas y de CHO se han utilizado con éxito y se espera que otros sistemas de expresión de mamífero comunes resultarán útiles.

Tal como se indica en la presente memoria, las proteínas ActRIIa designadas ActRIIa-Fc presentan propiedades deseables, incluyendo la unión selectiva a activina frente a GDF8 y/o GDF11, unión de ligando de alta afinidad y semivida sérica superior a dos semanas en modelos animales y en pacientes humanos. En la presente memoria se dan a conocer polipéptidos ActRIIa-Fc y preparaciones farmacéuticas que comprenden dichos polipéptidos y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La exposición proporciona ácidos nucleicos codificantes de un polipéptido ActRIIa de unión a activina soluble. Un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia codificante para un polipéptido ActRIIa de unión a activina soluble, tal como se ha indicado anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia codificante de un dominio extracelular (p.ej., un dominio de unión a ligando) de un ActRIIa y una secuencia que codificaría parte o la totalidad del dominio transmembranal y/o el dominio citoplasmático de un ActRIIa, excepto por un codón de parada situado dentro del dominio transmembranal o el dominio citoplasmático, o situado entre el dominio extracelular y el dominio transmembranal o el dominio citoplasmático. Por ejemplo, un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia polinucleotídica de ActRIIa de longitud completa, tal como SEC ID n° 4 o una versión parcialmente truncada de ActRIIa, tal como un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico Sec ID

nº 5, que corresponde al dominio extracelular de ActR11a. Un polinucleótido aislado puede comprender además un codón de terminación de transcripción de por lo menos seiscientos nucleótidos antes del extremo 3'-terminal o situado de otra manera, de manera que el polinucleótido da lugar a un dominio extracelular fusionado opcionalmente con una parte truncada de un ActR11a de longitud completa. Una secuencia de ácido nucleico preferente para ActR11a es SEC ID nº 14. Los ácidos nucleicos dados a conocer en la presente memoria pueden unirse operablemente a un promotor para la expresión y la exposición proporciona células transformadas con dichos polinucleótidos recombinantes. Preferentemente, la célula es una célula de mamífero, tal como una célula CHO.

La exposición proporciona métodos para preparar un polipéptido ActR11a de unión a activina soluble. Dicho método puede incluir la expresión de cualquiera de los ácidos nucleicos (p.ej., SEC ID nº 4, nº 5 o nº 14) dados a conocer en la presente memoria en una célula adecuada, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO) o célula humana. Dicho método puede comprender: a) cultivar una célula bajo condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido ActR11a soluble, en el que dicha célula se transforma con un constructo de expresión de ActR11a soluble, y b) recuperar el polipéptido ActR11a soluble expresado de esta manera. Los polipéptidos ActR11a solubles pueden recuperarse en forma de fracciones en bruto, parcialmente purificadas o altamente purificadas. La purificación puede llevarse a cabo mediante una serie de etapas de purificación, incluyendo, por ejemplo, una, dos o tres o más de las siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de intercambio aniónico (p.ej., sefarosa Q), cromatografía de interacción hidrofóbica (p.ej., fenilsefarosa), cromatografía de exclusión por tamaños y cromatografía de intercambio catiónico. Los polipéptidos ActR11a solubles pueden formularse en formas líquidas o sólidas (p.ej., liofilizadas).

Puede utilizarse un antagonista de activina-ActR11a dado a conocer en la presente memoria en un método para fomentar la producción de glóbulos rojos o incrementar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto. La exposición proporciona métodos para tratar un trastorno asociado a bajos recuentos de glóbulos rojos o niveles bajos de hemoglobina (p.ej., una anemia) o para fomentar la producción de glóbulos rojos, en pacientes que lo necesitan. Un método puede comprender la administración en un sujeto que lo necesita de una actividad eficaz de antagonista de activina-ActR11a. La exposición proporciona métodos para incrementar los niveles de glóbulos rojos y la formación de hueso en un paciente que lo necesita. Un método puede comprender la administración en un sujeto que lo necesita de una actividad eficaz de antagonista de activina-ActR11a. La exposición demuestra que, en roedores, los antagonistas de activina-ActR11a incrementar los niveles celulares de precursores eritroides principalmente mediante los efectos sobre el bazo. De acuerdo con lo anterior, la exposición proporciona métodos para incrementar la liberación de glóbulos rojos a partir del bazo, comprendiendo el método la administración en el paciente de una cantidad eficaz de un antagonista de activina-ActR11a. La exposición proporciona usos de los antagonistas de activina-ActR11a para preparar un medicamento destinado al tratamiento de un trastorno o condición tal como se indica en la presente memoria.

La exposición proporciona un método para identificar un agente que estimula la producción de glóbulos rojos. El método comprende: a) identificar un agente de ensayo que se une a activina o un dominio de unión a ligando de un polipéptido ActR11a, y b) evaluar el efecto del agente sobre los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina y/o niveles de precursores de glóbulos rojos (p.ej., los niveles de reticulocitos).

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la purificación de ActR11a-Fc_h expresado en células CHO. La proteína se purifica en forma de un único pico bien definido según se visualiza mediante la columna de exclusión molecular (panel izquierdo) y SDS-PAGE con tinción de Coomassie (panel derecho) (carril izquierdo: estándares de peso molecular; carril derecho: ActR11a-Fc_h).

La figura 2 muestra la unión de ActR11a-Fc_h a activina y GDF-11, medida mediante ensayo BiaCore™.

La figura 3 muestra los efectos de ActR11a-Fc_h sobre los recuentos de glóbulos rojos en primates no humanos hembra. Se trataron monos Cynomolgus hembra (cuatro grupos de cinco monos cada uno) con placebo o 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg de ActR11a-Fc_h los días 0, 7, 14 y 21. La figura 3A muestra los recuentos de glóbulos rojos (GR). La figura 3B muestra los niveles de hemoglobina. La significancia estadística es respecto a la línea base para cada grupo de tratamiento. El día 57, quedaban dos monos en cada grupo.

La figura 4 muestra los efectos de ActR11a-Fc_h sobre los recuentos de glóbulos rojos en primates no humanos macho. Se trataron monos Cynomolgus macho (cuatro grupos de cinco monos cada uno) con placebo o 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg de ActR11a-Fc_h los días 0, 7, 14 y 21. La figura 4A muestra los recuentos de glóbulos rojos (GR). La figura 4B muestra los niveles de hemoglobina. La significancia estadística es respecto a la línea base para cada grupo de tratamiento. El día 57, quedaban dos monos en cada grupo.

La figura 5 muestra los efectos de ActR11a-Fc_h sobre los recuentos de reticulocitos en primates no humanos hembra. Se trataron monos Cynomolgus (cuatro grupos de cinco monos cada uno) con placebo o 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg de ActR11a-Fc_h los días 0, 7, 14 y 21. La figura 5A muestra los recuentos absolutos de reticulocitos. La figura 5B muestra el porcentaje de reticulocitos respecto a los GR. La significancia estadística es respecto a la línea base para cada grupo. El día 57, quedaban dos monos en cada grupo.

La figura 6 muestra los efectos de ActR11a-Fc_h sobre los recuentos de reticulocitos en primates no humanos hembra. Se trataron monos Cynomolgus (cuatro grupos de cinco monos cada uno) con placebo o 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg de ActR11a-Fc_h los días 0, 7, 14 y 21. La figura 6A muestra los recuentos absolutos de

reticulocitos. La figura 6B muestra el porcentaje de reticulocitos respecto a los GR. La significancia estadística es respecto a la línea base para cada grupo. El día 57, quedaban dos monos en cada grupo.

La figura 7 muestra los resultados del ensayo clínico humano descrito en el Ejemplo 5, en el que la superficie bajo la curva (SBC) y la dosis administrada de ActRIIa-Fc_h presentan una correlación lineal, con independencia de si se administra ActRIIa-Fc_h por vía intravenosa (IV) o subcutánea (SC).

La figura 8 muestra una comparación de los niveles séricos de ActRIIa-Fc_h en pacientes administrados IV o SC. La figura 9 muestra los niveles de fosfatasa alcalina ósea (FAO) en respuesta a niveles de dosis diferentes de ActRIIa-Fc_h. La FAO es un marcador del crecimiento óseo anabólico.

La figura 10 ilustra la mediana de cambio respecto de la línea base de los niveles de hematocrito del ensayo clínico humano descrito en el Ejemplo 5. Se administró ActRIIa-Fc_h por vía intravenosa (IV) a la dosis indicada.

La figura 11 ilustra la mediana de cambio respecto de la línea base de los niveles de hemoglobina del ensayo clínico humano descrito en el Ejemplo 5. Se administró ActRIIa-Fc_h por vía intravenosa (IV) a la dosis indicada.

La figura 12 ilustra la mediana de cambio respecto de la línea base de recuento de GR (glóbulos rojos) del ensayo clínico humano descrito en el Ejemplo 5. Se administró ActRIIa-Fc_h por vía intravenosa (IV) a la dosis indicada.

La figura 13 ilustra la mediana de cambio respecto de la línea base de reticulocitos del ensayo clínico humano descrito en el Ejemplo 5. Se administró ActRIIa-Fc_h por vía intravenosa (IV) a la dosis indicada.

La figura 14 muestra una alineación de ActRIIa y ActRIIB humanas con los residuos que se deducen en la presente memoria, basada en el análisis compuesto de múltiples estructuras cristalinas de ActRIIB y ActRIIA de ligando de contacto directo (el bolsillo de unión a ligando) indicadas con cajas.

La figura 15 muestra el efecto de ActRIIA-Fc_m sobre el hematocrito en un modelo de ratón de anemia inducida por quimioterapia. Los datos son medias \pm SEM. * P < 0.05 vs. Vehículo en el mismo punto temporal. Una dosis única de ActRIIA-Fc_m antes de la quimioterapia evitó la caída del nivel de hematocrito que de lo contrario se observaba tras la administración del quimioterapéutico paclitaxel.

La figura 16 muestra el efecto dependiente de la dosis de ActRIIA-Fc_m sobre el hematocrito en un modelo de ratón de anemia inducida por quimioterapia. Los datos son medias \pm SEM. **, P < 0,01; ***, P < 0,001 vs. vehículo en el mismo punto temporal. Dos semanas después de la administración de paclitaxel, el tratamiento de ActRIIA-Fc_m incrementó el nivel de hematocrito como función del número de dosis.

La figura 17 muestra el efecto de ActRIIA-Fc_m sobre el hematocrito en un modelo de ratón parcialmente nefroctemizado (NEPHX) de enfermedad renal crónica. Los datos son medias \pm SEM. * P < 0.05 vs. Vehículo en el mismo punto temporal. El tratamiento de ActRIIA-Fc_m evitó la caída del nivel de hematocrito que de lo contrario se observaba a las 4 semanas y produjo una tendencia beneficiosa en el hematocrito a las 8 semanas.

Descripción detallada de la invención

1. Descripción general

La superfamilia del factor beta de crecimiento transformante (TGF-beta, por sus siglas en inglés) contiene una diversidad de factores que comparten elementos de secuencia y motivos estructurales comunes. Es conocido que dichas proteínas ejercen efectos biológicos sobre una gran diversidad de tipo celulares tanto en vertebrados como invertebrados. Los miembros de la superfamilia llevan a cabo importantes funciones durante el desarrollo embrionario en la formación de patrones y la determinación de tejidos y puede incluir en una diversidad de procesos de diferenciación, incluyendo la adipogénesis, la miogénesis, la condrogénesis, la cardiogénesis, la hematopoyesis, la neurogénesis y la diferenciación de las células epiteliales. La familia se divide en dos ramas generales: la rama BMP/GDF y la rama TGF-beta/activina/BMP 10, cuyos miembros presentan efectos diversos, con frecuencia complementarios. Mediante la manipulación de la actividad de un miembro de la familia de TGF-beta, con frecuencia resulta posible causar cambios fisiológicos significativos en un organismo. Por ejemplo, las razas de ganado piedmontesa y azul belga portan una mutación de pérdida de función en el gen de GDF8 (también denominado miostatina) que causa un incremento marcado de la masa muscular. Grobet et al., Nat. Genet. 17(1):714, 1997. Además, en el ser humano, los alelos inactivos de GDF8 están asociados a una masa muscular incrementada y, según los informes, una fuerza excepcional. Schuelke et al., N. Engl. J. Med. 350:2682-8, 2004.

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

y/o unirse a la activina se incluyen la folistatina (FS), la proteína relacionada con la folistatina (FSRP) y la macroglobulina α_2 .

Las señales de TGF- β están mediadas por complejos heteroméricos de receptores de treonina quinasa de tipos I y II, que fosforilan y activan las proteínas Smad corriente abajo con la estimulación por ligando (Massagué, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178, 2000). Dichos receptores de tipos I y II son proteínas transmembranales, compuestas de un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteínas, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático con especificidad de serina/treonina predicha. Los receptores de tipo I resultan esenciales para la señalización y los receptores de tipo II resultan necesarios para ligandos de unión y para la expresión de receptores de tipo I. Los receptores de activina de tipos I y II forman un complejo estable después de la unión de ligando, resultando en la fosforilación de los receptores de tipo I por receptores de tipo II.

Se han identificado dos receptores relacionados de tipo II (ActRII): ActRIIa y ActRIIb, como receptores de tipo II de las activinas (Mathews y Vale, Cell 65:973-982, 1991; Attisano et al., Cell 68: 97-108, 1992). Aparte de las activinas, ActRIIa y ActRIIb pueden interactuar bioquímicamente con varias otras proteínas de la familia de TGF- β , incluyendo BMP7, Nodal, GDF8 y GDF11 (Yamashita et al., J. Cell Biol. 130:217-226, 1995; Lee y McPherron, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311, 2001; Yeo y Whitman, Mol. Cell 7: 949-957, 2001; Oh et al., Genes Dev. 16:2749-54, 2002). ALK4 es el receptor de tipo I primario para las activinas, particularmente para la activina A y ALK-7 también puede servir como receptor para las activinas, particularmente para la activina B.

Tal como se demuestra en la presente memoria, un polipéptido ActRIIa soluble (ActRIIa_s), que muestra una preferencia sustancial en la unión a la activina A al contrario que otros elementos de la familia de TGF-beta, tal como GDF8 o GDF11, resulta eficaz para incrementar los niveles *in vivo* de glóbulos rojos. Aunque sin deseo de restringirse a ningún mecanismo particular, se espera que el efecto de ActRIIa_s está causado principalmente por un efecto antagonista de la activina, dada la unión muy fuerte a la activina (constante de disociación picomolar) mostrada por el constructo particular de ActRIIa_s utilizado en dichos estudios. Con independencia del mecanismo, resulta evidente a partir de dicha exposición que los antagonistas de ActRIIa-activina incrementan los niveles de glóbulos rojos en roedores, monos y seres humanos. Debe indicarse que la hematopoyesis es un proceso complejo, regulado por una diversidad de factores, incluyendo la homeostasis de la eritropoyetina, G-CSF y hierro. Las expresiones "incrementa los niveles de glóbulos rojos" y "estimula la formación de glóbulos rojos" se refieren a medidas observables clínicamente, tales como las medidas de hematocrito, recuentos de glóbulos rojos y hemoglobina, y pretenden ser neutras respecto al mecanismo por el que se producen dichos cambios.

Los datos informados en la presente memoria con respecto a los primates no humanos también son reproducibles en ratones, ratas y seres humanos y, por lo tanto, la presente exposición proporciona métodos para utilizar los polipéptidos ActRIIa y otros antagonistas de activina-ActRIIa para estimular la producción de glóbulos rojos e incrementar los niveles de glóbulos rojos en mamíferos, de roedores a seres humanos. Entre los antagonistas de activina-ActRIIa se incluyen, por ejemplo, polipéptidos ActRIIa solubles de unión a activina, anticuerpos que se unen a activina (particularmente las subunidades activina A o B, también denominados βA o βB) y alteran la unión de ActRIIa, anticuerpos que se unen a ActRIIa y alteran la unión de la activina, las proteínas no anticuerpos seleccionados para la unión de activina o ActRIIa (ver, p.ej., el documento n° WO 2002/088171, n° WO 2006/055689 y n° WO 2002/032925 para ejemplos de dichas proteínas y métodos de diseño y selección de las mismas), péptidos aleatorizados seleccionados para la unión a activina o ActRIIa, con frecuencia fijos a un dominio Fc. Pueden unirse entre sí dos proteínas diferentes (u otras fracciones) con actividad de unión a activina o ActRIIa, especialmente ligantes de activina que bloquean los sitios de unión de tipo I (p.ej., un receptor de activina de tipo I soluble) y de tipo II (p.ej., un receptor de activina de tipo II soluble), respectivamente, para crear una molécula de unión bifuncional. Los aptámeros de ácidos nucleicos, moléculas pequeñas y otros agentes que inhiben el eje de señalización de activina-ActRIIa están incluidos como antagonistas de activina-ActRIIa. Diversas proteínas presentan actividad antagonista de activina-ActRIIa, incluyendo la inhibina (es decir, la subunidad alfa de la inhibina), aunque la inhibina no antagoniza universalmente la activina en todos los tejidos, la folistatina (p.ej., la folistatina-288 y la folistatina-315), FSRP, FLRG, activina C, macroglobulina alfa(2) y una activina A mutante M1081 (cambio de metionina por alanina en la posición 108). Generalmente, las formas alternativas de activina, particularmente aquellas con alteraciones en el dominio de unión a receptor de tipo I, pueden unirse a receptores de tipo II y no consiguen formar un complejo ternario activo, actuando de esta manera como antagonistas. Adicionalmente, pueden utilizarse ácidos nucleicos, tales como moléculas antisentido, ARNip o ribozimas que inhiben la activina A, B, C o E, o particularmente, la expresión de ActRIIa, como antagonistas de activina-ActRIIa. El antagonista de activina-ActRIIa que debe utilizarse puede mostrar selectividad para la inhibición de la señalización mediada por activina frente a otros miembros de la familia de TGF-beta, y particularmente con respecto a GDF8 y GDF11.

Los términos utilizados en la presente especificación generalmente presentan sus significados ordinarios en la materia, dentro del contexto de la presente invención y en el contexto específico en el que se utiliza cada término. Determinados términos se comentan posteriormente o en otros sitios de la especificación, para proporcionar una guía adicional para el profesional en la descripción de las composiciones y métodos de la invención y sobre cómo prepararlos y utilizarlos. El alcance o significado de cualquier uso de un término resultará evidente a partir del contexto específico en el que se utilice el término.

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

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

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

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

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

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

2. Polipéptidos ActR11a

En la presente memoria se dan a conocer polipéptidos ActR11a. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “ActR11a” se refiere a una familia de proteínas de receptor de activina de tipo IIa (ActR11a) de cualesquiera especies y variantes derivadas de dichas proteínas ActR11a mediante mutagénesis u otra modificación. La referencia a ActR11a en la presente memoria se entiende como una referencia a cualquiera de las formas actualmente identificadas. Los miembros de la familia de ActR11a son generalmente proteínas transmembranales, compuestas de un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteínas, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático con actividad de serina/treonina quinasa predicha.

La expresión “polipéptido ActR11a” incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido natural de un miembro de la familia de ActR11a, así como cualesquiera variantes del mismo (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticos) que conservan una actividad útil. Ver, por ejemplo, el documento n° WO 2006/012627. Por ejemplo, entre los polipéptidos ActR11a se incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier ActR11a conocido con una secuencia por lo menos aproximadamente 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido ActR11a, y opcionalmente con una identidad de por lo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o superior. Por ejemplo, un polipéptido ActR11a dado a conocer en la presente memoria puede unirse e inhibir la función de una proteína ActR11a y/o activina. Puede seleccionarse un polipéptido ActR11a para la actividad en la estimulación de la formación *in vivo* de glóbulos rojos. Entre los ejemplos de polipéptidos ActR11a se incluyen el polipéptido precursor de ActR11a humano (SEC ID n° 1) y polipéptidos ActR11a humanos solubles (p.ej., SEC ID n° 2, n° 3, n° 7 y n° 12).

La secuencia de la proteína precursora de ActR11a humana es la siguiente:

MGAAAKLAFVFLISCSSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEP
CYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSP
EVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM EVTQPTS NPVTPKPPYYNILLYSLVPL
 MLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLVPTQDPGPPPPSPLLGLKPLQLE
 VKARGRFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKHEN
 ILQFIGAEKRGTSDVDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVVSWNELCHIAE
 TMARGLAYLHEDIPLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFL
 ALKFEAGKSAGDTHGQVTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGL
 VLWELASRCTAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEDMQEVVVHKKRPVL
 RDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMORLTNIIT
 TEDIVTVVTMVTNVDFPPKESL (SEC ID nº 1)

5 El péptido de señal presenta un subrayado simple; el dominio extracelular está en negrita y los sitios potenciales de glucosilación N-ligada presentan un subrayado doble.

10 La secuencia de la proteína procesada de ActR11a humano soluble (extracelular) es la siguiente:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISG
 SIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSP**EVYFCCCEGNMCNEKFSYFP**
EM EVTQPTS NPVTPKPP (SEC ID nº 2)

15 La "cola" C-terminal del dominio extracelular está subrayado. La secuencia con la "cola" deletionada (una secuencia Δ15) es la siguiente:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISG
 SIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSP**EVYFCCCEGNMCNEKFSYFP**
 EM (SEC ID nº 3)

20 La secuencia de ácido nucleico codificante de la proteína precursora de ActR11a humana es la siguiente (nucleótidos 164 a 1705 de GenBank entrada nº NM_001616):

ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGCCGTCTTTCTTATCTCCTGTT
 CTTCAAGTGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTCTT
 TAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAAACCG
 TGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGA
 ATATTTCTGGTTCCATTGAAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGA
 TATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCT
 GAAGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTT
 CTTATTTTCCAGAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTAC
 ACCTAAGCCACCCTATTACAACATCCTGCTCTATTCTTGGTGCCACTT
 ATGTTAATTGCGGGGATTGTCAATTTGTGCATTTTGGGTGTACAGGCATC
 ACAAGATGGCCTACCCTCCTGTACTTGTTCCTCAACTCAAGACCCAGGACC
 ACCCCACCTTCTCCATTACTAGGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAA

GTGAAAGCAAGGGGAAGATTTGGTTGTGTCTGGAAAGCCCAGTTGCTTA
 ACGAATATGTGGCTGTCAAATATTTCCAATACAGGACAAACAGTCATG
 GCAAAATGAATACGAAGTCTACAGTTTGCCTGGAATGAAGCATGAGAAC
 ATATTACAGTTCATTGGTGCAGAAAAACGAGGCACCAGTGTGATGTGG
 ATCTTTGGCTGATCACAGCATTTCATGAAAAGGGTTCACATCAGACTT
 TCTTAAGGCTAATGTGGTCTCTTGAATGAACTGTGTGCATATTGCAGAA
 ACCATGGCTAGAGGATTGGCATATTTACATGAGGATATACCTGGCCTAA
 AAGATGGCCACAAACCTGCCATATCTCACAGGGACATCAAAGTAAAAA
 TGTGCTGTTGAAAAACAACCTGACAGCTTGCATTGCTGACTTTGGGTTG
 GCCTTAAAATTTGAGGCTGGCAAGTCTGCAGGCGATACCCATGGACAGG
 TTGGTACCCGGAGGTACATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTGTATAAA
 CTCCAAGGGATGCATTTTTGAGGATAGATATGTATGCCATGGGATTA
 GTCCTATGGGAACTGGCTTCTCGCTGTACTGCTGCAGATGGACCTGTAG
 ATGAATACATGTTGCCATTTGAGGAGGAAATGGCCAGCATCCATCTCT
 TGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGTGCATAAAAAAAGAGGCCTGTTTTA
 AGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGAATGGCAATGCTCTGTGAAACCA
 TTGAAGAATGTTGGGATCACGACGCAGAAGCCAGTTATCAGCTGGATG
 TGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCAGAGACTAACAAATATTATTACC
 ACAGAGGACATTGTAACAGTGGTCACAATGGTGACAAATGTTGACTTTC
 CTCCCAAAGAATCTAGTCTATGA (SEC ID nº 4)

La secuencia de ácido nucleico codificante del polipéptido (extracelular) soluble ActR11a humano es la siguiente:

5

ATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATT
 GGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGTAACCGTGTATGGTGA
 CAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGT
 TCCATTGAAATAGTGAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCT
 ATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTT
 TTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCA
 GAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCAC
 CC (SEC ID nº 5)

Se dan a conocer en la presente memoria polipéptidos ActR11a solubles. Tal como se indica en la presente memoria, la expresión "polipéptido ActR11a soluble" se refiere de manera general a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ActR11a. La expresión "polipéptido ActR11a soluble", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye cualquier dominio extracelular natural de una proteína ActR11a, así como cualesquiera variantes de la misma (incluyendo mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas). Un polipéptido ActR11a de unión a activina es uno que conserva la capacidad de unirse a la activina, incluyendo, por ejemplo, activina AA, AB, BB o formas que incluye una subunidad C o E. Opcionalmente, un polipéptido ActR11a de unión a activina se unirá a activina AA con una constante de disociación de 1 nM o inferior. El dominio extracelular de una proteína ActR11a se une a la activina y es generalmente soluble bajo condiciones fisiológicas, y de esta manera, puede denominarse polipéptido ActR11a de unión a activina soluble. Entre los ejemplos de polipéptidos ActR11a de unión a activina solubles se incluyen los polipéptidos solubles ilustrados en SEC ID nº 2, nº 3, nº 7, nº 12 y nº 13. La SEC ID nº 7 se denomina ActR11a-Fc_h, y se describe adicionalmente en los Ejemplos. Otros ejemplos de polipéptidos ActR11a de unión a activina solubles comprenden una secuencia de señal además del dominio extracelular de la proteína ActR11a, por ejemplo, la secuencia líder de la melitina de la abeja melífera (SEC ID nº 8), el líder del activador de plasminógeno tisular (APT) (SEC ID nº

10

15

20

9) o el líder de ActRIIa nativo (SEC ID nº 10). El polipéptido ActRIIa-Fc_h ilustrado en SEC ID nº 13 utiliza un líder de APT:

Una fórmula general para una proteína ActRIIa variante activa es una que comprende los aminoácidos 12 a 82 de la SEC ID nº 2, respectivamente, aunque opcionalmente partiendo de un aposición comprendida entre 1 y 5 o entre 3 y 5 y terminando en una posición comprendida entre 110 y 116 o entre 110 y 115, respectivamente, y que comprende no más de 1, 2, 5, 10 o 15 cambios conservadores de aminoácidos en el bolsillo de unión a ligando, y cero, una o más alteraciones no conservadoras en las posiciones 40, 53, 55, 74, 79 y/o 82 en el bolsillo de unión a ligando. Dicha proteína puede comprender una secuencia de aminoácidos que conserva una identidad de secuencia superior a 80%, 90%, 95% o 99% respecto a la secuencia de aminoácidos 29-109 de SEC ID nº 2.

Pueden obtenerse fragmentos funcionalmente activos de polipéptidos ActRIIa mediante el cribado de polipéptidos producidos recombinantemente a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico codificante de un polipéptido ActRIIa. Además, pueden sintetizarse químicamente fragmentos utilizando técnicas conocidas, tales como la reacción de f-Moc o t-Boc en fase sólida de Merrifield convencional. Los fragmentos pueden producirse (recombinantemente o mediante síntesis química) y someterse a ensayo para identificar aquellos fragmentos peptídico que pueden funcionar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRIIa o de la señalización mediada por activina.

Las variantes funcionalmente activas de los polipéptidos ActRIIa pueden obtenerse mediante el cribado de bibliotecas de polipéptidos modificados producidos recombinantemente a partir de los ácidos nucleicos mutagenizados correspondientes codificantes de un polipéptido ActRIIa. Pueden producirse variantes y someterse a ensayo para identificar aquellos que pueden funcionar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRIIa o de la señalización mediada por activina. Una variante funcional de los polipéptidos ActRIIa puede comprender una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 75% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID nº 2 o nº 3. En determinados casos, la variante funcional presenta una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID nº 2 o nº 3.

Pueden generarse variantes funcionales mediante la modificación de la estructura de un polipéptido ActRIIa para fines tales como la potenciación de la eficacia terapéutica, o la estabilidad (p.ej., la vida útil *ex vivo* y la resistencia a la degradación proteolítica *in vivo*). Dichos polipéptidos ActRIIa modificados, al seleccionarlos para conservar la unión a la activina, se consideran equivalentes funcionales de los polipéptidos ActRIIa naturales. También pueden producirse polipéptidos ActRIIa modificados, por ejemplo, mediante sustitución, delección o adición de aminoácidos. Por ejemplo, resulta razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina, o una sustitución similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado (p.ej., mutaciones conservadoras) no presentará un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Las sustituciones conservadoras son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados por sus cadenas laterales. Puede determinarse fácilmente si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActRIIa resulta en un homólogo funcional mediante evaluación de la capacidad del polipéptido ActRIIa variante de producir una respuesta en células de una manera similar al polipéptido ActRIIa de tipo salvaje.

Pueden producirse mutaciones específicas de los polipéptidos ActRIIa de manera que se altere la glucosilación del polipéptido. Dichas mutaciones pueden seleccionarse para introducir o eliminar uno o más sitios de glucosilación, tal como sitios de glucosilación unidos a O o unidos a N. Los sitios de reconocimiento de glucosilación unidos a asparagina generalmente comprenden una secuencia de tripéptido: asparagina-X-treonina o asparagina-X-serina (en donde "X" es cualquier aminoácido) que resulta específicamente reconocida por enzimas celulares de glucosilación apropiados. La alteración también puede llevarse a cabo mediante la adición o la sustitución de uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del polipéptido ActRIIa de tipo salvaje (para los sitios de glucosilación unidos a O). Una diversidad de sustituciones o delecciones de aminoácidos en una o ambas de la primera o tercera posición aminoácida de un sitio de reconocimiento de glucosilación (y/o una delección de aminoácido en la segunda posición) resulta en la no glucosilación en la secuencia de tripéptido modificada. Otro medio para incrementar el número de fracciones carbohidrato en un polipéptido ActRIIa es mediante el acoplamiento químico o enzimático de glucósidos con el polipéptido ActRIIa. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el azúcar o azúcares pueden unirse a: (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres, tales como los presentes en la cisteína, (d) grupos hidroxilo libres, tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos, tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina. La eliminación de una o más fracciones carbohidrato presente en un polipéptido ActRIIa puede llevarse a cabo química y/o enzimáticamente. La desglucosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido ActRIIa al compuesto ácido trifluorometanosulfónico o un compuesto equivalente. Dicho tratamiento resulta en el corte de la mayoría o todos los azúcares, excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando intacto simultáneamente la secuencia de aminoácidos. El corte enzimático de las fracciones carbohidrato en los polipéptidos ActRIIa puede conseguirse mediante la utilización de una diversidad de endoglucosidasas y exoglucosidasas, tal como se indica en Thotakura et al., Meth. Enzymol. 138-350, 1987). La secuencia de un polipéptido ActRIIa puede ajustarse, según resulte apropiado, según el tipo de sistema de expresión utilizado, ya que las células de mamífero, levadura, insecto y vegetales todas pueden introducir diferentes patrones de glucosilación que pueden resultar afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas ActRIIa para la utilización en el ser humano pueden

expresarse en una línea celular de mamífero que proporciona la glucosilación correcta, tal como las líneas celulares HEK293 o CHO, aunque se espera que otras líneas celulares de expresión de mamífero también resulten útiles. Pueden utilizarse otras líneas celulares no de mamífero (p.ej., levaduras, *E. coli*, células de insecto) y, en algunos casos, dichas líneas celulares pueden manipularse para incluir enzimas que proporcionan patrones de glucosilación de tipo mamífero sobre las proteínas expresadas.

Dicha exposición contempla además un método de generación de mutantes, particularmente grupos de mutantes combinatoriales de un polipéptido ActRIIa, así como mutantes por truncado; los pools de mutantes combinatoriales resultan especialmente útiles para identificar las secuencias variantes funcionales. El propósito del cribado de dichas bibliotecas combinatoriales pueden ser la generación de, por ejemplo, variantes de polipéptido ActRIIa que se unen a la activina o a otros ligandos. Posteriormente se proporciona una diversidad de ensayos de cribado, y dichos ensayos pueden utilizarse para evaluar variantes. Por ejemplo, puede cribarse una variante de polipéptido ActRIIa para la capacidad de unirse a un ligando de ActRIIa, para evitar la unión de un ligando de ActRIIa a un polipéptido ActRIIa o para interferir con la señalización causada por un ligando de ActRIIa.

La actividad de un polipéptido ActRIIa o sus variantes también puede someterse a ensayo en un ensayo celular o *in vivo*. Por ejemplo, se evaluó el efecto de una variante de polipéptido ActRIIa sobre la expresión de genes que participan en la hematopoyesis. Lo anterior puede llevarse a cabo, según se requiera, en presencia de una o más proteínas ligando de ActRIIa recombinantes (p.ej., activina) y las células pueden transfectarse para producir un polipéptido ActRIIa y/o variantes del mismo, y opcionalmente un ligando de ActRIIa. De manera similar, puede administrarse un polipéptido ActRIIa en un ratón o en otro animal, y pueden evaluarse una o más mediciones sanguíneas, tales como un recuento de GR, hemoglobina o recuento de reticulocitos.

Pueden generarse variantes derivadas combinatorialmente que presentan una potencia selectiva o generalmente incrementada respecto a un polipéptido ActRIIa natural. De manera similar, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que presentan semividas intracelulares drásticamente diferentes de las correspondientes a un polipéptido ActRIIa de tipo salvaje. Por ejemplo, la proteína alterada puede convertirse en más estable o menos estables frente a la degradación proteolítica u otros procesos celulares que resultan en la destrucción o bien inactivación del polipéptido ActRIIa nativo. Dichas variantes y los genes que las codifican pueden utilizarse para alterar los niveles de polipéptido ActRIIa mediante la modulación de la semivida de los polipéptidos ActRIIa. Por ejemplo, una semivida corta puede dar lugar a más efectos biológicos transitorios y, en el caso de ser una parte de un sistema de expresión inducible, puede permitir un control más estrecho de los niveles de polipéptido ActRIIa recombinante dentro de la célula. En una proteína de fusión de Fc, pueden realizarse mutaciones en el conector (en su caso) y/o la parte Fc para alterar la semivida de la proteína.

Puede producirse una biblioteca combinatorial mediante una biblioteca degenerada de genes codificantes de una biblioteca de polipéptidos cada uno de los cuales incluye por lo menos una parte de potenciales secuencias de polipéptido ActRIIa. Por ejemplo, una mezcla de oligonucleótidos sintéticos puede ligarse enzimáticamente en secuencias génicas de manera que el conjunto degenerado de potenciales secuencias de nucleótidos del polipéptido ActRIIa sea expresable como polipéptidos individuales, o alternativamente, en forma de un conjunto de proteínas de fusión más grandes (p.ej., para la expresión fágica).

Existen muchas maneras por las que puede generarse la biblioteca de potenciales homólogos a partir de una secuencia oligonucleótida degenerada. Puede llevarse a cabo la síntesis química de una secuencia génica degenerada en un sintetizador automático de ADN y a continuación los genes sintéticos pueden ligarse en un vector apropiado para la expresión. La síntesis de oligonucleótidos degenerados es bien conocida de la técnica (ver, por ejemplo, Narang, S.A., *Tetrahedron* 39:3, 1983; Itakura et al., *Recombinant DNA Proc.*, 3rd Cleveland Sympos. *Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier, páginas 273 a 289, 1981; Itakura et al., *Annu. Rev. Biochem.* 53:323, 1984; Itakura et al., *Science* 198:1056, 1984; Ike et al., *Nucleic Acid Res.* 11:477, 1983). Dichas técnicas se han utilizado en la evolución directa de otras proteínas (ver, por ejemplo, Scott et al., *Science* 249:386-390, 1990; Roberts et al., *PNAS USA* 89:2429-2433, 1992; Devlin et al., *Science* 249: 404-406, 1990; Cwirla et al., *PNAS USA* 87: 6378-6382, 1990, así como las patentes US nº 5.223.409, nº 5.198.346 y nº 5,096,815).

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

Se conoce de la técnica un amplio abanico de técnicas de cribado de productos génicos de bibliotecas combinatoriales producidos mediante mutaciones puntuales y truncados y, igualmente, de cribado de bibliotecas de ADNc para productos génicos con una determinada propiedad. Dichas técnicas generalmente son adaptables al cribado rápido de las bibliotecas génicas generadas mediante la mutagénesis combinatorial de polipéptidos ActR11a. Las técnicas más ampliamente utilizadas para el cribado de bibliotecas génicas grandes típicamente comprenden la clonación de la biblioteca génica en vectores de expresión replicables, la transformación de células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante y la expresión de los genes combinatoriales bajo condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento relativamente fácil del vector codificante del gen cuyo producto se ha detectado. Entre los ensayos preferentes se incluyen ensayos de unión a activina y ensayos de señalización celular mediados por activina.

Los polipéptidos ActR11a utilizados en la invención pueden comprender además modificaciones post-traduccionales además de cualesquiera presentes naturalmente en los polipéptidos ActR11a. Entre dichas modificaciones se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos ActR11a modificados pueden contener elementos no aminoácidos, tales como polietilenglicoles, lípidos polisacáridos o monosacáridos, y fosfatos. Los efectos de dichos elementos no aminoácidos sobre la funcionalidad de un polipéptido ActR11a pueden someterse a ensayo tal como se indica en la presente memoria para otras variantes de polipéptido ActR11a. Al producir un polipéptido ActR11a en las células mediante el corte de una forma naciente del polipéptido ActR11a, el procesamiento post-traducciona también puede resultar importante para el pliegue y/o función correctos de la proteína. Diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) presentan una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades post-traduccionales y pueden seleccionarse para garantizar la modificación y procesamiento correctos de los polipéptidos ActR11a.

Entre las variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos ActR11a pueden incluirse proteínas de fusión que presentan por lo menos una parte de los polipéptidos ActR11a y uno o más dominios de fusión. Entre los ejemplos bien conocidos de dichos dominios de fusión se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, polihistidina, Glu-Glu, glutatión-S-transferasa (GST), tiorredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada (Fc) de inmunoglobulina, proteína de unión a maltosa (MBP) o albúmina sérica humana. Puede seleccionarse un dominio de fusión de manera que confiera una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión resultan particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad. Para los fines de la purificación por afinidad, se utilizan matrices relevantes para cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas con glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Muchas de dichas matrices se encuentran disponibles en forma de "kit", tal como el sistema de purificación de GST de Pharmacia y el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil con parejas de fusión (HIS)₆. A título de otro ejemplo, puede seleccionarse un dominio de fusión de manera que facilite la detección de los polipéptidos ActR11a. Entre los ejemplos de dichos dominios de detección se incluyen las diversas proteínas fluorescentes (p.ej., GFP), así como "etiquetas epítipo", que habitualmente son secuencias peptídicas cortas para las que se encuentra disponible un anticuerpo específico. Entre las etiquetas epítipo bien conocidas para las que se encuentran fácilmente disponibles anticuerpos monoclonales específicos se incluyen las etiquetas hemaglutinina del virus influenza FLAG (HA) y c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión presentan un sitio de corte de proteasa, tal como para el Factor Xa o la trombina, que permite que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y de esta manera libere las proteínas recombinantes a partir de las mismas. A continuación, pueden aislarse las proteínas liberadas del dominio de fusión mediante posterior separación cromatográfica. En determinadas realizaciones preferentes, se fusiona un polipéptido ActR11a con un dominio que estabiliza el polipéptido ActR11a *in vivo* (un dominio "estabilizador"). Por "estabilización" se entiende cualquier cosa que incremente la semivida sérica, con independencia de que ello se deba a una destrucción reducida, eliminación reducida por el riñón u otro efecto farmacológico. Las fusiones con la parte Fc de una inmunoglobulina es conocido que confieren propiedades farmacocinéticas en un amplio abanico de proteínas. Los dominios constantes de una inmunoglobulina, particularmente de una cadena pesada de IgG, también pueden utilizarse como dominios estabilizadores. De manera similar, las fusiones con albúmina sérica humana pueden conferir propiedades deseables. Entre otros tipos de dominios de fusión que pueden seleccionarse se incluyen dominios de multimerización (p.ej., dimerización, tetramerización) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, tal como la estimulación adicional del crecimiento muscular).

A título de ejemplo específico, la presente invención puede utilizar una proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de AcR11a fusionado con un dominio Fc. Se muestra un ejemplo de n dominio Fc de IgG1 posteriormente (SEC ID n° 6).

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD (A) VSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVP IEKTI SKAK
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
 PFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK*

Opcionalmente, el dominio Fc presenta una o más mutaciones en residuos tales como Asp-265, lisina-322 y Asn-434. En determinados casos, el dominio Fc mutante que presenta una o más de dichas mutaciones (p.ej., mutación Asp-265) presenta una capacidad reducida de unión al receptor de Fc γ respecto a un dominio Fc de tipo salvaje. En otros casos, el dominio Fc mutante que presenta una o más de dichas mutaciones (p.ej., la mutación Asn-434) presenta una capacidad incrementada de unión al receptor de Fc relacionado con el CMH de clase I (FcRN) en comparación con un dominio Fc de tipo salvaje. También pueden utilizarse dominios Fc de IgG2, IgG3 e IgG4.

Se entiende que pueden disponerse diferentes elementos de las proteínas de fusión de cualquier manera que resulte consistente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, puede introducirse un polipéptido ActRIIa en posición C-terminal respecto a un dominio heterólogo, o alternativamente, puede introducirse un dominio heterólogo en posición C-terminal respecto a un polipéptido ActRIIa. El dominio de polipéptido ActRIIa y el dominio heterólogo no necesita ser contiguo en una proteína de fusión, y pueden incluirse dominios o secuencias de aminoácidos adicionales en posición C-terminal o N-terminal respecto a cualquier dominio o entre los dominios.

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

En la presente memoria se dan a conocer formas aisladas y/o purificadas de los polipéptidos ActRIIa, que se aíslan a partir de, o se encuentran sustancialmente libres de, otras proteínas. Los polipéptidos ActRIIa generalmente se producen mediante expresión a partir de ácidos nucleicos recombinantes.

3. Ácidos nucleicos codificantes de polipéptidos ActRIIa

En la presente memoria se dan a conocer ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes codificantes de cualquiera de los polipéptidos ActRIIa (p.ej., polipéptidos ActRIIa solubles), incluyendo fragmentos, variantes funcionales y proteínas de fusión dadas a conocer en la presente memoria. Por ejemplo, la SEC ID n° 4 codifica el polipéptido precursor de ActRIIa humano natural, mientras que SEC ID n° 5 codifica el dominio extracelular procesado de ActRIIa. Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser de cadena sencilla o de doble cadena. Dichos ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Dichos ácidos nucleicos pueden utilizarse en, por ejemplo, métodos para generar polipéptidos ActRIIa o como agentes terapéuticos directos (p.ej., en un enfoque de terapia génica).

Entre los ácidos nucleicos de la invención codificantes de polipéptidos ActRIIa pueden incluirse ácidos nucleicos que son variantes de la SEC ID n° 4 o n° 5.

En la presente memoria se dan a conocer secuencias de ácidos nucleicos aislados o recombinantes que son por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticos a SEC ID n° 4 o n° 5. El experto ordinario en la materia apreciará que las secuencias de ácidos nucleicos complementarias a la SEC ID n° 4 o n° 5, y las variantes de SEC ID n° 4 o n° 5 también se dan a conocer en la presente memoria. Las secuencias de ácidos nucleicos pueden ser aisladas, recombinantes y/o fusionarse con una secuencia de nucleótidos heteróloga, o en una biblioteca de ADN.

En la presente memoria se dan a conocer ácidos nucleicos que incluyen secuencias de nucleótidos, y los polipéptidos ActRIIa codificados por dichos ácidos nucleicos, que se hibridan bajo condiciones altamente restrictivas con la secuencia de nucleótidos designada en la SEC ID n° 4 o n° 5, secuencia complementaria de la SEC ID n° 4 o n° 5 o fragmentos de la misma. Tal como se ha comentado anteriormente, el experto ordinario en la materia entenderá fácilmente que pueden modificarse las condiciones de astringencia apropiadas que fomentan la hibridación del ADN. El experto ordinario en la materia entenderá fácilmente que pueden modificarse las condiciones de astringencia apropiadas que fomentan la hibridación del ADN. Por ejemplo, podría llevarse a cabo la hibridación a 6,0x cloruro sódico/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45°C seguido de un lavado de 2,0x SSC a 50°C. Por ejemplo, la concentración salina en la etapa de lavado puede seleccionarse de una baja astringencia de aproximadamente 2,0x SSC a 50°C a una alta astringencia de aproximadamente 0,2x SSC a 50°C. Además, la temperatura en la etapa de lavado puede incrementarse de condiciones de baja astringencia a temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, a condiciones de alta astringencia a aproximadamente 65°C. Puede modificarse tanto la temperatura como la concentración salina, o puede mantenerse constante la temperatura o la concentración salina mientras se modifica la otra variable. En la presente memoria se dan a conocer ácidos nucleicos que se hibridan bajo condiciones de baja astringencia, de 6x SSC, a temperatura ambiente seguido de un lavado a 2x SSC a temperatura ambiente.

Los ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos indicados en la SEC ID nº 4 o nº 5 debido a la degeneración del código genético también se dan a conocer en la presente memoria. Por ejemplo, varios aminoácidos se designan por más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos para la histidina) pueden resultar en mutaciones "silenciosas", que no afectan a la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que existan entre las células de mamífero polimorfismos de secuencia de ADN que no conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la invención. El experto en la materia apreciará que pueden existir entre los individuos de una especie dada debido a la variación alélica natural dichas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente 3-5% de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos codificantes de una proteína particular. Todas y cada una de dichas variaciones de nucleótidos y los polimorfismos de aminoácidos resultantes se dan a conocer en la presente memoria.

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

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

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

Algunos vectores de expresión de mamífero contienen tanto secuencias procarióticas para facilitar la propagación del vector en bacterias, como una o más unidades de transcripción eucarióticas que se expresan en las células eucarióticas. Los vectores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamífero adecuados para la transfección de células eucarióticas. Algunos de dichos vectores se modifican con secuencias procedentes de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, a fin de facilitar la replicación y selección de resistencia a fármaco tanto en células procarióticas como eucarióticas. Alternativamente, pueden utilizarse derivados de virus, tales como el virus del papiloma bovino (BPV-1) o el virus de Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) para la expresión transitoria de proteínas en células eucarióticas. Pueden encontrarse ejemplos de otros sistemas de expresión víricos (incluyendo retrovíricos) posteriormente en la descripción de los sistemas de administración de terapia génica. Los diversos métodos utilizados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos huésped son bien conocidos de la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados para células tanto procarióticas como

eucarióticas, así como procedimientos generales de recombinación, ver *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3a ed., editado por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). En algunos casos, puede resultar deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante la utilización de un sistema de expresión baculovírico. Entre los ejemplos de dichos sistemas de expresión baculovírica se incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL 1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tal como pAcUW1) y vectores derivados de pBlueBac (tales como pBlueBac III que contiene β -gal).

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

La presente exposición se refiere además a una célula huésped transfecteda con un gen recombinante que incluye una secuencia codificante (p.ej., SEC ID n° 4 o n° 5) de uno o más de los polipéptidos ActRIIa de la invención. La célula huésped puede ser cualquier célula procariótica o eucariótica. Por ejemplo, puede expresarse un polipéptido ActRIIa tal como se da a conocer en la presente memoria en células bacterianas, tales como *E. coli*, células de insecto (p.ej., utilizando un sistema de expresión baculovírico), levaduras o células de mamífero. El experto en la materia conoce otras células huésped adecuadas.

De acuerdo con lo anterior, la presente exposición se refiere además a métodos para producir los polipéptidos ActRIIa de la invención. Por ejemplo, una célula huésped transfecteda con un vector de expresión codificante de un polipéptido ActRIIa puede cultivarse bajo condiciones apropiadas para permitir que ocurra la expresión del polipéptido ActRIIa. El polipéptido ActRIIa puede secretarse y aislarse a partir de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido ActRIIa. Alternativamente, el polipéptido ActRIIa puede retenerse citoplasmáticamente o en una fracción membranal y recolectarse las células, lisarse y aislarse la proteína. Un cultivo celular incluye células huésped y otros productos secundarios. Los medios adecuados para el cultivo celular son bien conocidos de la técnica. Los polipéptidos ActRIIa de la invención pueden aislarse a partir de medio de cultivo celular, células huésped o ambos, utilizando técnicas conocidas de purificación de proteínas, incluyendo la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de filtración en gel, la ultrafiltración, la electroforesis, la purificación por inmunoafinidad con anticuerpos específicos para epítopos particulares de los polipéptidos ActRIIa y la purificación de afinidad con un agente que se une a un dominio fusionado al polipéptido ActRIIa (p.ej., puede utilizarse una columna de proteína A para purificar una fusión ActRIIa-Fc). Preferentemente, el polipéptido ActRIIa es una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación. Preferentemente, la purificación se lleva a cabo mediante una serie de etapas de cromatografía de columna, incluyendo, por ejemplo, tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía en proteína A, cromatografía en sefrosa-Q, cromatografía en fenilsefrosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación puede completarse con filtración vírica e intercambio de tampones. Tal como se demuestra en la presente memoria, la proteína ActRIIa-Fc_h se purificó hasta una pureza >98% según se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaños y de >95% según se determinó mediante SDS PAGE. Dicho nivel de pureza resultó suficiente para conseguir resultados deseables en ratones, ratas, primates no humanos y seres humanos.

Un gen de fusión codificante de una secuencia líder de purificación, tal como la secuencia de sitio de corte de poli-(His)/enteroquinasa en el extremo N-terminal de la parte deseada del polipéptido ActRIIa recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina de metal Ni²⁺. La secuencia líder de purificación a continuación puede eliminarse mediante tratamiento con enteroquinasa, proporcionando el polipéptido ActRIIa purificado (p.ej., ver Hochuli et al., *J. Chromatography* 411:177, 1987, y Janknecht et al., *PNAS USA* 88:8972).

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

4. Antagonistas de activina y ActRIIa alternativos

Los datos presentados en la presente memoria demuestran que los antagonistas de la señalización de activina-ActRIIa pueden utilizarse para incrementar los niveles de glóbulos rojos o de hemoglobina. Aunque los polipéptidos ActRIIa solubles, y particularmente ActRIIa-Fc, son antagonistas preferentes, y aunque dichos antagonistas pueden afectar a los niveles de glóbulos rojos mediante un mecanismo diferente del antagonismo de activina (p.ej., la inhibición de la activina puede ser un indicador de la tendencia de un agente a inhibir las actividades de un espectro de moléculas,

incluyendo, quizá, otros miembros de la superfamilia de TGF-beta, y dicha inhibición colectiva puede conducir al efecto deseado sobre la hematopoyesis), se espera que otros tipos de antagonistas de activina-ActR11a resultan útiles, incluyendo los anticuerpos anti-activina (p.ej., activina β_A , β_B , β_C y β_E), anticuerpos anti-ActR11a, cadenas antisentido, ARNi o ácidos nucleicos ribozima que inhiben la producción de ActR11a, y otros inhibidores de la activina o de ActR11a, particularmente los que interfieren en la unión de activina-ActR11a.

Un anticuerpo que es específicamente reactivo con un polipéptido ActR11a (p.ej., un polipéptido ActR11a soluble) y que se une competitivamente a un ligando con el polipéptido ActR11a o, de otro modo, inhibe la señalización mediada por ActR11a, puede utilizarse como antagonista de las actividades del polipéptido ActR11a. De manera similar, un anticuerpo que sea específicamente reactivo con un polipéptido activina β_A , β_B , β_C o β_E , o cualquier heterodímero de los mismos, y que interfiere con la unión de ActR11a, puede utilizarse a modo de antagonista.

Mediante la utilización de inmunógenos derivados de un polipéptido ActR11a o un polipéptido activina, pueden prepararse antisueros anti-proteína/anti-péptido o anticuerpos monoclonales mediante protocolos estándares (ver, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual*, editado por Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Un mamífero, tal como un ratón, un hámster o un conejo, puede inmunizarse con una forma inmunogénica del polipéptido activina o ActR11a, un fragmento antigénico que sea capaz de inducir una respuesta de anticuerpos, o una proteína de fusión. Entre las técnicas para proporcionar inmunogenicidad a una proteína o péptido se incluyen la conjugación con portadores u otras técnicas bien conocidas. Puede administrarse una parte inmunogénica de un polipéptido ActR11a o activina en presencia de adyuvante. El avance de la inmunización puede monitorizarse mediante detección de los títulos de anticuerpo en plasma o suero. Puede utilizarse un ELISA estándar u otros inmunoensayos con el inmunógeno como antígeno a fin de evaluar los niveles de anticuerpos.

Tras la inmunización de un animal con una preparación antigénica de un polipéptido activina o ActR11a, pueden obtenerse antisueros y, si se desea, pueden aislarse anticuerpos policlonales a partir del suero. Para producir anticuerpos monoclonales, pueden recolectarse células productoras de anticuerpos (linfocitos) a partir de un animal inmunizado y fusionarse mediante procedimientos estándares de fusión de células somáticas con células inmortalizadas, tales como células de mieloma para rendir células de hibridoma. Dichas técnicas son bien conocidas y entre ellas se incluyen, por ejemplo, la técnica del hibridoma (originalmente desarrollada por Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495-497, 1975), la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbar et al., *Immunology Today*, 4: 72, 1983) y la técnica del hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. páginas 77 a 96, 1985). Las células de hibridoma pueden cribarse inmunológicamente para la producción de anticuerpos específicamente reactivos con un polipéptido activina o ActR11a y anticuerpos monoclonales aislados a partir de un cultivo que comprende dichas células de hibridoma.

El término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente memoria pretende incluir anticuerpos completos, p.ej., de cualquier isotipo (IgG, IgA, IgM, IgE, etc.) e incluye fragmentos o dominios de inmunoglobulinas que son reactivas con un antígeno seleccionado. Los anticuerpos pueden fragmentarse utilizando técnicas convencionales y los fragmentos cribarse para utilidad y/o interacción con un epítipo específico de interés. De esta manera, el término incluye segmentos de partes cortadas proteolíticamente o preparadas recombinantemente de una molécula de anticuerpo que son capaces de reaccionar selectivamente con una determinada proteína. Entre los ejemplos no limitativos de dichos fragmentos proteolíticos y/o recombinantes se incluyen Fab, F(ab')₂, Fab', Fv y anticuerpos de cadena sencilla (scFv) que contienen un dominio V[L] y/o V[H] unido mediante un conector peptídico. Los scFv pueden unirse covalente o no covalentemente para formar anticuerpos que presentan dos o más sitios de unión. El término anticuerpo incluye además preparaciones policlonales, monoclonales u otras preparaciones purificadas de anticuerpos y anticuerpos recombinantes. La expresión "anticuerpo recombinante" se refiere a un anticuerpo, o dominio de unión a antígeno de una inmunoglobulina, expresado a partir de un ácido nucleico que se ha construido utilizando técnicas de biología molecular, tal como un anticuerpo humanizado o un anticuerpo totalmente humano desarrollado a partir de un anticuerpo de cadena sencilla. Los anticuerpos de dominio único y de cadena sencilla también se encuentran incluidos en la expresión "anticuerpo recombinante".

El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, y en la presente memoria se dan a conocer métodos para generar nuevos anticuerpos. Por ejemplo, un método para generar un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido ActR11a o a un polipéptido activina puede comprender la administración en un ratón de una cantidad de una composición inmunogénica que comprenda un polipéptido antígeno eficaz para estimular una respuesta inmune detectable, de manera que se obtienen células productoras de anticuerpos (p.ej., células de bazo) del ratón, la fusión de las células productoras de anticuerpos con células de mieloma a fin de obtener hibridomas productores de anticuerpos, y someter a ensayo los hibridomas productores de anticuerpos a fin de identificar un hibridoma que produzca un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno. Una vez obtenido, el hibridoma puede propagarse en un cultivo celular, opcionalmente bajo condiciones de cultivo en las que las células derivadas del hibridoma producen el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno. El anticuerpo monoclonal puede purificarse a partir del cultivo celular.

La expresión "específicamente reactivo con" tal como se utiliza en referencia a un anticuerpo pretende referirse, tal como se entiende generalmente en la técnica, al anticuerpo que es suficientemente selectivo entre el antígeno de interés (p.ej., un polipéptido activina o ActR11a) y otros antígenos que no son de interés para que el anticuerpo resulte

útil para, como mínimo, detectar la presencia del antígeno de interés en un tipo particular de muestra biológica. En determinados métodos que utilizan el anticuerpo, tales como aplicaciones terapéuticas, puede resultar deseable un mayor grado de especificidad en la unión. Los anticuerpos monoclonales generalmente presentan una mayor tendencia (en comparación con los anticuerpos policlonales) a discriminar eficazmente entre los antígenos deseados y los polipéptidos de reactividad cruzada. Una característica que influye sobre la especificidad de una interacción de anticuerpo:antígeno es la afinidad del anticuerpo para el antígeno. Aunque la especificidad deseada puede alcanzarse con un abanico de diferentes afinidades, los anticuerpos generalmente preferentes presentarán una afinidad (una constante de disociación) de aproximadamente 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M o inferior.

Además, las técnicas utilizadas para cribar anticuerpos a fin de identificar un anticuerpo deseable pueden influir sobre las propiedades del anticuerpo obtenido. Por ejemplo, en el caso de que deba utilizarse un anticuerpo para la unión de un antígeno en solución, puede resultar deseable someter a ensayo la unión en solución. Se encuentra disponible una diversidad de diferentes técnicas para someter a ensayo la interacción entre anticuerpos y antígeno para identificar anticuerpos particularmente deseables. Entre dichas técnicas se incluyen los ELISA, los ensayos de unión de resonancia del plasmón superficial (p.ej., el ensayo de unión Biacore™, Biacore AB, Uppsala, Suecia), los ensayos de tipo sándwich (p.ej., el sistema de perlas paramagnéticas de IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), las transferencias Western, los ensayos de inmunoprecipitación y la inmunohistoquímica.

Entre los ejemplos de categorías de compuestos de ácidos nucleicos que son antagonistas de activina o de ActRIIIa se incluyen los ácidos nucleicos antisentido, los constructos de ARNi y los constructos catalíticos de ácidos nucleicos. Un compuesto de ácidos nucleicos puede ser de cadena sencilla o de doble cadena. Un compuesto de doble cadena puede incluir además zonas protuberantes o de no complementariedad, en las que una u otra cadena es de cadena sencilla. Un compuesto de cadena sencilla puede incluir zonas de autocomplementariedad, referidas a que el compuesto forma una denominada "horquilla" o estructura de "tallo-bucle", con una zona de estructura de doble hélice. Un compuesto de ácidos nucleicos puede comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una zona que consiste en no más de 1000, no más de 500, no más de 250, no más de 100 o no más de 50, 35, 25, 22, 20, 18 o 15 nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos de ActRIIIa de longitud completa o de la secuencia de ácidos nucleicos de la activina β_A , β_B , β_C , o β_E . La zona de complementariedad preferentemente presentará por lo menos 8 nucleótidos, y opcionalmente entre aproximadamente 18 y 35 nucleótidos. Una zona de complementariedad puede encontrarse dentro de un intrón, una secuencia codificante o una secuencia no codificante del transcrito diana, tal como la parte de secuencia codificante. Generalmente, un compuesto de ácidos nucleicos presentará una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 500 nucleótidos o pares de bases de longitud, y opcionalmente la longitud será de aproximadamente 14 a aproximadamente 50 nucleótidos. Un ácido nucleico puede ser un ADN (particularmente para la utilización como cadena antisentido), un ARN o un híbrido ARN:ADN. Cualquier cadena puede incluir una mezcla de ADN y ARN, así como formas modificadas que no pueden clasificarse fácilmente como ADN o ARN. De manera similar, un compuesto de doble cadena puede ser ADN:ADN, ADN:ARN o ARN:ARN, y cualquier cadena puede incluir además una mezcla de ADN y ARN, así como formas modificaciones que no pueden clasificarse fácilmente como ADN o ARN. Un compuesto de ácidos nucleicos puede incluir cualquiera de entre una diversidad de modificaciones, incluyendo una o más modificaciones del esqueleto (la parte de sacárido-fosfato en un ácido nucleico natural, incluyendo los enlaces internucleótido) o la parte de base (la parte de purina o pirimidina de un ácido nucleico natural). Un compuesto de ácido nucleico antisentido preferentemente presentará una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos y con frecuencia contendrá una o más modificaciones para mejorar características tales como la estabilidad en el suero, en una célula o en un sitio en que es probable que se administre el compuesto, tal como el estómago en el caso de compuestos administrados por vía oral, y el pulmón para compuestos inhalados. En el caso de un constructo de ARNi, la complementariedad de cadena con el transcrito diana generalmente será un ARN o modificaciones del mismo. La otra cadena puede ser de ARN, ADN o cualquier otra variación. La parte dúplex del constructo de ARNi de "horquilla" de doble cadena o de cadena sencilla generalmente presentará una longitud de 18 a 40 nucleótidos de longitud y opcionalmente de aproximadamente 21 a 23 nucleótidos de longitud, con la condición de que sirva como un sustrato Dicer. Los ácidos nucleicos catalíticos o enzimáticos pueden ser ribozimas o enzimas de ADN y pueden contener además formas modificadas. Los compuestos ácidos nucleicos pueden inhibir la expresión de la diana en aproximadamente 50%, 75%, 90% o más al ponerlos en contacto con células bajo condiciones fisiológicas y a una concentración en la que el control sin sentido o de sentido presenta poco o ningún efecto. Las concentraciones preferentes para someter a ensayo el efecto de los compuestos de ácidos nucleicos son de 1, 5 y 10 micromolar. Los compuestos de ácidos nucleicos también pueden someterse a ensayo para efectos sobre, por ejemplos, los niveles de glóbulos rojos.

Un antagonista de activina-ActRIIIa puede ser un polipéptido folistatina que antagonice la bioactividad de la activina y/o se una a la activina. La expresión "polipéptido folistatina" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido natural de folistatina, así como cualesquiera variantes del mismo (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil, e incluye además cualquier monómero o multímero funcional de folistatina. Pueden identificarse variantes de polipéptidos folistatina que conservan propiedades de unión a la activina basándose en estudios anteriores que implican interacciones de folistatina y activina. Por ejemplo, el documento n° WO 2008/030367 da a conocer dominios de folistatina específicos ("FSD") que se demuestran que resultan importantes para la unión de la activina. Tal como se muestra posteriormente, en las SEC ID n° 19 a n° 21, el dominio folistatina N-terminal ("FSND", SEC ID n° 19), FSD2 (SEC ID n° 20) y en menor grado, FSD1 (SEC ID n° 21) representan dominios ejemplares dentro de la folistatina importantes para la unión de la activina. Además, se han

descrito anteriormente métodos para preparar y someter a ensayo bibliotecas de polipéptidos, en el contexto de polipéptidos ActRIIa y dichos métodos se refieren además a la preparación y ensayo de variantes de la folistatina. Entre los polipéptidos de folistatina se incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier folistatina conocida con una secuencia por lo menos aproximadamente 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido folistatina, y

5 opcionalmente con una identidad de por lo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o superior. Entre los ejemplos de polipéptidos folistatina se incluyen el polipéptido folistatina maduro o isoformas más cortas u otras variantes del polipéptido precursor de folistatina humana (SEC ID nº 17) tal como se indica en, por ejemplo, el documento nº WO 2005/025601.

10 La isoforma FST344 del polipéptido precursor de la folistatina humana es tal como se indica a continuación:

MVRARHQPGGLCLLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL
 SKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWMI FNGGAPNC I PCKETCENVDC
 GPGKKCRMNKKKPRVCAPDCSNI TWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARC
 KEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPA
 SSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQC
 TGGKKCLWDFKVGRCGLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEA
 ACSSGVLLEVKHSGSCN**SISEDTEEEEDQDYSPFISSILEW** (SEC ID
 nº 17; NP_037541.1 ISOFORMA FST344 DE FOLISTATINA)

15 El péptido de señal se subraya con subrayado simple; los últimos 27 residuos en negrita representan aminoácidos adicionales en comparación con una isoforma más corta de folistatina, FST317 (NP_006341), posteriormente.

La isoforma de polipéptido precursor de folistatina humana FST317 es tal como se indica a continuación:

MVRARHQPGGLCLLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTEL
 SKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWMI FNGGAPNC I PCKETCENVDC
 GPGKKCRMNKKKPRVCAPDCSNI TWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARC
 KEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPA
 SSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQC
 TGGKKCLWDFKVGRCGLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEA
 ACSSGVLLEVKHSGSCN (SEC ID nº 18)

20 El péptido de señal se subraya con subrayado simple.

La secuencia de dominio de folistatina N-terminal (FSND) es tal como se indica a continuación:

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWMI
 IFNGGAPNCIPCK (SEC ID nº 19; FSND)

25 Las secuencias de FSD1 y FSD2 son tal como se indica a continuación:

30 ETCENVDCGPGKKCRMNKKKPRCV (SEC ID nº 20; FSD1)
 KTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVT (SEC ID nº 21; FSD2)

Un antagonista de activina-ActRIIa puede ser un gen relacionado de tipo folistatina (FLRG) que antagoniza la bioactividad de la activina y/o se una a la activina. La expresión "polipéptido FLRG" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido natural de FLRG, así como cualesquiera variantes del mismo (incluyendo mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil. Pueden identificarse variantes de polipéptidos FLRG que conservan propiedades de unión a la activina utilizando métodos rutinarios para someter a ensayo interacciones de FLRG y activina. Ver, por ejemplo, la patente US nº 6.537.966. Además, se han descrito anteriormente métodos para preparar y someter a ensayo bibliotecas de polipéptidos, en el contexto de polipéptidos ActRIIa y dichos métodos se refieren además a la preparación y ensayo de variantes de FLRG. Entre los polipéptidos FLRG se incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier FLRG conocida con una secuencia por lo menos

35
 40

aproximadamente 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido FLRG y opcionalmente con una identidad de por lo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o superior.

El polipéptido precursor de FLRG humana es tal como se indica a continuación:

5 MRPGAPGPLWPLPWGALAWAVGFVSSMGSGNPAPGGVCWLQGGQEATCSL
 VLQTDVTRAECASGNI DTAWSNLTHPGNKINLLGFLGLVHCLPCKDSCD
 GVECGPGKACRMLGGRPRCECAPDCSGLPARLQVCGSDGATYRDECELRA
 ARCRGHPDLSVMYRGRCKRKSCEHVVCPRPQSCVVDQTGSAHCVVCRRAAPC
 VPSSPGQELCGNNNVTYISSCHMRQATCFLGRSIGVRHAGSCAGTPEEPP
 GGESAEENFV (SEC ID nº 22; NP_005851)

El péptido de señal se subraya con subrayado simple.

10 Entre las variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos de folistatina y polipéptidos FLRG se incluyen proteínas de fusión que presentan por lo menos una parte de los polipéptidos de folistatina o polipéptidos FLRG y uno o más dominios de fusión, tales como, por ejemplo, dominios que facilitan el aislamiento, la detección, la estabilización o la multimerización del polipéptido. Se han comentado en detalle anteriormente dominios de fusión adecuados en referencia a los polipéptidos ActRIIa. Un antagonista de activina-ActRIIa puede ser una proteína de fusión que comprende una parte de unión a activina de un polipéptido de folistatina fusionado con un dominio Fc. Alternativamente, un antagonista de activina-ActRIIa es una proteína de fusión que comprende una parte de unión a activina de un polipéptido FLRG fusionado con un dominio Fc. La folistatina y FLRG se ha demostrado en la literatura y ha sido demostrado por los solicitantes con respecto a FLRG, que presentan afinidades para la activina A del orden picomolar, indicando que estos agentes inhibirán la señalización de la activina A en un grado similar a ActRIIa-Fc.

20 5. Ensayos de cribado

En la presente memoria se da a conocer la utilización de polipéptidos ActRIIa y polipéptidos activina para identificar compuestos (agentes) que sean agonistas o antagonistas de la ruta de señalización de activina-ActRIIa. Los compuestos identificados mediante dicho cribado pueden someterse a ensayo para evaluar su capacidad de modular los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina y/o reticulocitos *in vivo* o *in vitro*. Dichos compuestos pueden someterse a ensayo en, por ejemplo, modelos animales.

30 Existen numerosos enfoques de cribado de agentes terapéuticos para incrementar los niveles de glóbulos rojos o hemoglobina mediante la utilización como diana de la señalización de activina y ActRIIa. En determinados casos, el cribado de alto rendimiento de compuestos puede llevarse a cabo para identificar agentes que interfieren en los efectos mediados por activina o ActRIIa sobre una línea celular seleccionada. En determinados casos, el ensayo se lleva a cabo para cribar e identificar compuestos que inhiben específicamente o reducen la unión de un polipéptido ActRIIa a la activina. Alternativamente, el ensayo puede utilizarse para identificar compuestos que potencian la unión de un polipéptido ActRIIa a la activina. En una alternativa adicional, los compuestos pueden identificarse por su capacidad de interactuar con un polipéptido activina o ActRIIa.

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

50 Los compuestos de ensayo pueden proporcionarse en forma de entidades discretas individuales, o proporcionarse en bibliotecas de mayor complejidad, tales como las producidas mediante química combinatorial. Dichas bibliotecas pueden comprender, por ejemplo, alcoholes, haluros de alquilo, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de compuestos orgánicos. La presentación de compuestos de ensayos al sistema de ensayo puede realizarse en forma aislada o en forma de mezclas de compuestos, especialmente en las etapas iniciales del cribado. Opcionalmente, los compuestos pueden derivatizarse opcionalmente con otros compuestos y presentar grupos derivatizantes que faciliten el aislamiento de los compuestos. Entre los ejemplos no limitativos de grupos derivatizantes

se incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína fluorescente verde, isótopos, polihistidina, perlas magnéticas, glutatión-S-transferasa (GST), entrecruzantes fotoactivables o cualesquiera combinaciones de los mismos.

En muchos programas de cribado farmacológico que someten a ensayo bibliotecas de compuestos y extractos naturales, los ensayos de alto rendimiento resultan deseables con el fin de maximizar el número de compuestos analizados en un periodo de tiempo dado. Los ensayos que se llevan a cabo en sistemas sin células, tales como pueden derivarse con proteínas purificadas o semipurificadas, con frecuencia resultan preferentes como cribados "primarios" en el aspecto de que pueden generarse para permitir el rápido desarrollo y la detección relativamente fácil de una alteración de la diana molecular que está mediada por un compuesto de ensayo. Además, los efectos de toxicidad celular o biodisponibilidad del compuesto de ensayo pueden ignorarse generalmente en el sistema *in vitro*, estando el ensayo por el contrario centrado principalmente en el efecto del fármaco sobre la diana molecular tal como se manifiesta en una alteración de la afinidad de unión entre un polipéptido ActRIIa y la activina.

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

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

La presente exposición contempla la utilización de ensayos de polarización de fluorescencia y ensayos de transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET, por sus siglas en inglés) en la medición, directa o indirecta, del grado de interacción entre un polipéptido ActRIIa y su proteína de unión. Además, resultan compatibles otros modos de detección, tales como los basados en guíasondas ópticas (publicación de patente PCT nº WO 96/26432 y patente US nº 5.677.196), resonancia del plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés), sensores de carga superficial y sensores de fuerza superficial.

Además, la presente exposición contempla la utilización de un ensayo de trampa de interacción, también conocido como "ensayo de dos híbridos", para identificar agentes que interfieren o potencian la interacción entre un polipéptido ActRII y su proteína de unión. Ver, por ejemplo, la patente US nº 5.283.317; Zervos et al., *Cell* 72:223-232, 1993; Madura et al. *J. Biol. Chem.* 268:12046-12054, 1993; Bartel et al. *Biotechniques* 14:920-924, 1993, y Iwabuchi et al. *Oncogene* 8:1693-1696, 1993). En la presente memoria se contempla la utilización de sistemas de doble híbrido inverso para identificar compuestos (p.ej., moléculas o péptidos pequeños) que disocian interacciones en un polipéptido ActRIIa y su proteína de unión. Ver, por ejemplo, Vidal y Legrain, *Nucleic Acids Res* 27:919-29, 1999; Vidal y Legrain, *Trends Biotechnol* 17:374-81, 1999, y las patentes U.S. nº 5.525.490, nº 5.955.280 y nº 5.965.368.

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

6. Usos terapéuticos

Según la presente invención, se proporciona un antagonista de activina-ActRIIa para la utilización en el tratamiento de anemia asociada a mielofibrosis en un paciente que lo necesita, en el que el antagonista comprende un polipéptido ActRIIa soluble que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- a) una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica a SEC ID nº 3,
- b) una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica a SEC ID nº 2, y
- c) una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica a SEC ID nº 7.

Pueden utilizarse antagonistas de activina-ActRIIa (p.ej., polipéptidos ActRIIa) de la presente exposición para incrementar los niveles de glóbulos rojos en mamíferos, tales como roedores y primates, y particularmente en pacientes humanos. En la presente memoria se dan a conocer métodos de tratamiento o prevención de anemia en un individuo que lo necesita, mediante la administración en el individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de activina-ActRIIa, tal como un polipéptido ActRIIa. En la presente memoria se dan a conocer métodos para fomentar la formación de glóbulos rojos en un individuo mediante la administración en el individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de activina-ActRIIa, particularmente un polipéptido ActRIIa. Dichos métodos pueden utilizarse para tratamientos terapéuticos y profilácticos de mamíferos, y particularmente de seres humanos.

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

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

Tal como se indica en los ejemplos, los antagonistas de activina-ActRIIa pueden estimular la producción de glóbulos rojos mediante la activación de la eritropoyesis esplénica. Este nuevo mecanismo indica que dichos antagonistas es probable que funcionen sinérgicamente con otros tratamientos de la anemia, tales como los agonistas de la eritropoyetina (p.ej., Epopgen, Procrit, Aranesp, miméticos de epo, agonistas de receptores de epo, etc.).

Los antagonistas de activina-ActRIIa dados a conocer en la presente memoria, y particularmente las proteínas ActRIIa-Fc, pueden utilizarse para incrementar los niveles de glóbulos rojos en los pacientes con una anemia. Al observar los niveles de hemoglobina en seres humanos, un nivel inferior al normal para la categoría apropiada de edad y género puede ser indicativo de anemia, aunque se consideran las variaciones individuales. Por ejemplo, un nivel de hemoglobina de 12 g/dl se considera generalmente el límite inferior de la normalidad en la población adulta general. Entre las causas potenciales se incluyen la pérdida de sangre, déficits nutricionales, reacción a una medicación, diversos problemas con la médula ósea y muchas enfermedades. Más particularmente, la anemia se ha asociado a una diversidad de trastornos, entre los que se incluyen, por ejemplo, la insuficiencia renal crónica, el síndrome mielodisplásico (incluyendo el SMD con delección de 5q), mielofibrosis, artritis reumatoide y trasplante de médula ósea. La anemia también puede estar asociada a las condiciones siguientes: tumores sólidos (p.ej., cáncer de mama, cáncer de pulmón y cáncer de colon), tumores del sistema linfático (p.ej., leucemia linfocítica crónica, linfomas no de Hodgkin y de Hodgkin), tumores del sistema hematopoyético (p.ej., leucemia, síndrome mielodisplásico y mieloma múltiple), terapia de radiación, quimioterapia (p.ej., regímenes que contienen platino), enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, artritis reumatoide, otras artritis inflamatorias, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedades de la piel agudas o crónicas (p.ej., soriasis), enfermedad intestinal inflamatoria (p.ej., enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), enfermedad o insuficiencia renal aguda o crónica, incluyendo condiciones idiopáticas o congénitas, enfermedad hepática aguda o crónica, sangrado agudo o crónico, situaciones que no resulta posible la transfusión de glóbulos rojos debido a aloanticuerpos o autoanticuerpos del paciente y/o por motivos religiosos (p.ej., algunos testigos de Jehová), infecciones (p.ej., malaria y osteomielitis), hemoglobinopatías, incluyendo, por ejemplo, enfermedad de las células falciformes, talasemias, uso o abuso de drogas, p.ej., abuso del alcohol; pacientes pediátricos con anemia por cualquier causa que impide la transfusión, y pacientes de edad avanzada o pacientes con enfermedad cardiopulmonar subyacente con anemia que no pueden recibir transfusiones debido a posibles problemas de sobrecarga circulatoria.

Los antagonistas de activina-ActRIIa (p.ej., polipéptidos ActRIIa) resultarían apropiados para el tratamiento de anemias

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

El tipo más común es la anemia de enfermedad crónica, que comprende inflamación, infección, lesión de tejidos y condiciones tales como cáncer, y se distingue tanto por niveles bajos de eritropoyetina como por una *respuesta inadecuada* a la eritropoyetina en la médula ósea (Adamson, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17a ed.; McGraw Hill, New York, páginas 628 a 634, 2008). Muchos factores pueden contribuir a la anemia relacionada con el cáncer. Algunos están asociados al proceso mismo de la enfermedad y a la generación de citoquinas inflamatorias, tales como interleuquina-1, interferón-gamma y factor de necrosis tumoral (Bron et al., Semin. Oncol. 28(supl. 8):1-6, 2001). Entre sus efectos, la inflamación induce el péptido clave de regulación del hierro, hepcidina, inhibiendo de esta manera la exportación de hierro de los macrófagos y limitando generalmente la disponibilidad del hierro para la eritropoyesis (Ganz, J. Am. Soc. Nephrol. 18:394-400, 2007). La pérdida de sangre por diversas vías también puede contribuir a la anemia relacionada con el cáncer. La prevalencia de la anemia debido al avance del cáncer varía con el tipo de cáncer, estando comprendida entre 5% en el cáncer de próstata, hasta 90% en el mieloma múltiple. La anemia relacionada con el cáncer presenta profundas consecuencias para los pacientes, incluyendo fatiga y una calidad de vida reducida, una eficacia reducida del tratamiento y una mayor mortalidad.

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

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

La anemia ferropénica es el estadio final en una progresión gradual de deficiencia creciente de hierro que incluye un equilibrio negativo de hierro y eritropoyesis deficiente en hierro como estadios intermedios. La deficiencia de hierro puede resultar de una demanda incrementada de hierro, una ingesta reducida de hierro o una pérdida incrementada de hierro, tal como ejemplifican condiciones tales como el embarazo, una dieta inadecuada, la mala absorción intestinal, la inflamación aguda o crónica y la pérdida aguda o crónica de sangre. Con la anemia leve a moderada de este tipo, la médula ósea se mantiene hipoproliferativa y la morfología de los GR es en gran medida normal; sin embargo, incluso la anemia leve puede resultar en algunos GR hipocrómicos microcíticos, y la transición a anemia ferropénica severa se ve acompañada de hiperproliferación de la médula ósea y una prevalencia creciente de GR microcíticos e hipocrómicos (Adamson, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17a ed.; McGraw Hill, New York, páginas 628 a 634, 2008). Una terapia apropiada para la anemia ferropénica depende de su causa y severidad, siendo las opciones convencionales principales las preparaciones orales de hierro, las formulaciones parenterales de hierro y la transfusión de GR. Un polipéptido ActRIIa u otro antagonista de activina-ActRIIa podría utilizarse para tratar las anemias ferropénicas solo (ver el ejemplo, posteriormente, en un ensayo clínico de pacientes) o en combinación con enfoques terapéuticos convencionales, particularmente para tratar anemias de origen multifactorial.

Las anemias hipoproliferativas pueden resultar de una disfunción o insuficiencia primaria de la médula ósea, o por el contrario la disfunción es secundaria a inflamación, infección o avance del cáncer. Son ejemplos prominentes, la mielosupresión causada por fármacos quimioterapéuticos del cáncer o la terapia de radiación del cáncer. Una revisión amplia de ensayos clínicos ha encontrado que la anemia leve puede producirse en 100% de los pacientes después de la quimioterapia, mientras que puede producirse una anemia más severa en hasta 80% de tales pacientes (Groopman et al., J. Natl. Cancer Inst. 91:1616-1634, 1999). Entre los fármacos mielosupresores se incluyen: 1) agentes alquilantes, tales como mostazas nitrogenadas (p.ej., melfalán) y nitrosoureas (p.ej., estreptozocina), 2) antimetabolitos, tales como antagonistas del ácido fólico (p.ej., metotrexato), análogos de purina (p.ej., tioguanina) y análogos de pirimidina (p.ej., gemcitabina), 3) antibióticos citotóxicos, tales como antraciclinas (p.ej., doxorubicina),

4) inhibidores de quinasa (p.ej., gefitinib), 5) inhibidores mitóticos, tales como taxanos (p.ej., paclitaxel) y alcaloides vinca (p.ej., vinorelbina), 6) anticuerpos monoclonales (p.ej., rituximab) y 7) inhibidores de topoisomerasa (p.ej., topotecán y etopósido). Tal como se ha demostrado en un modelo de ratón de anemia inducida por quimioterapia (ver el ejemplo, posteriormente), un polipéptido ActR11a, u otro antagonista de activina-ActR11a, puede utilizarse para tratar la anemia causada por agentes quimioterapéuticos y/o terapia de radiación.

Los antagonistas de activina-ActR11a (p.ej., los polipéptidos ActR11a) también resultarían apropiados para tratar las anemias de maduración desordenada de los GR, que se caracterizan en parte por GR de tamaño reducido (microcíticos), de tamaño excesivo (macrocíticos), deformes o de color anormal (hipocrómicos).

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

El rápido efecto sobre los niveles de glóbulos rojos de los antagonistas de activina-ActR11a dados a conocer en la presente memoria indica que estos efectos actúan mediante un mecanismo diferente a la Epo. De acuerdo con lo anterior, dichos antagonistas pueden resultar útiles para incrementar los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina en pacientes que no responden bien a la Epo. Por ejemplo, un antagonista de activina-ActR11a puede resultar beneficioso para un paciente en el que la administración de una dosis normal a incrementada (>300 lu/kg/semana) de Epo no resulta en el incremento del nivel de hemoglobina hasta el nivel diana. Se observan pacientes con una respuesta inadecuada a Epo en todos los tipos de anemia, aunque se ha observado un mayor número de no respondedores con particular frecuencia en pacientes de cáncer y en pacientes con enfermedad renal de estadio terminal. Una respuesta inadecuada a Epo puede ser constitutiva (es decir, se observa con el primer tratamiento de Epo) o adquirida (p.ej., se observa tras el tratamiento repetido con Epo).

Los antagonistas de activina-ActR11a también pueden utilizarse para tratar pacientes que son susceptibles a los efectos adversos de la Epo. Los efectos adversos principales de la Epo son un incremento excesivo de los niveles de hematocrito o de hemoglobina y la policitemia. Los niveles elevados de hematocrito pueden conducir a hipertensión (más particularmente a un agravamiento de la hipertensión) y a trombosis vascular. Se ha informado de otros efectos adversos de la Epo, algunos de los cuales están relacionados con la hipertensión: cefaleas, síndrome de tipo influenza, obstrucción de derivaciones, infartos de miocardio y convulsiones cerebrales debidas a trombosis, encefalopatía hipertensa y aplasia de glóbulos rojos (Singibarti, *J. Clin. Invest.* 72(supl. 6), S36-S43, 1994; Horl et al. *Nephrol. Dial. Transplant* 15(supl. 4), 51-56, 2000; Delanty et al. *Neurology* 49, 686-689, 1997; Bunn, *N. Engl. J. Med.* 346(7), 522-523, 2002).

Tal como se indica en la solicitud de patente US nº de serie 11/603.485 y en las solicitudes publicadas de patente nº WO 2008/100384 y nº WO 2007/062188, los antagonistas de activina-ActR11a pueden utilizarse para fomentar el crecimiento óseo e incrementar la densidad ósea. De esta manera, los antagonistas de activina-ActR11a pueden resultar particularmente útiles para pacientes con un trastorno que está asociado a pérdida ósea y anemia. Entre los ejemplos se incluyen enfermedades renales (especialmente la enfermedad renal crónica y la enfermedad renal de estadio terminal), osteoporosis, cáncer y tratamientos para el cáncer (especialmente las terapias mielosupresoras indicadas anteriormente y los antiestrógenos comentados en los documentos nº WO 2008/100384 y nº WO 2007/062188, y trastornos inflamatorios, tales como la enfermedad intestinal inflamatoria y la artritis reumatoide.

7. Composiciones farmacéuticas

Los antagonistas de activina-ActR11a (p.ej., los polipéptidos ActR11a) de la presente exposición pueden formularse con un portador farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, un polipéptido ActR11a puede administrarse solo o como un componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Los compuestos de la invención pueden formularse para la administración de cualquier manera conveniente para la utilización en medicina humana o veterinaria.

El método terapéutico puede incluir la administración de la composición sistémicamente, o localmente como un implante o dispositivo. Al administrarla, la composición terapéutica para la utilización en la presente invención, evidentemente se encuentra en una forma fisiológicamente aceptable libre de pirógenos. Los agentes terapéuticamente útiles aparte de los antagonistas de activina-ActR11a que también pueden incluirse opcionalmente en la composición tal como se ha indicado anteriormente, pueden administrarse simultánea o secuencialmente con los compuestos de la invención (p.ej., los polipéptidos ActR11a) en la invención.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Los experimentos con primates y seres humanos han demostrado que los efectos de ActRIIa-Fc sobre los niveles de glóbulos rojos son detectables al administrar el compuesto a intervalos y en cantidades suficientes para alcanzar concentraciones séricas de aproximadamente 100 ng/ml o superiores, durante un periodo aproximado de por lo menos 20 a 30 días. También pueden utilizarse dosis para obtener niveles séricos de 200 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml o superiores durante un periodo de por lo menos 20 a 30 días. Pueden observarse efectos óseos a niveles séricos de aproximadamente 200 ng/ml, con efectos sustanciales a partir de aproximadamente 1000 ng/ml o superiores, durante un periodo aproximado de por lo menos 20 a 30 días. De esta manera, en caso de que resulte deseable conseguir efectos sobre los glóbulos rojos, presentando simultáneamente poco efecto sobre los huesos, puede diseñarse un régimen de dosis para administrar una concentración sérica de entre aproximadamente 100 y 1000 ng/ml durante un periodo aproximado de 20 a 30 días. En el ser humanos, puede conseguirse niveles séricos de 200 ng/ml con una sola dosis de 0,1 mg/kg o superior, y pueden conseguirse niveles séricos de 1000 ng/ml con una única dosis de 0,3 mg/kg o superior. La semivida sérica observada de la molécula es de entre aproximadamente 20 y 30 días, sustancialmente más larga que para la mayoría de proteínas de fusión de Fc, y de esta manera, puede conseguirse un nivel sérico eficaz sostenido mediante, por ejemplo, la administración de 0,05 a 0,5 mg/kg semanales o quincenales, o pueden utilizarse dosis más elevadas con mayores intervalos entre dosis. Por ejemplo, podrían utilizarse dosis de 0,1 a 1 mg/kg mensuales o bimensuales.

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

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

Alternativamente, pueden transferirse directamente células de cultivo tisular con plásmidos que codifican los genes estructurales retroviro gag, pol y env, mediante transfección convencional con fosfato de calcio. A continuación, dichas células se transfectan con el plásmido vector que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retroviro en el medio de cultivo.

Otro sistema de administración dirigida para los polinucleótidos de ActRIIa es un sistema de dispersión coloidal. Entre

los sistemas de dispersión coloidal se incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas a base de lípidos, incluyendo emulsiones de aceite-en-agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferente de la presente exposición es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membranas artificiales que resultan útiles como vehículos de administración *in vitro* e *in vivo*. Los viriones de ARN, ADN y viriones intactos pueden encapsularse dentro del interior acuoso y administrarse en las células en una forma biológicamente activa (ver, p.ej., Fraley et al., Trends Biochem. Sci. 6:77, 1981). Los métodos para la transferencia génica eficiente mediante la utilización de un vehículo liposoma son conocidos de la técnica; ver, p.ej., Mannino et al., Biotechniques 6:682, 1988. La composición del liposoma es habitualmente una combinación de fosfolípidos, habitualmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También pueden utilizarse otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, fuerza iónica y presencia de cationes divalentes.

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

Ejemplos

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

Ejemplo 1: proteínas de fusión ActR1Ia-Fc

Los solicitantes construyeron una proteína de fusión de ActR1Ia soluble que presenta el dominio extracelular de ActR1Ia humano fusionado con un dominio Fc humano o de ratón con un conector mínimo interpuesto. Los constructos se denominan ActR1Ia-Fc_h y ActR1Ia-Fc_m, respectivamente.

Se muestra ActR1Ia-Fc_h a continuación en forma purificada a partir de líneas de células CHO (SEC ID nº 7):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
CWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVTVQPTSNPVTPK
PPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKE
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
VPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

Las proteínas ActR1Ia-Fc_h y ActR1Ia-Fc_m se expresaron en líneas de células CHO. Se consideraron tres secuencias líder diferentes:

- (i) melitina de abeja melífera (MLAM): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEC ID nº 8)
- (ii) activador de plasminógeno tisular (APT): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEC ID nº 9)
- (iii) nativa: MGAAAKLAFVFLISCSSGA (SEC ID nº 10).

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

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCY
 GDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEG
 NMCNEKFSYFPMEVTVQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK
 DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
 VTLVHLDWLNGLKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID nº 13)

Dicho polipéptido se encuentra codificado por la secuencia de ácido nucleico siguiente:

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCT
 TCGTTTCGCCCCGGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTT
 TTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCGTGT
 ATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGG
 TTCCATTGAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACA
 GGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGA
 GGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCGGAGATGGAAGTCACACAG
 CCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGGAACTCACACAT
 GCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC
 CCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG
 GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
 GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG
 CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGTCCCATCGAGAAA
 ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC
 CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA
 GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
 AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT
 ATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
 GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
 GTCTCCGGGTAAATGAGAATTC (SEC ID nº 14)

5 Tanto ActR11a-Fc_h como ActR11a-Fc_m eran notablemente fáciles de someter a expresión recombinante. Tal como se muestra en la figura 1, se purificó la proteína en forma de un sólo pico bien definido de proteína. La secuenciación N-terminal reveló una única secuencia: -ILGRSTQE (SEC ID nº 11). La purificación pudo conseguirse mediante una serie de etapas de cromatografía de columna, incluyendo, por ejemplo, tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía en proteína A, cromatografía en sefarosa-Q, cromatografía en fenilsefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación puede completarse con filtración vírica e intercambio de tampones. La proteína ActR11a-Fc_h se purificó hasta una pureza >98% según se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño y >95% según se determinó mediante SDS PAGE.

10 ActR11a-Fc_h y ActR11a-Fc_m mostraron una elevada afinidad para los ligandos, particularmente para activina A. GDF-11 o activina A ("ActA") se inmovilizaron sobre un chip CM5 de Biacore utilizando un procedimiento estándar de acoplamiento de aminos. Se cargaron las proteínas ActR11a-Fc_h y ActR11a-Fc_m en el sistema y se midió la unión. ActR11a-Fc se unía a la activina con una constante de disociación (K_D) de 5×10^{-12} y la proteína se unía a GDF11 con una K_D de $9,96 \times 10^{-9}$. Ver la figura 2. ActR11a-Fc_m se comportaba de manera similar.

15 La proteína ActR11a-Fc_h era muy estable en los estudios farmacocinéticos. Las ratas recibieron dosis de 1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg de proteína ActR11a-Fc_h y se midieron niveles plasmáticos de la proteína a las 24, 48, 72, 144 y 168 horas. En un estudio separado, las ratas recibieron dosis de 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg. En ratas, ActR11a-Fc_h presentó una semivida sérica de 11-14 días y niveles circulantes del fármaco eran bastante elevados tras dos semanas (11 µg/ml, 110 µg/ml o 304 µg/ml para las administraciones iniciales de 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg, respectivamente). En monos Cynomolgus, la semivida plasmática fue sustancialmente mayor que 14 días y los niveles circulantes del fármaco eran de 24 µg/ml, 304 µg/ml o 1440 µg/ml para administraciones iniciales de 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg, respectivamente. Los resultados preliminares en seres humanos sugieren que la semivida sérica es de entre aproximadamente 20 y 30 días.

30 Ejemplo 2: caracterización de una proteína ActR11a-Fc_h

La proteína de fusión ActR11a-Fc_h se expresó en células CHO-DUKX B11 transfectadas establemente de un vector

pAID4 (SV40 ori/intensificador, promotor del CMV), utilizando una secuencia líder de plasminógeno tisular de SEC ID nº 9. La proteína, purificada tal como se ha indicado anteriormente, en el Ejemplo 1, presentaba la secuencia SEC ID nº 7. La parte Fc es una secuencia Fc de IgG1, tal como se muestra en SEC ID nº 7. El análisis del ácido siálico demostró que la proteína contenía, de promedio, entre aproximadamente 1,5 y 2,5 moles de ácido siálico por cada molécula de proteína de fusión ActRIIa-Fc_h.

Dicha proteína purificada mostraba una semivida en suero notablemente prolongada en todos los animales sometidos a ensayo, incluyendo una semivida de 25 a 32 días en pacientes humanos (ver el Ejemplo 6, posteriormente). Adicionalmente, el material expresado en células CHO presentaba una afinidad más elevada para el ligando activina B que el informado para una proteína de fusión de ActRIIa-Fc_h expresada en células 293 humanas (del Re et al., J. Biol. Chem. 279(51):53126-35, 17 de dic., 2004). Adicionalmente, la utilización de la secuencia líder tPa proporcionó una mayor producción que otras secuencias líder y, al contrario que ActRIIa-Fc expresado con un líder nativo, proporcionó una secuencia N-terminal altamente pura. La utilización de la secuencia líder nativa resultó en dos especies principales de ActRIIa-Fc, cada uno con una secuencia N-terminal diferente.

Ejemplo 3. ActRIIa-Fc_h incrementa los niveles de glóbulos rojos en primates no humanos

El estudio utilizó cuatro grupos de cinco monos *Cynomolgus* macho y cinco hembras cada uno, con tres monos por sexo y por grupo programados para la terminación el día 29 y dos por sexo y por grupo programados para terminación el día 57. Se administró en cada animal el vehículo (grupo 1) o ActRIIa-Fc a dosis de 1, 10 o 30 mg/kg (grupos 2, 3 y 4, respectivamente) mediante inyección intravenosa (IV) los días 1, 8, 15 y 22. Se mantuvo el volumen de la dosis en 3 ml/kg. Se evaluaron diversas medidas de nivel de glóbulos rojos dos días antes de la primera administración y los días 15, 29 y 57 (para los dos animales restantes) después de la primera administración.

La proteína ActRIIa-Fc_h causó incrementos estadísticamente significativos de los parámetros medios de los glóbulos rojos (recuento de glóbulos rojos [GR], hemoglobina [HGB] y hematocrito [HCT]) en machos y hembras, a todos los niveles de dosis y puntos temporales durante todo el estudio, acompañado de elevaciones de los recuentos absolutos y relativos de reticulocitos (ARTC; RTC). Ver las figuras 3 a 6.

Se calculó la significancia estadística para cada grupo de tratamiento respecto a la media para el grupo de tratamiento en la línea base.

Cabe destacar que los incrementos en los recuentos de glóbulos rojos y de los niveles de hemoglobina eran aproximadamente equivalentes en magnitud a los efectos informados con la eritropoyetina. La aparición de dichos efectos fue más rápida con ActRIIa-Fc que con eritropoyetina.

Se observaron resultados similares con ratas y ratones.

Ejemplo 4. ActRIIa-Fc_h incrementa los niveles de glóbulos rojos y marcadores de formación ósea en pacientes humanos

La proteína de fusión ActRIIa-Fc_h indicada en el Ejemplo 1 se administró en pacientes humanos en un estudio aleatorizado de doble ciego controlado con placebo que se llevó a cabo para evaluar, principalmente, la seguridad de la proteína en mujeres postmenopáusicas sanas. Se asignaron aleatoriamente cuarenta y ocho sujetos a cohortes de 6 para recibir una única dosis de ActRIIa-Fc_h o placebo (5 activos: 1 placebo). Los niveles de dosis estaban comprendidos entre 0,01 y 3,0 mg/kg por vía intravenosa (IV) y entre 0,03 y 0,1 mg/kg por vía subcutánea (SC). Se monitorizaron los sujetos durante 120 días. Además de los análisis farmacocinéticos (PK), también se evaluó la actividad biológica de ActRIIa-Fc_h mediante la medición de marcadores bioquímicos de formación y resorción óseas, y los niveles de HFE.

Para estudiar los cambios potenciales, se examinaron los datos de hemoglobina y GR en detalle para todos los sujetos durante el curso del estudio y se compararon con los niveles de la línea base. Se compararon los recuentos de plaquetas durante el mismo periodo que el control. No se observaron cambios clínicamente significativos respecto a los valores de la línea base durante el tiempo para los recuentos de plaquetas.

El análisis FC de ActRIIa-Fc_h mostró un perfil lineal con la dosis y una semivida media de aproximadamente 25 a 32 días. La superficie bajo la curva (SBC) para ActRIIa-Fc_h estaba linealmente relacionada con la dosis y la absorción tras la administración SC fue esencialmente completa (ver las figuras 7 y 8). Estos datos indican que SC es un enfoque deseable para la administración debido a que proporciona una biodisponibilidad y semivida sérica equivalentes para el fármaco, evitando simultáneamente el pico de concentraciones séricas de fármaco asociado a los primeros pocos días de administración IV (ver la figura 8). ActRIIa-Fc_h causó un incremento dependiente de la dosis sostenido y rápido de los niveles séricos de fosfatasa alcalina específica ósea (FAO), que es un marcador para el crecimiento óseo anabólico, y una reducción dependiente de la dosis del telopéptido de colágeno de tipo 1 C-terminal y de los niveles de la fosfatasa ácida 5b resistente al tartrato, los cuales son marcadores de resorción ósea. Otros marcadores, tales como P1NP, mostraron resultados no concluyentes. Los niveles de FAO mostraron efectos prácticamente saturantes a la dosis más alta de fármaco, indicando que podían alcanzarse efectos semimáximos sobre este biomarcador óseo

anabólico a una dosis de 0,3 mg/kg, con incrementos hasta 3 mg/kg. Calculado como una relación entre el efecto farmacodinámico y la SBC para el fármaco; la EC₅₀ era de 51,465 (día·ng/ml). Ver la figura 9. Dichos cambios del biomarcador óseo fueron sostenidos durante aproximadamente 120 días a los niveles de dosis más altos sometidos a ensayo. También se produjo una reducción dependiente de la dosis de los niveles séricos de HFE consistente con la inhibición de la activina.

Globalmente, se produjo una reducción muy pequeña no relacionada con el fármaco en la hemoglobina durante la primera semana del estudio, probablemente relacionada con la flebotomía de estudio en los grupos de 0,01 y 0,03 mg/kg, sea administración IV o SC. Los resultados de hemoglobina con 0,1 mg/kg SC e IV fueron estables o mostraron incrementos modestos los días 8 a 15. Al nivel de dosis IV de 0,3 mg/kg se produjo un claro incremento de los niveles de HGB observado incluso tan pronto como el día 2 y con frecuencia alcanzando un pico los días 15 a 29 que no se observó en los sujetos en los que se había administrado placebo. A la dosis IV de 1,0 mg/kg y a la dosis IV de 3,0 mg/kg, se observaron incrementos medios superiores a 1 g/dl en respuesta a la dosis única, con incrementos correspondientes en los recuentos de GR y el hematocrito. Dichos parámetros hematológicos alcanzaron un pico aproximadamente a los 60 días después de la dosis y una reducción sustancial alcanzado el día 120. Lo anterior indica que la administración de la dosis para el propósito de incrementar los niveles de glóbulos rojos podría resultar más eficaz si se realiza a intervalos menores de 120 días (es decir, antes del retorno a la línea base); los intervalos de administración de 90 días o menos, o de 60 días o menos, podrían resultar deseables. Para un resumen de los cambios hematológicos, ver las figuras 10 a 13.

Globalmente, ActR11a-Fc_h mostró un efecto dependiente de la dosis sobre los recuentos de glóbulos rojos y recuentos de reticulocitos, y un efecto dependiente de la dosis sobre los marcadores de formación de hueso.

Ejemplo 5. Tratamiento de un paciente anémico con ActR11a-Fc_h

Se diseñó un estudio clínico para tratar pacientes con dosis múltiples de ActR11a-Fc_h, a niveles de dosis de 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg y 1,0 mg/kg, con dosis cada treinta días. Los pacientes sanos normales en el ensayo mostraron un incremento de hemoglobina y hematocrito que era consistente con los incrementos observados en el ensayo clínico de fase I informado en el Ejemplo 4, excepto en que, en algunos casos, la hemoglobina y el hematocrito se encontraban elevados más allá del rango normal. Un paciente anémico con hemoglobina de aproximadamente 7,5 también recibió dos dosis al nivel de 1 mg/kg, resultando en un nivel de hemoglobina de aproximadamente 10,5 después de dos meses. La anemia del paciente era una anemia microcítica, que se cree que está causada por una deficiencia crónica de hierro.

Ejemplo 6. ActR11a-Fc_m incrementa los niveles de glóbulos rojos en ratones mediante estimulación de la liberación de glóbulos rojos esplénicos

En el presente estudio se analizaron los efectos de la administración *in vivo* de ActR11a-Fc_m sobre la frecuencia de los progenitores hematopoyéticos en médula ósea y bazo. En un grupo de ratones se inyectó PBS a modo de control y en un segundo grupo de ratones se administraron dos dosis de ActR11a-Fc_m a una dosis de 10 mg/kg y ambos grupos se sacrificaron después de 8 días. Se utilizó sangre periférica para llevar a cabo recuentos sanguíneos completos, y se utilizaron fémures y bazos para llevar a cabo ensayos clonogénicos *in vitro* para evaluar el contenido de células progenitoras linfoides, eritroides y mieloides en cada órgano. En la sangre periférica se observó un incremento significativo de glóbulos rojos y contenido de hemoglobina en los ratones tratados con compuesto. En los fémures, no se observaron diferentes en el número de células nucleadas o en el contenido de progenitores entre los grupos de control y tratados. En los bazos, el grupo tratado con compuesto experimentó un incremento estadísticamente significativo del número de células nucleadas antes de la lisis de los glóbulos rojos y en el número de colonias de progenitores eritroides maduros (UFC-E) por placa, en la frecuencia y número total de progenitores por bazo. Además, se observó un incremento del número de progenitores mieloides (UFC-GM), eritroides inmaduros (BFU-E) y número total de progenitores por bazo.

Animales:

en el estudio se utilizaron dieciséis ratones BDF1 hembra de 6 a 8 semanas de edad. En ocho ratones se inyectaron por vía subcutánea el compuesto de ensayo ActR11a-Fc_m los días 1 y 3 a una dosis de 10 mg/kg y en ocho ratones se inyectó por vía subcutánea control de vehículo, solución salina tamponada con fosfato (PBS) a un volumen de 100 µl en cada ratón. Todos los ratones fueron sacrificados 8 días después de la primera inyección de acuerdo con las directrices de cuidado animal relevantes. Se recogieron muestras de sangre periférica (SP) mediante punción cardíaca y se utilizaron para recuentos sanguíneos completos y diferenciales (CBC/Dif). Se recolectaron fémures y bazos de cada ratón.

Ensayos realizados:

Recuentos CBC/Dif.

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

Ensayos clonogénicos

5 Se evaluaron progenitores clonogénicos de los linajes mieloide, eritroide y linfoide utilizando los sistemas de medios a base de metilcelulosa *in vitro* indicados posteriormente.

Progenitores eritroides maduros:

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

Progenitores linfoides:

15 Se cultivaron progenitores clonogénicos del linaje linfoide (UFC-pre-B) en medio a base de metilcelulosa MethoCult® 3630 que contenía interleuquina hr 7 (10 ng/ml).

Progenitores mieloides y eritroides inmaduros:

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

Métodos:

25 Se procesaron fémures y bazos de ratón mediante protocolos estándares. Brevemente, se obtuvo médula ósea mediante enjuague de la cavidad femoral con medio de Dulbecco modificado por Iscove que contenía suero de feto bovino al 2% (MDM, FBS al 2%) utilizando una aguja de calibre 21 y una jeringa de 1 cm³. Se obtuvieron células de bazo mediante trituración de bazos a través de un filtro de 70 µm y enjuagando el filtro con IMDM, FBS al 2%. A
30 continuación, se llevaron a cabo recuentos de las células nucleadas en ácido acético glacial al 3% en las suspensiones de células individuales utilizando una cámara de recuento de Neubauer de manera que pudiesen calcularse las células totales por órgano. Para eliminar los glóbulos rojos contaminantes; a continuación, se diluyeron las células esplénicas totales con 3 veces el volumen de tampón de lisis de cloruro amónico y se incubaron sobre hielo durante 10 minutos. A continuación, las células se lavaron y se resuspendieron en IDM, FBS al 2% y se llevó a cabo un segundo recuento
35 celular para determinar la densidad celular después de la lisis.

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

50 Análisis:

Se calcularon medias +/- 1 desviación estándar para los cultivos por triplicado de los ensayos clonogénicos y para los grupos de control y de tratamiento para todos los conjuntos de datos.

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

Células sembradas por placa

CFC medias puntuadas por placa

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

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

Número de células nucleadas cultivadas

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

65

Tabla: Parámetros hematológicos

Grupo de tratamiento	Glóbulos blancos (x10 ⁹ /l)	Glóbulos rojos (x10 ⁹ /l)	Hemoglobina (g/l)	Hematocrito (l/l)
PBS (n=8)	6,37 +/- 2,83	10,9 +/- 0,7	154,5 +/- 5,9	0,506 +/- 0,029
ActR11a-Fc_m n=8	8,92 +/- 3,69	11,8 +/- 0,3*	168,3 +/- 4,3**	0,532 +/- 0,014
* = p < 0,01 **= p < 0,0005				

Tabla: CFC de fémur y bazo

Grupo de tratamiento	CFC total por fémur	CFC total por bazo	UFC-E total por fémur	UFC-E total por bazo
PBS (n=8)	33437 +/- 7118	4212 +/- 1148	27185 +/- 12893	6743 +/- 1591
ActR11a-Fc_m (n=8)	31068 +/- 8024	6816 +/- 1516*	18118 +/- 6672	27313 +/- 11790
* = p < 0,005 **= p < 0,0001				

El tratamiento de los ratones con ActR11a-Fc_m resultó en incrementos significativos en el número de parámetros hematopoyéticos. En la sangre periférica se observó un incremento significativo de glóbulos rojos y contenido de hemoglobina en los ratones tratados con compuesto. En los fémures, no se observaron diferencias en el número de células nucleadas o en el contenido de progenitores entre los grupos de control y tratados. En los bazos, el grupo tratado con compuesto experimentó un incremento estadísticamente significativo del número de células nucleadas antes de la lisis de los glóbulos rojos y en el número de colonias de progenitores eritroides maduros (UFC-E) por placa, en la frecuencia y número total de progenitores por bazo. Además, se observó un incremento del número de progenitores mieloides (UFC-GM), eritroides inmaduros (BFU-E) y número total de progenitores por bazo.

Ejemplo 7. Proteínas ActR11a-Fc alternativas

Se describe una diversidad de variantes de ActR11a en la solicitud de patente internacional publicada en el documento n° WO 2006/012627 (ver, p.ej., las páginas 55 a 58). Un constructo alternativo que puede utilizarse en la presente invención puede presentar una delección de la cola C-terminal (los 15 aminoácidos finales del dominio extracelular de ActR11a. La secuencia de dicho constructo se presenta posteriormente (parte Fc subrayada) (SEC ID n° 12):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
 CWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP~~EMTGGGTHTCPPCPA~~
~~PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK~~
~~TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVP~~IEKTISKAKGQPRE~~~~
~~PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK~~TTTPVLDSGD~~~~
~~SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK~~

Ejemplo 8: efecto de ActR11a-Fc_m sobre la anemia inducida por quimioterapia en ratones

Los solicitantes investigaron el efecto de ActR11a-Fc_m sobre la anemia inducida por quimioterapia en ratones. En el primero de dos estudios, se trataron ratones C57BL/6 hembra de 6 semanas de edad con una sola dosis de ActR11a-Fc_m (10 mg/kg, s.c.) o vehículo (solución salina tamponada con fosfato) 3 días antes de administrar una única dosis del quimioterápico paclitaxel (20 mg/kg, i.p.). Se recogieron muestras de sangre antes de la quimioterapia y después 3, 7 y 14 días (n=6 por cohorte por punto temporal) después del paclitaxel. ActR11a-Fc_m evitó la caída del nivel de hematocrito observado de lo contrario después del paclitaxel (figura 15) y se observaron efectos similares para la concentración de hemoglobina y el recuento de GR. En un segundo estudio, en ratones C57BL/6 hembra de 6 semanas de edad se administró un número variable de dosis de ActR11a-Fc_m (10 mg/kg, s.c.) o vehículo (PBS), desde antes del paclitaxel (20 mg/kg, única dosis, i.p.) y continuando a intervalos de 3 o 4 días. Se recogieron muestras de sangre 3, 7 y 14 días (n=8 por cohorte por punto temporal) después del paclitaxel. A los 14 días, el tratamiento de ActR11a-Fc_m incrementó el nivel de hematocrito progresivamente como función del número de dosis (figura 16). De esta manera, ActR11a-Fc_m puede estimular la eritropoyesis en grado suficiente para atenuar o evitar la anemia inducida por la quimioterapia.

Ejemplo 9: efecto de ActR11a-Fc_m sobre la anemia en un modelo de ratón de enfermedad renal crónica

5 Los solicitantes investigaron el efecto de ActRIIa-Fc_m sobre la anemia inducida mediante nefrectomía en ratones como modelo de enfermedad renal crónica. En el primero de dos estudios, ratones C57BL/6 hembra fueron sometidos a nefrectomía quirúrgica parcial, con eliminación de aproximadamente cinco sextos del volumen renal total, para reducir la proporción de eritropoyetina. Se proporcionó a los ratones un periodo de recuperación de 4 semanas con una dieta rica en grasas para estimular adicionalmente la deficiencia renal y después se trataron dos veces a la semana con ActRIIa-Fc_m (10 mg/kg, s.c.) o vehículo (PBS) durante un total de 8 semanas. Se recogieron muestras de sangre antes del inicio de la administración, tras 4 semanas de tratamiento y tras 8 semanas de tratamiento (n=8 por cohorte y punto temporal). Los ratones de control mostraron una caída del nivel del hematocrito durante el periodo de tratamiento de 8 semanas, mientras que el tratamiento de ActRIIa-Fc_m evitó la caída a las 4 semanas y además produjo una tendencia beneficiosa a las 8 semanas (figura 17). Se observaron beneficios similares del tratamiento de ActRIIa-Fc_m comparado con el control en un segundo estudio que difería principalmente en la utilización de un periodo de recuperación más prolongado (2 meses) y una dieta estándar. De esta manera, ActRIIa-Fc_m puede estimular la eritropoyesis suficientemente para evitar o atenuar la anemia en un modelo de enfermedad renal crónica.

15 Conjuntamente, dichos resultados indican que las proteínas de fusión de ActRIIa-Fc solubles pueden utilizarse como antagonistas de la señalización por ligandos de la familia de TGF para incrementar los niveles circulantes de glóbulos rojos y, de esta manera, tratar las anemias hipoproliferativas que resultan de enfermedades crónicas tales como cáncer y enfermedad renal, y potencialmente también otras enfermedades inflamatorias o infecciosas. Observar que los efectos de ACE-011 sobre la anemia en pacientes humanos son típicamente robustos en comparación con los efectos más modestos en roedores.

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

REIVINDICACIONES

1. Antagonista de activina-ActRIIa para la utilización en el tratamiento de anemia asociada a mielofibrosis en un paciente que lo necesita, en el que el antagonista comprende un polipéptido ActRIIa soluble que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
 - a) una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica a SEC ID nº 3,
 - b) una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica a SEC ID nº 2, y
 - c) una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica a SEC ID nº 7.
2. Antagonista para la utilización según la reivindicación 1, en el que el polipéptido ActRIIa comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 95% idéntica a la SEC ID nº 3.
3. Antagonista para la utilización según la reivindicación 1, en el que el polipéptido ActRIIa comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 95% idéntica a la SEC ID nº 2.
4. Antagonista para la utilización según la reivindicación 1, en el que el polipéptido ActRIIa comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 95% idéntica a la SEC ID nº 7.
5. Antagonista para la utilización según cualquier reivindicación anterior, en el que el polipéptido presenta una o más de las características siguientes:
 - i) se une a un ligando de ActRIIa con una K_D de por lo menos 10^{-7} M, y
 - ii) inhibe la señalización de ActRIIa en la célula.
6. Antagonista para la utilización en cualquier reivindicación anterior, en el que dicho antagonista es una proteína de fusión, incluyendo, además del dominio de polipéptido ActRIIa, una o más partes polipeptídicas que potencian una o más de estabilidad *in vivo*, semivida *in vivo*, incorporación/administración, localización o distribución en los tejidos, formación de complejos proteicos y/o purificación.
7. Antagonista para la utilización según la reivindicación 6, en el que dicha proteína de fusión comprende una parte polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en: un dominio Fc de inmunoglobulina y una albúmina sérica.
8. Antagonista para la utilización según cualquier reivindicación anterior, en el que dicho polipéptido comprende uno o más residuos aminoácidos modificados seleccionados de: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con una fracción lípido y un aminoácido conjugado con un agente derivatizante orgánico.
9. Antagonista para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que la proteína de fusión es una proteína de fusión de ActRIIa-Fc que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
 - a) la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 3,
 - b) la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2,
 - c) la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 7.
10. Antagonista para la utilización según cualquier reivindicación anterior, en el que el polipéptido se une a la activina.
11. Antagonista para la utilización según la reivindicación 10, en el que el polipéptido se une a la activina A.
12. Antagonista para la utilización según la reivindicación 10, en el que el polipéptido se une a la activina B.
13. Antagonista para la utilización según cualquier reivindicación anterior, en el que el polipéptido se une a GDF11.

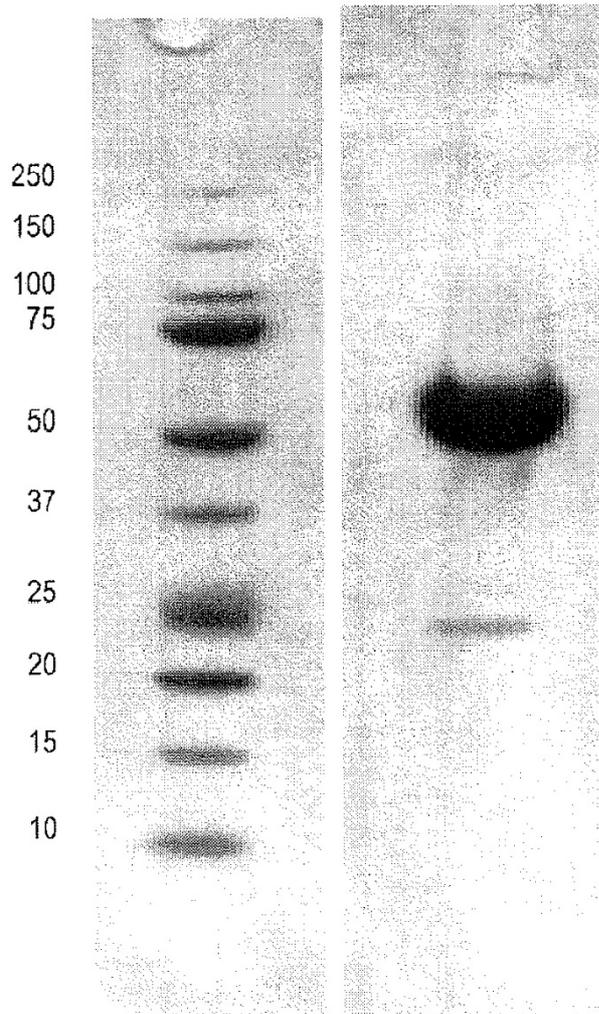
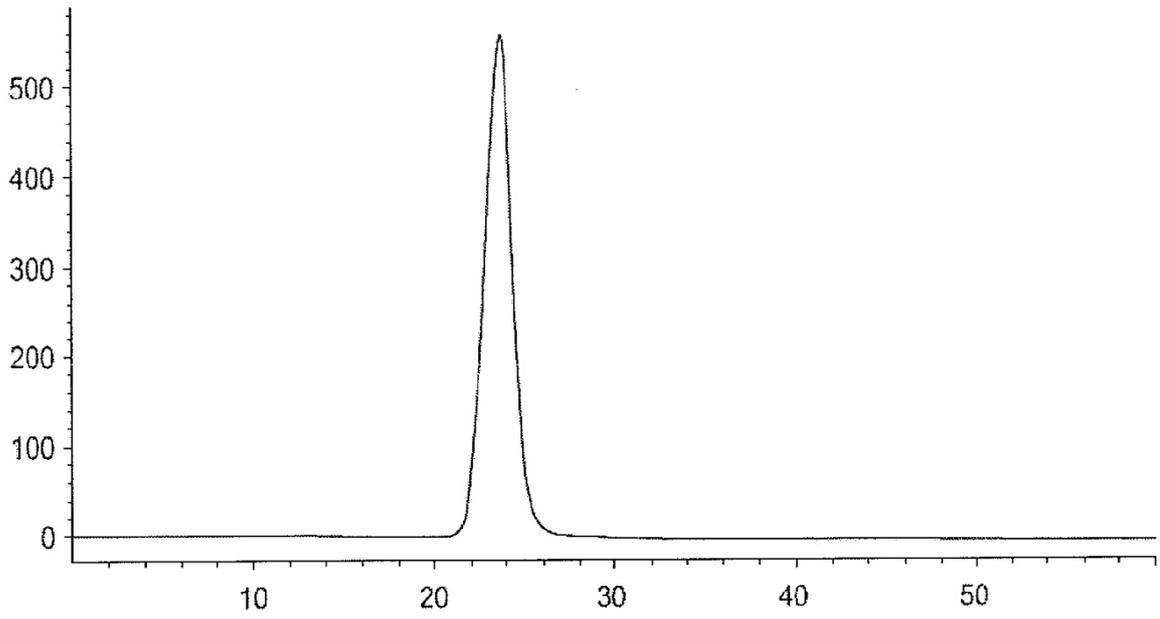
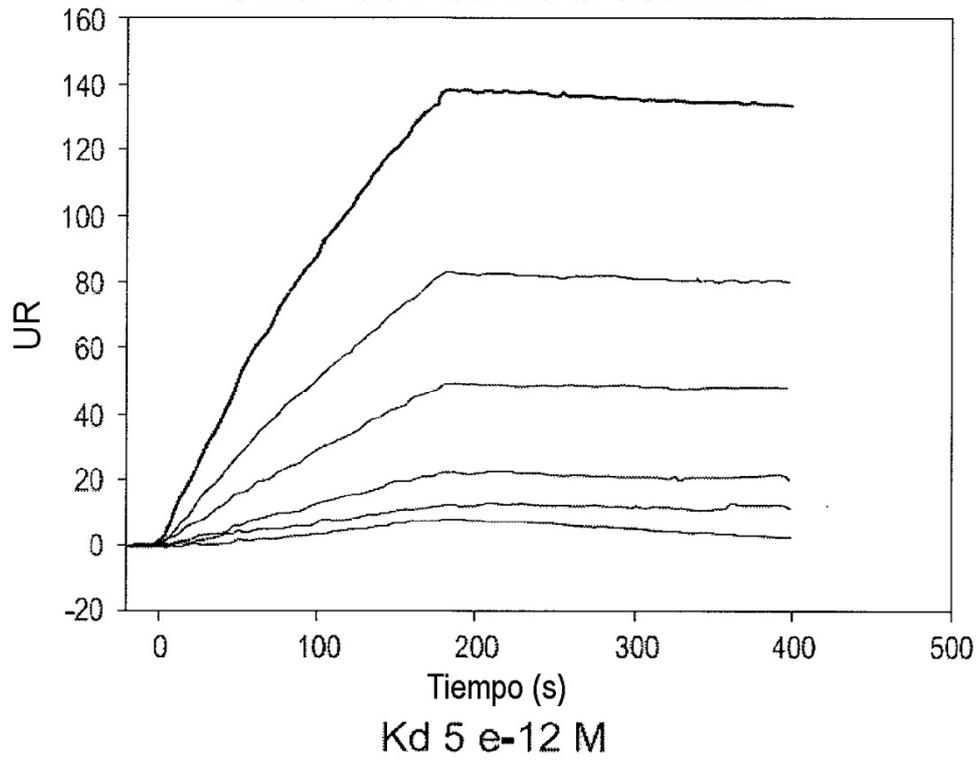


Figura 1

Unión de ActRIIa a activina



Unión de ActRIIa a GDF11

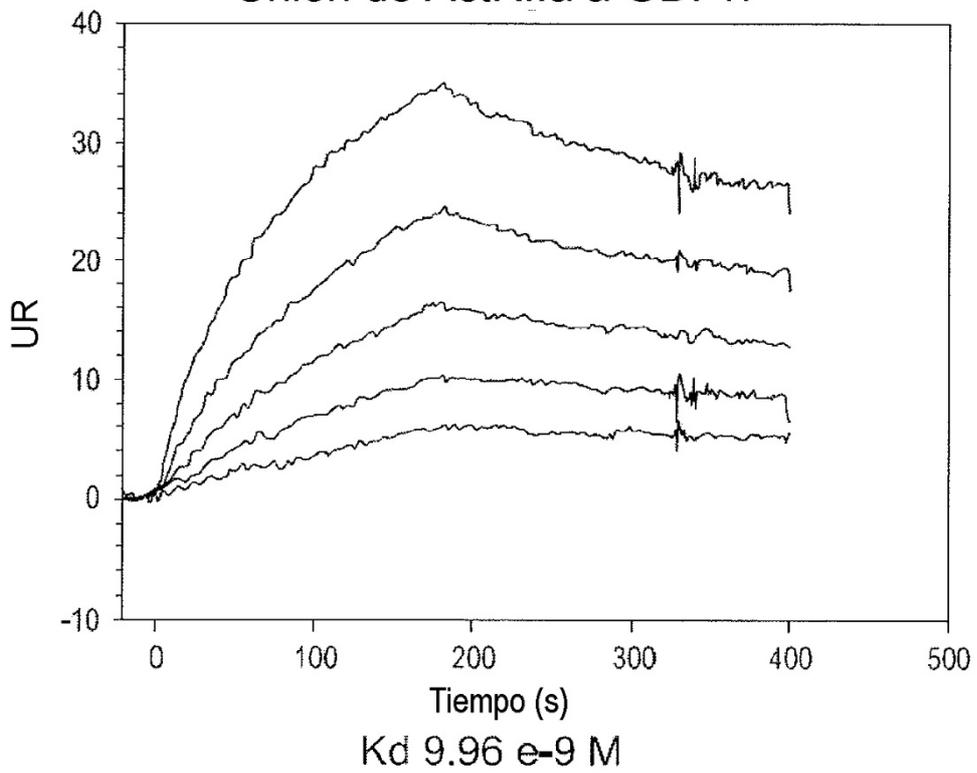


Figura 2

Efecto de ActRIIA-Fc sobre el recuento de GR en NHP hembra

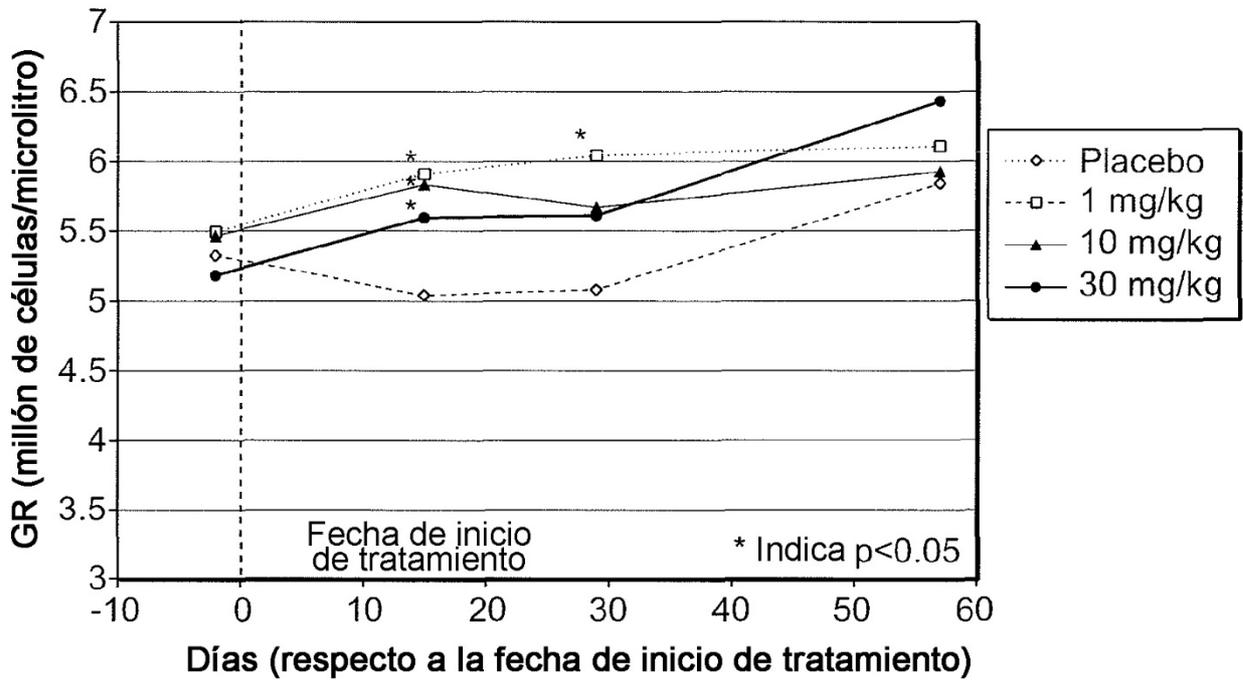


Figura 3A

Efectos de ActRIIA-Fc sobre la hemoglobina en NHP hembra

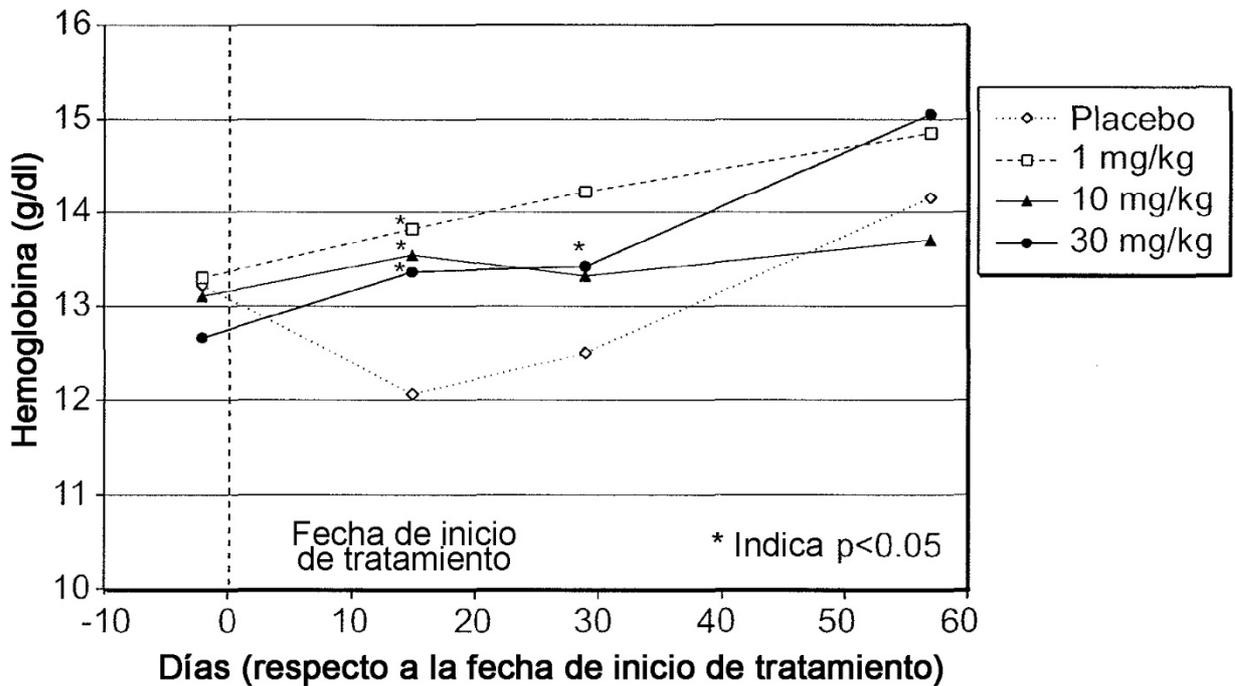


Figura 3B

Efecto de ActRIIA-Fc sobre el recuento de GR en NHP macho

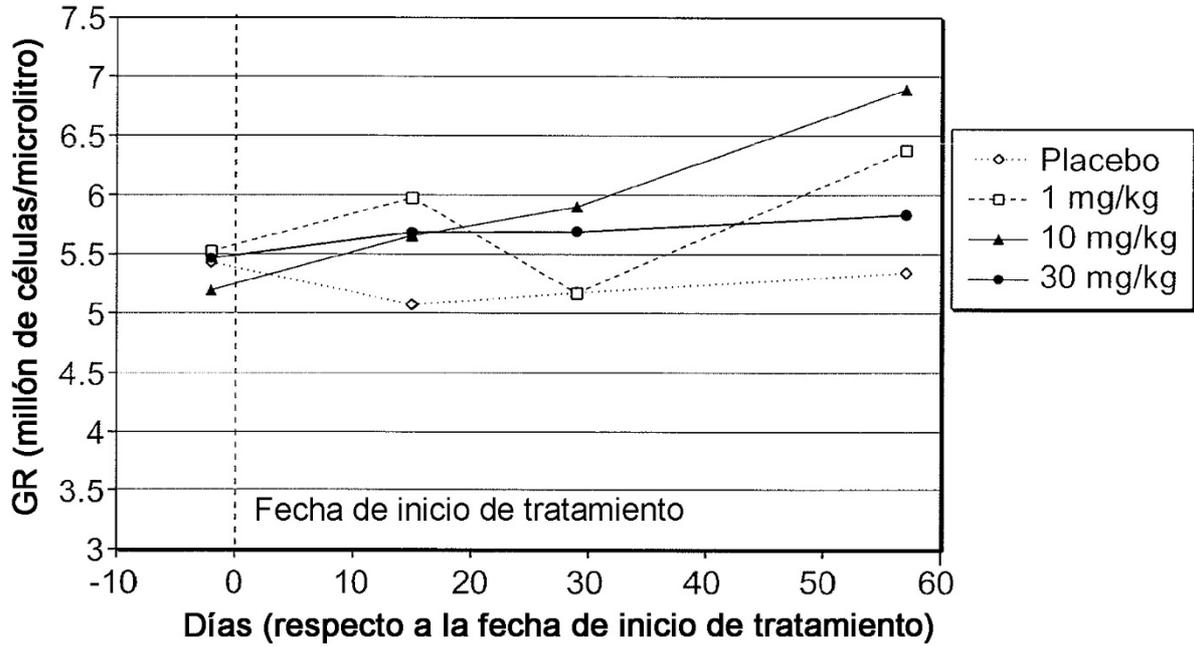


Figura 4A

Efectos de ActRIIA-Fc sobre la hemoglobina en NHP macho

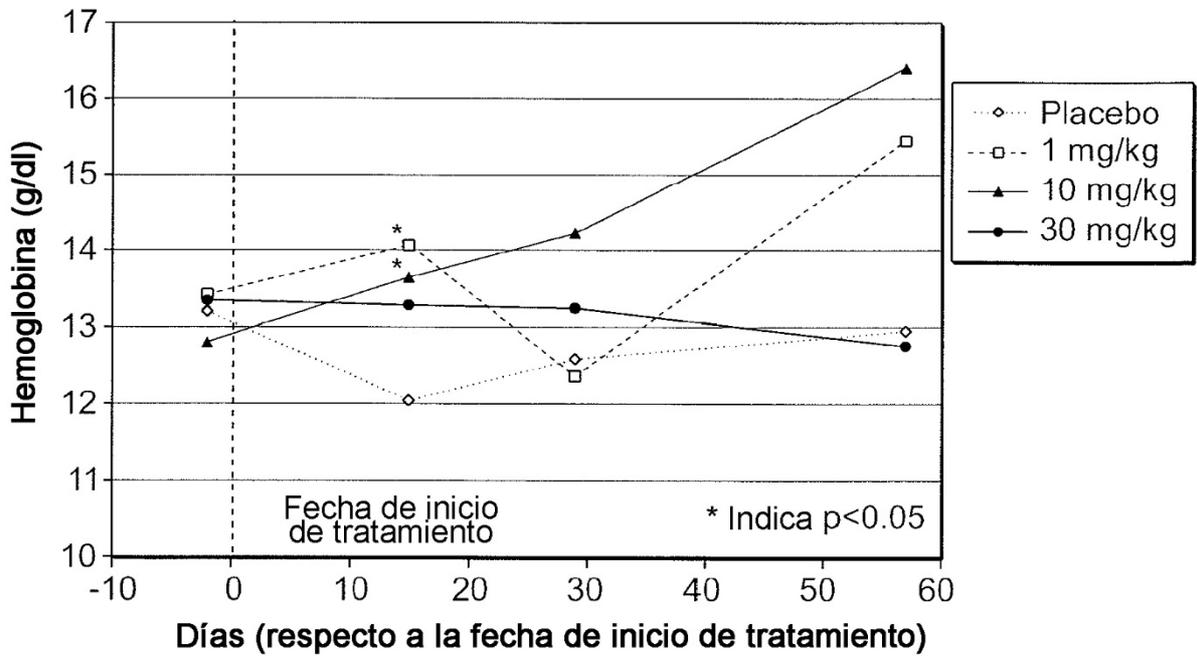


Figura 4B

Efecto de ActRIIA-Fc sobre recuentos de reticulocitos en NHP hembra

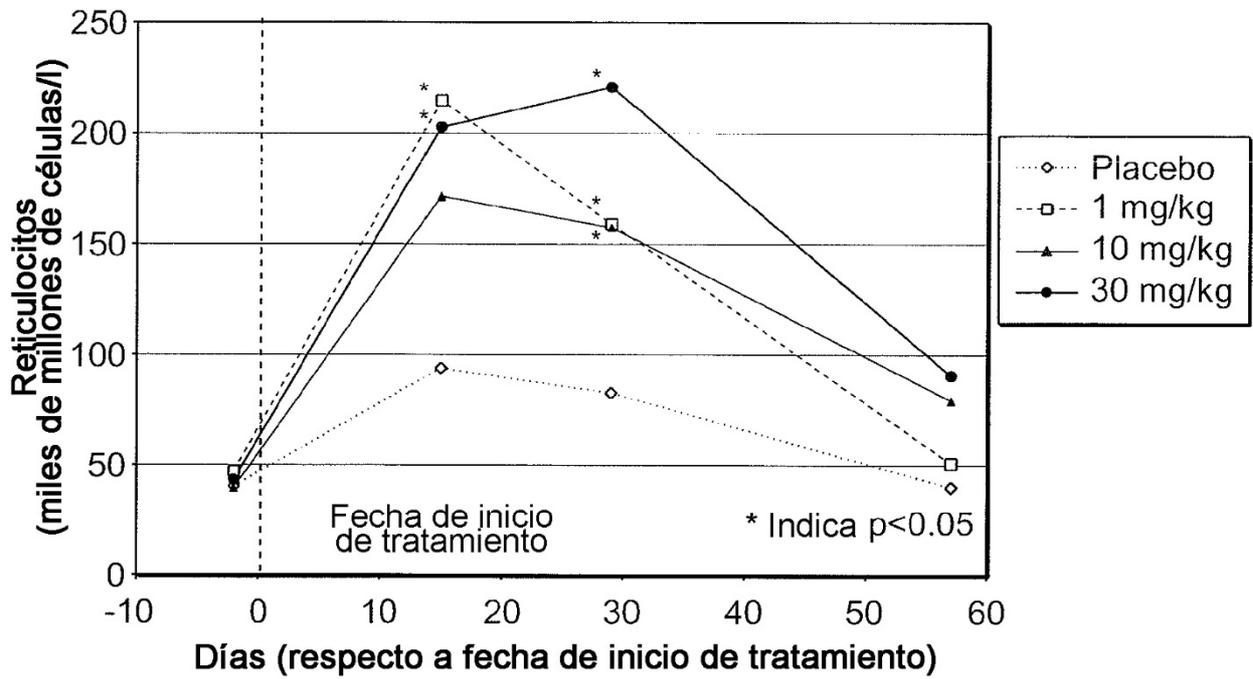


Figura 5A

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

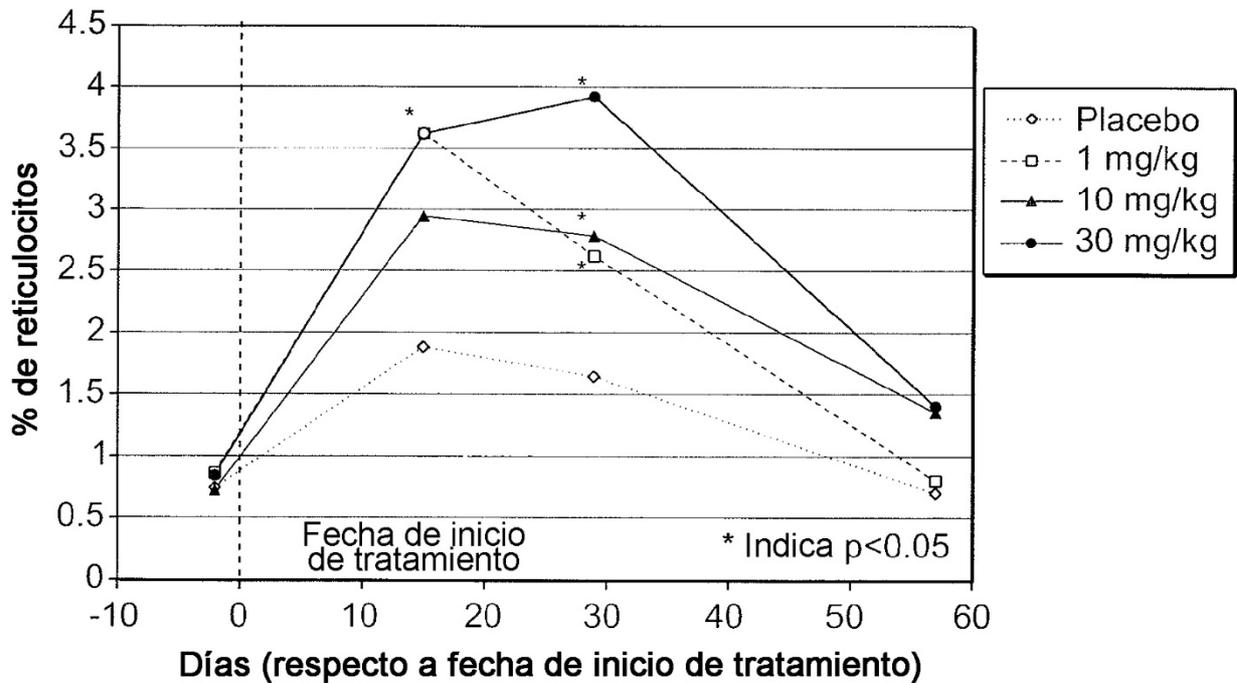


Figura 5B

Efecto de ActRIIA-Fc sobre recuento de reticulocitos en NHP macho

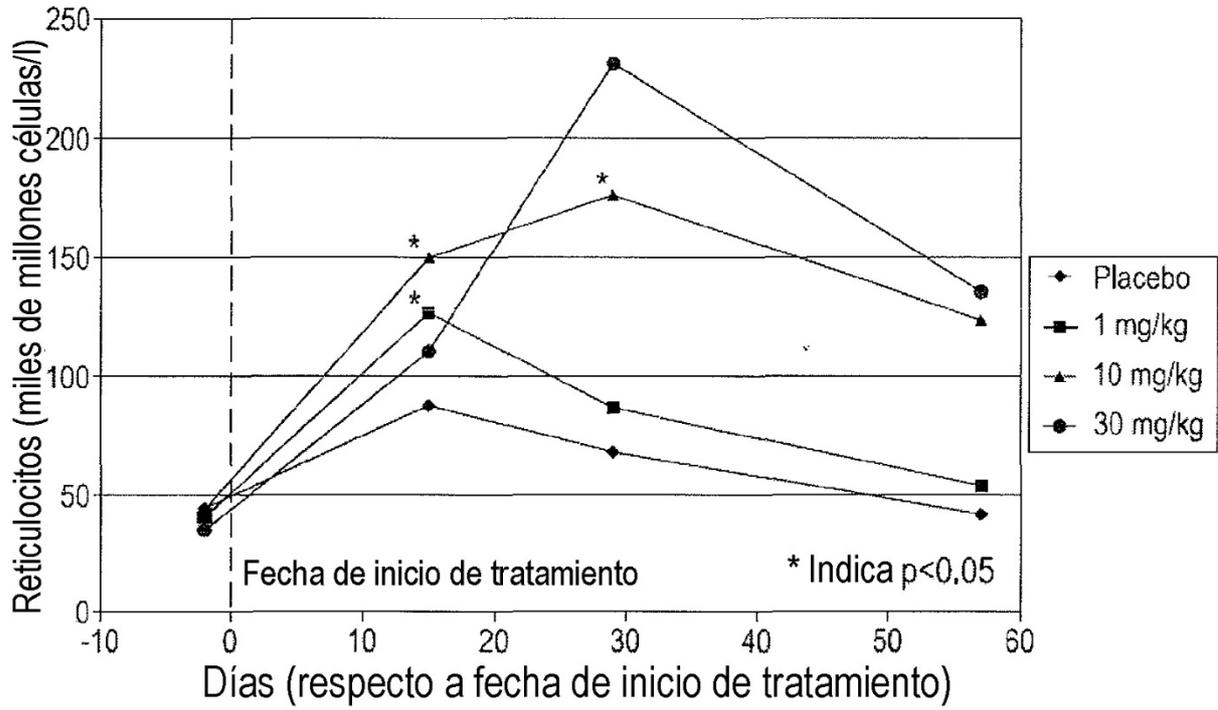


Figura 6A

Efecto de ActRIIA-Fc sobre porcentaje de reticulocitos en NHP macho

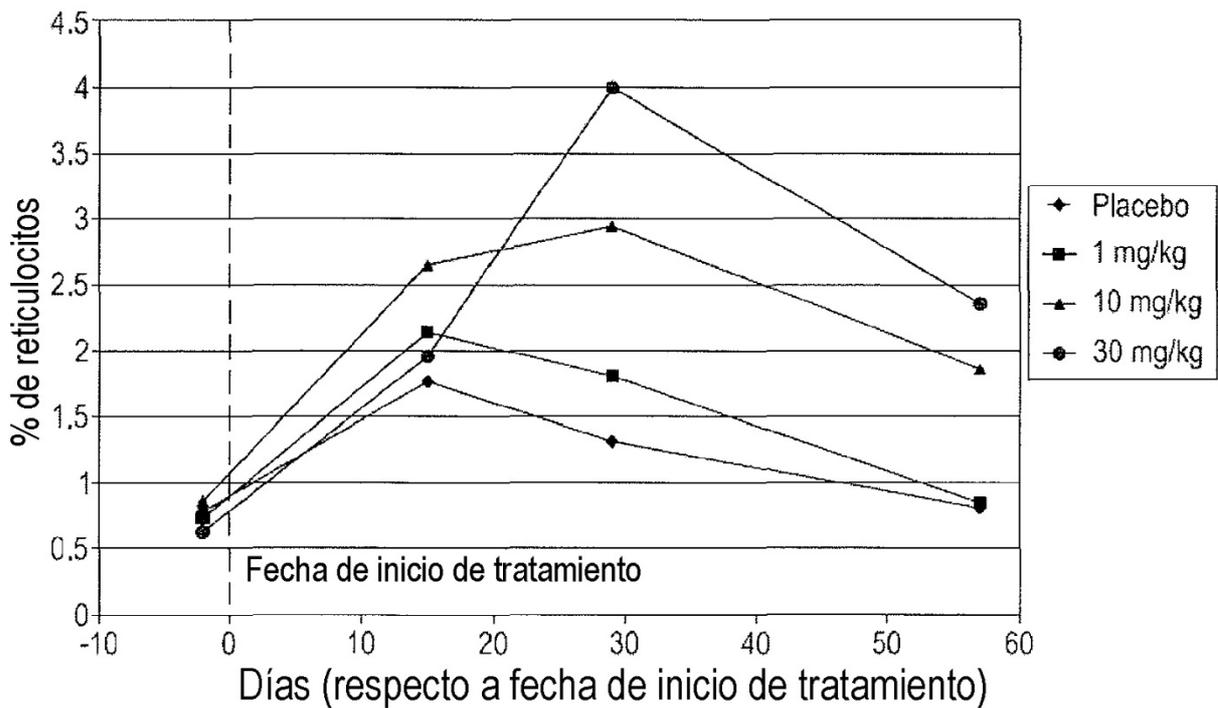


Figura 6B

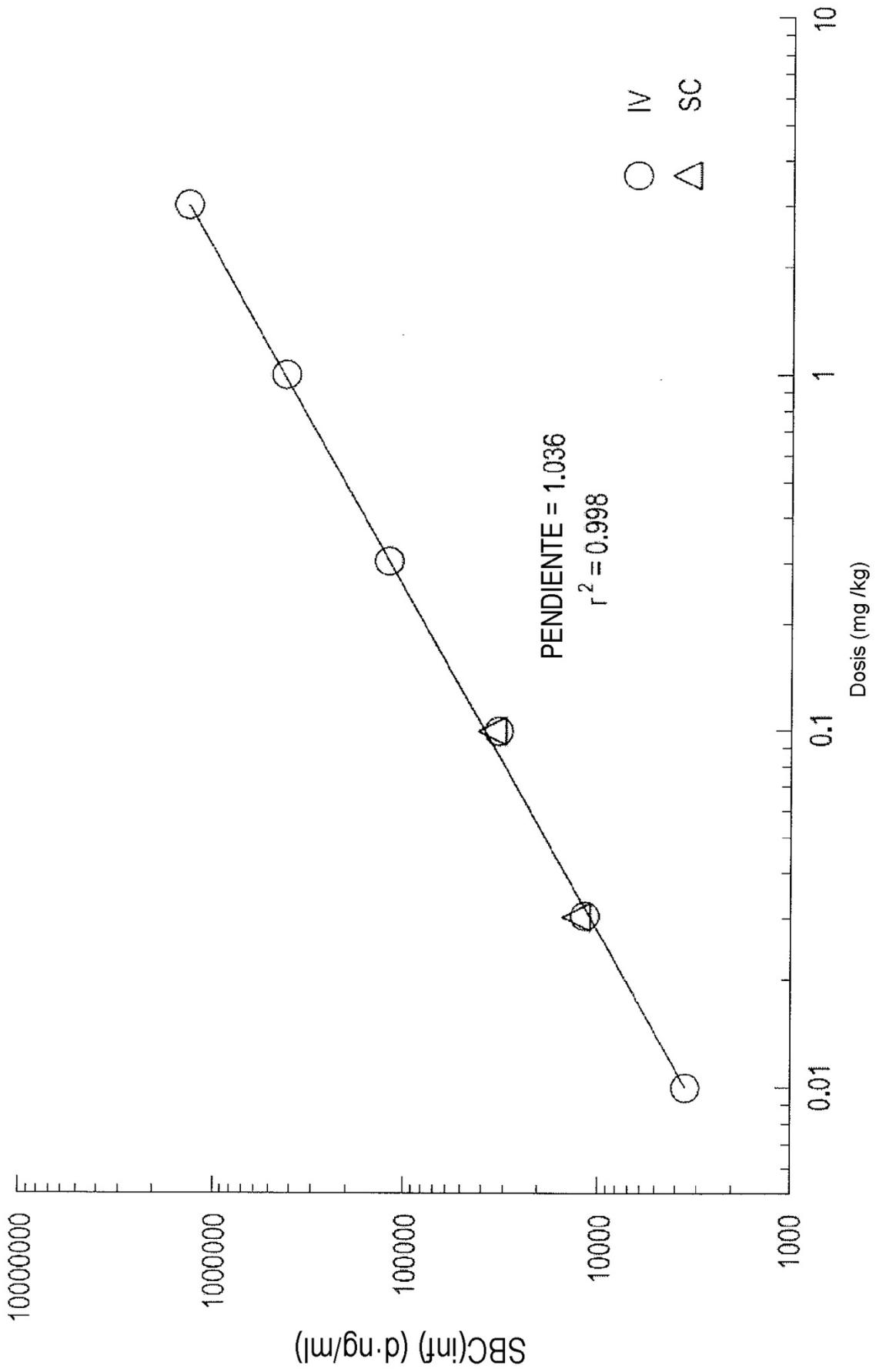


Figura 7

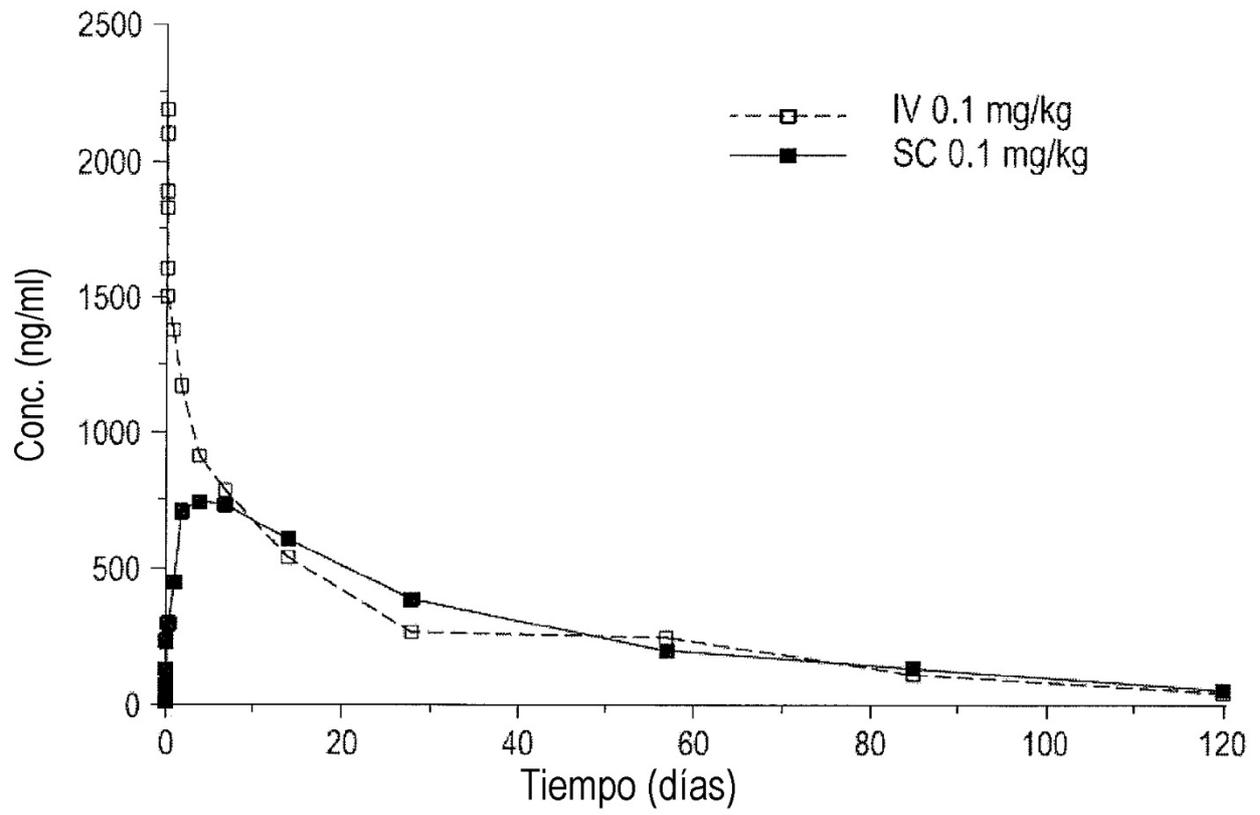


Figura 8

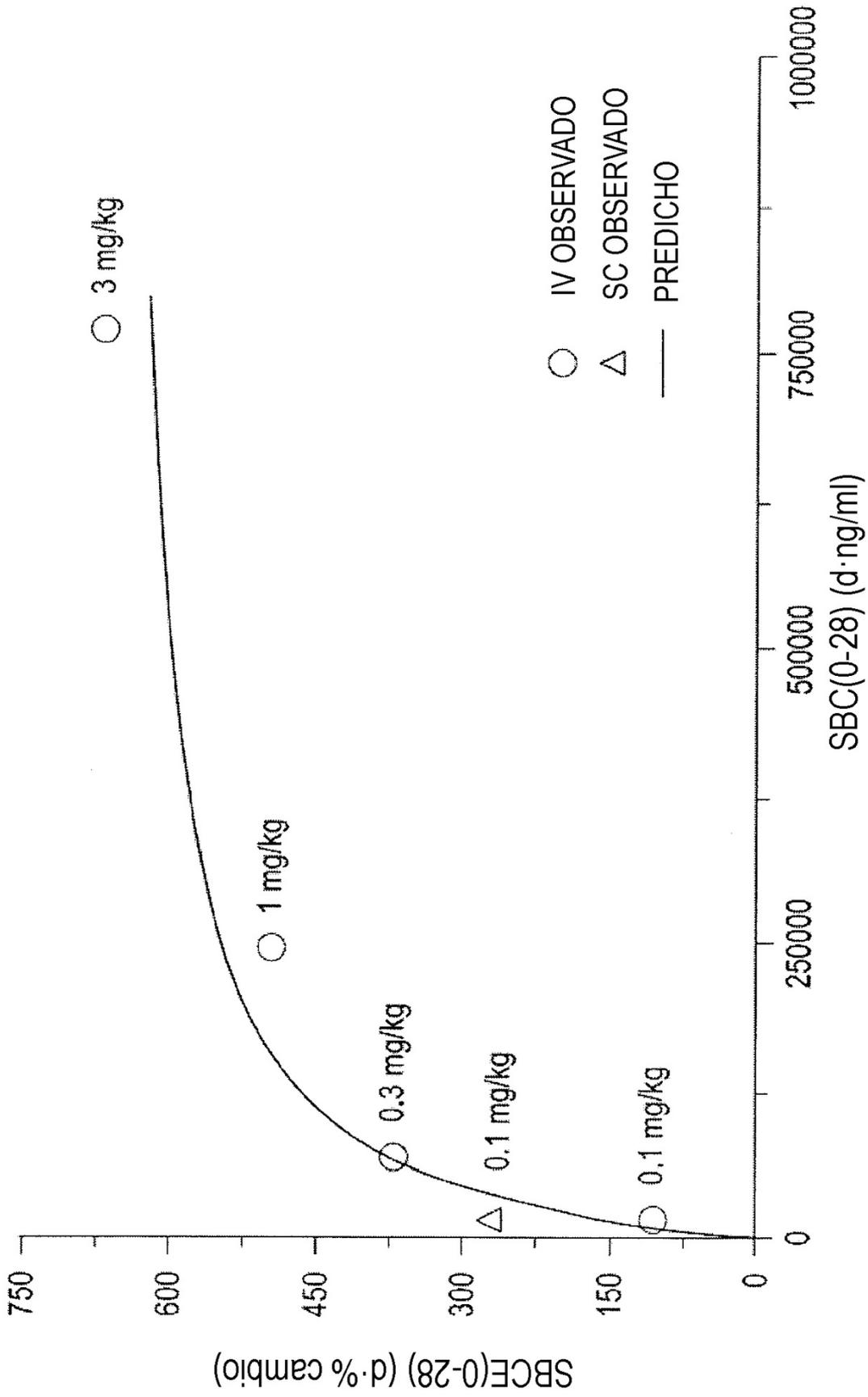


Figura 9

IV MEDIANA DE CAMBIO Y RANGO DE CAMBIO RESPECTO A LÍNEA BASE - HEMATÓCRITO

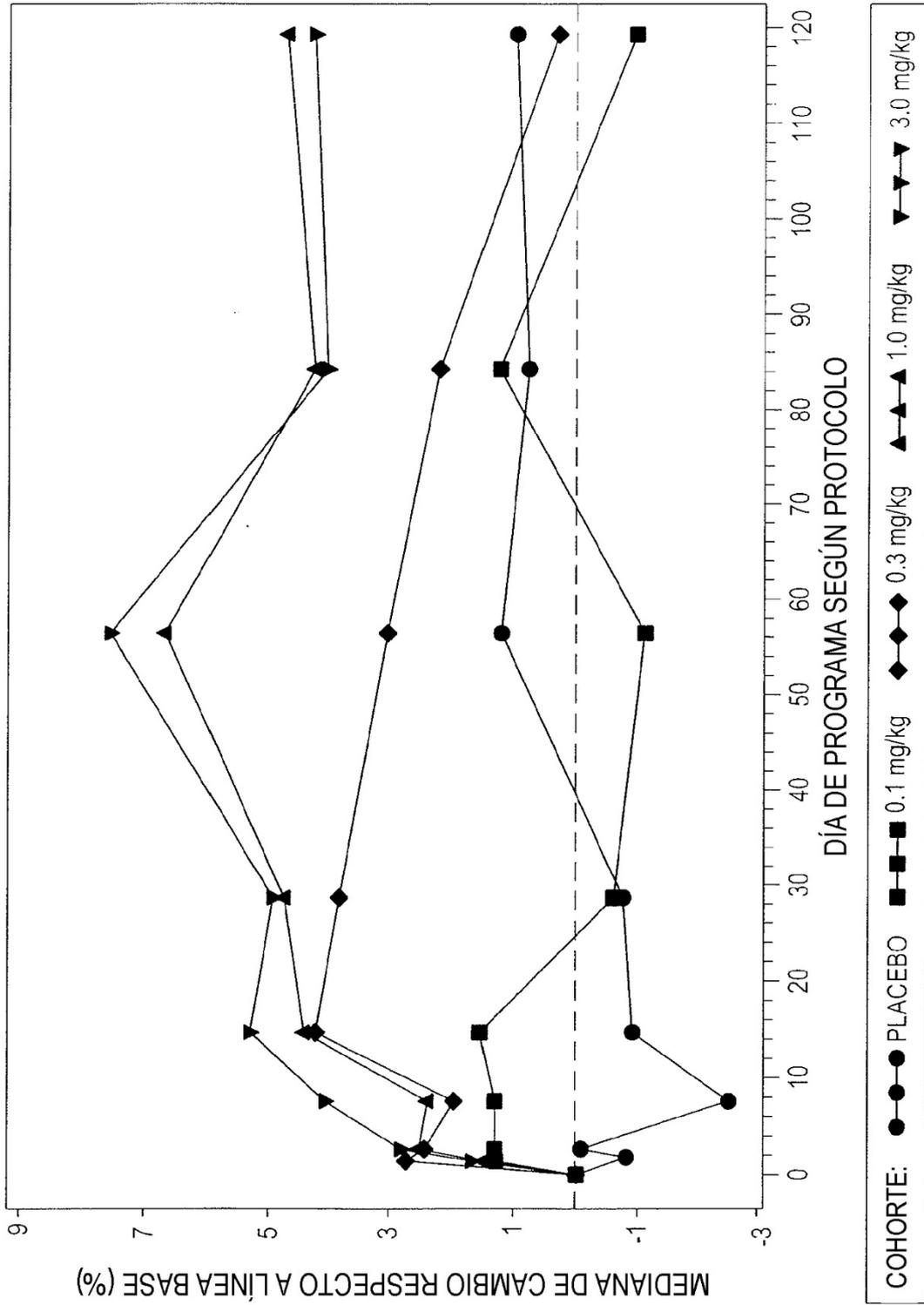


Figura 10

IV MEDIANA DE CAMBIO Y RANGO DE CAMBIO RESPECTO LÍNEA BASE - HEMOGLOBINA

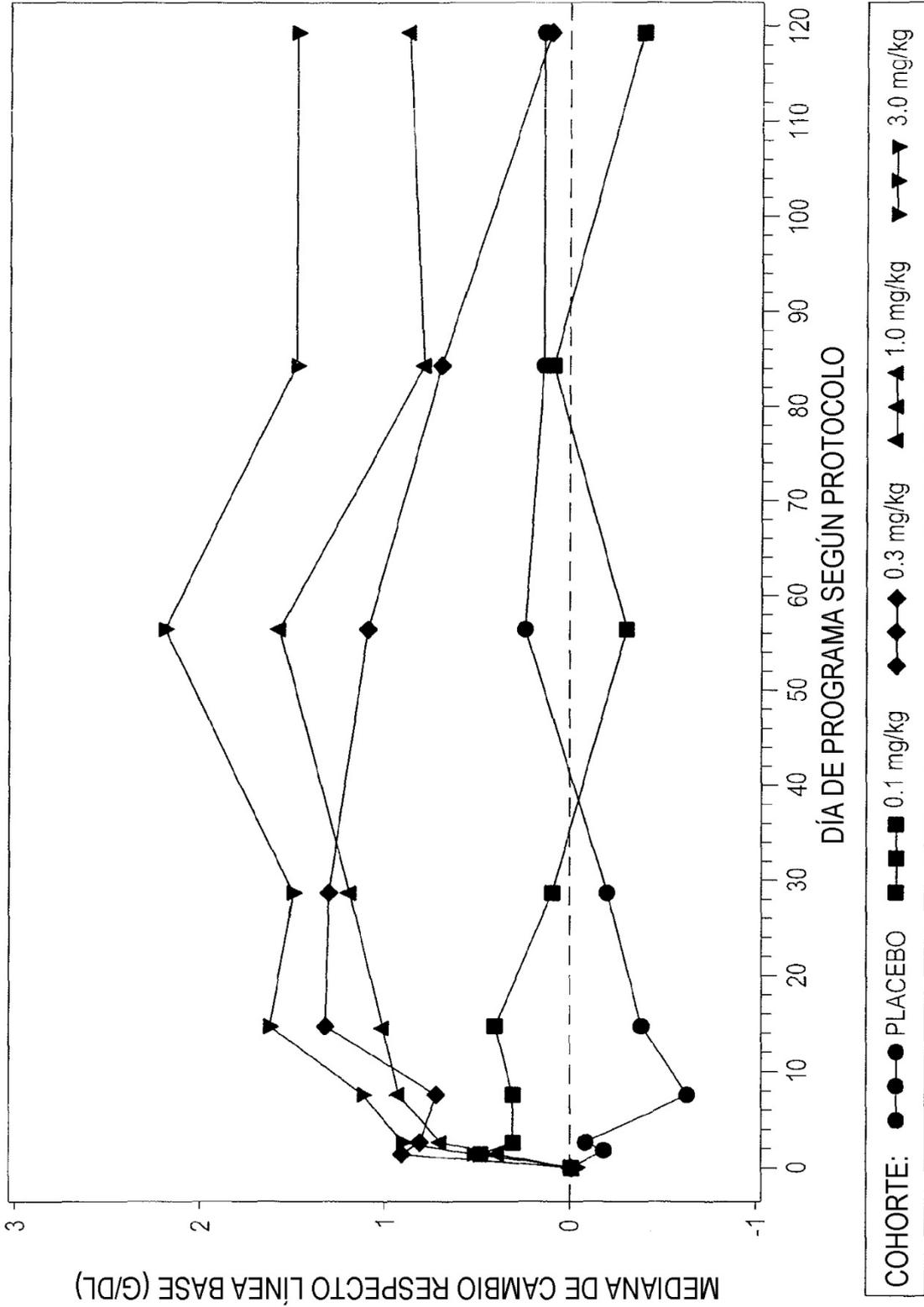


Figura 11

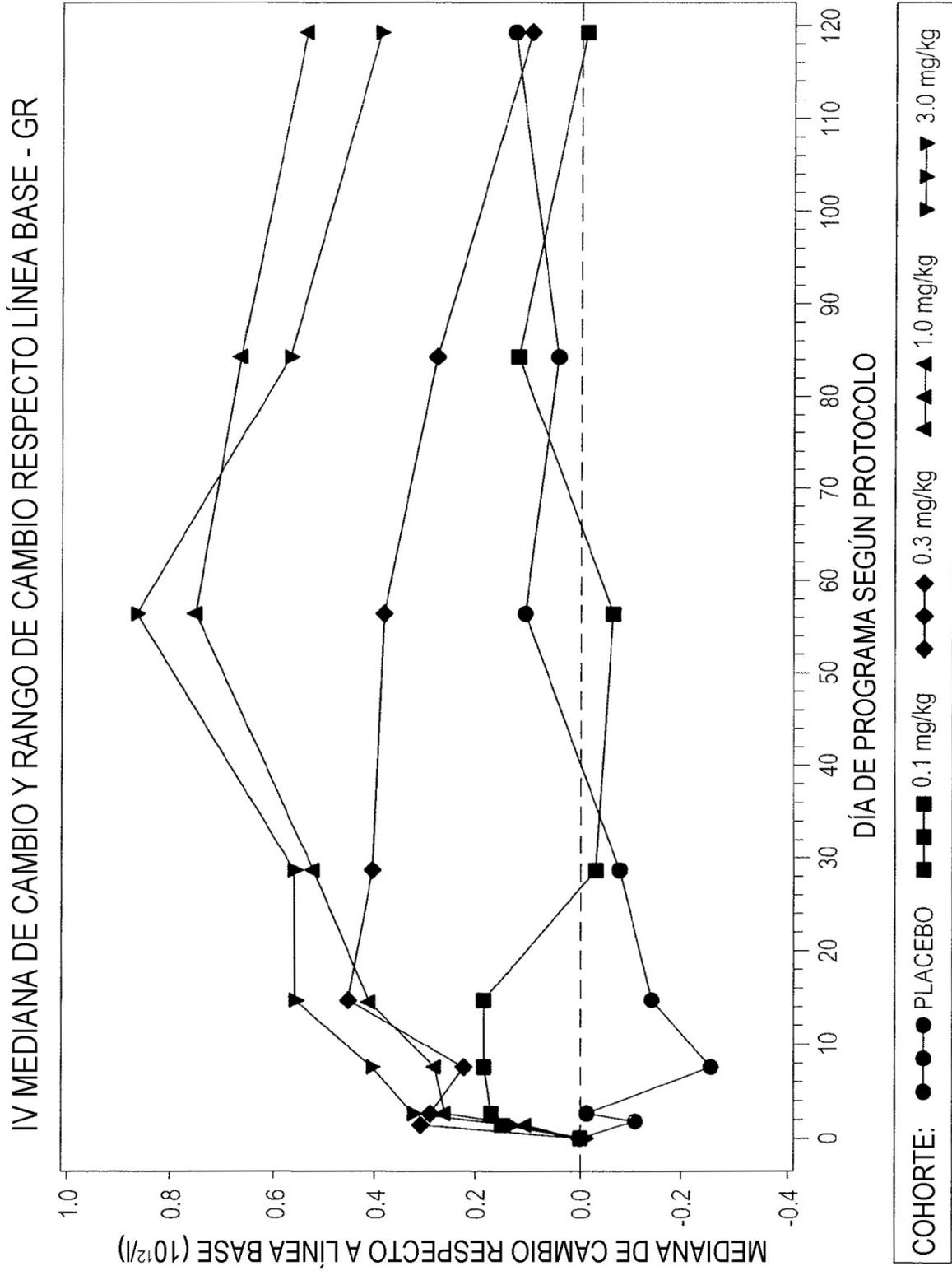


Figura 12

MEDIANA DE CAMBIO Y RANGO DE CAMBIO RESPECTO A LÍNEA BASE - RECUENTO DE RETICULOCITOS (%)

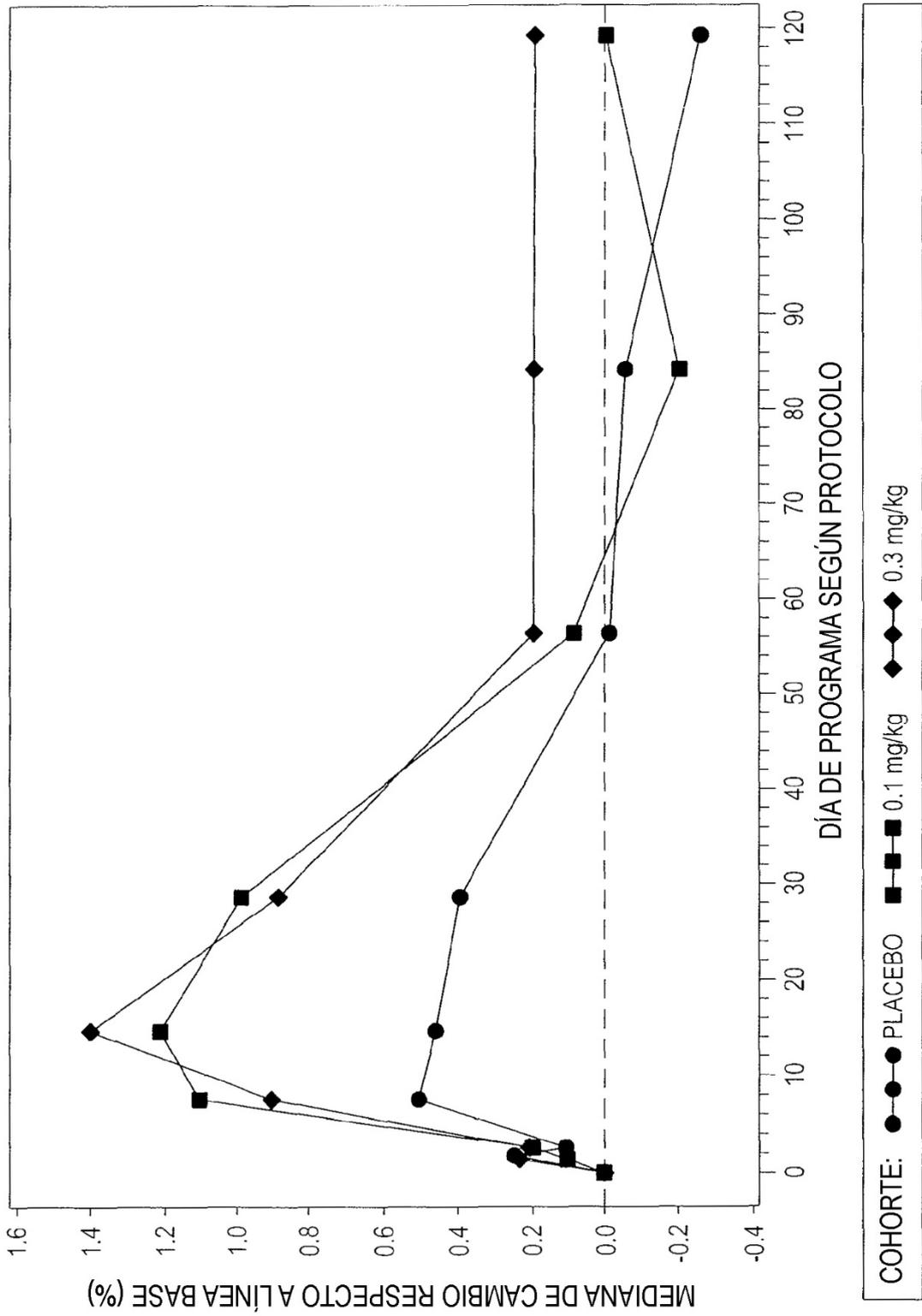


Figura 13

ActRIIa	ILGRSETQEC	LFFNANWEKD	RTNQTVGVEPC	YGDKDKRRHC	FATQKNISGS
ActRIIb	GRGEAETREC	IYYNANWELE	RTNOSGIERC	EGEQDKRLHC	YASWRNSSGT
	IEIVKQGCWL	DDINCYCRTD	CVEKKDSPEV	YFCCCEGNMC	NEKFSYFPPEM
	IELVKKGCWL	DDFNICYDRQE	CVA T EENPQV	YFCCCEGNFC	NERFTHLPEA
	EVTQPTSNPV	TPKPPT			
	GGPEVTYEPP	PTAPT			

Figura 14

EFFECTO DE ActRIIA-Fc_m SOBRE ANEMIA INDUCIDA POR QUIMIOTERAPIA EN RATONES

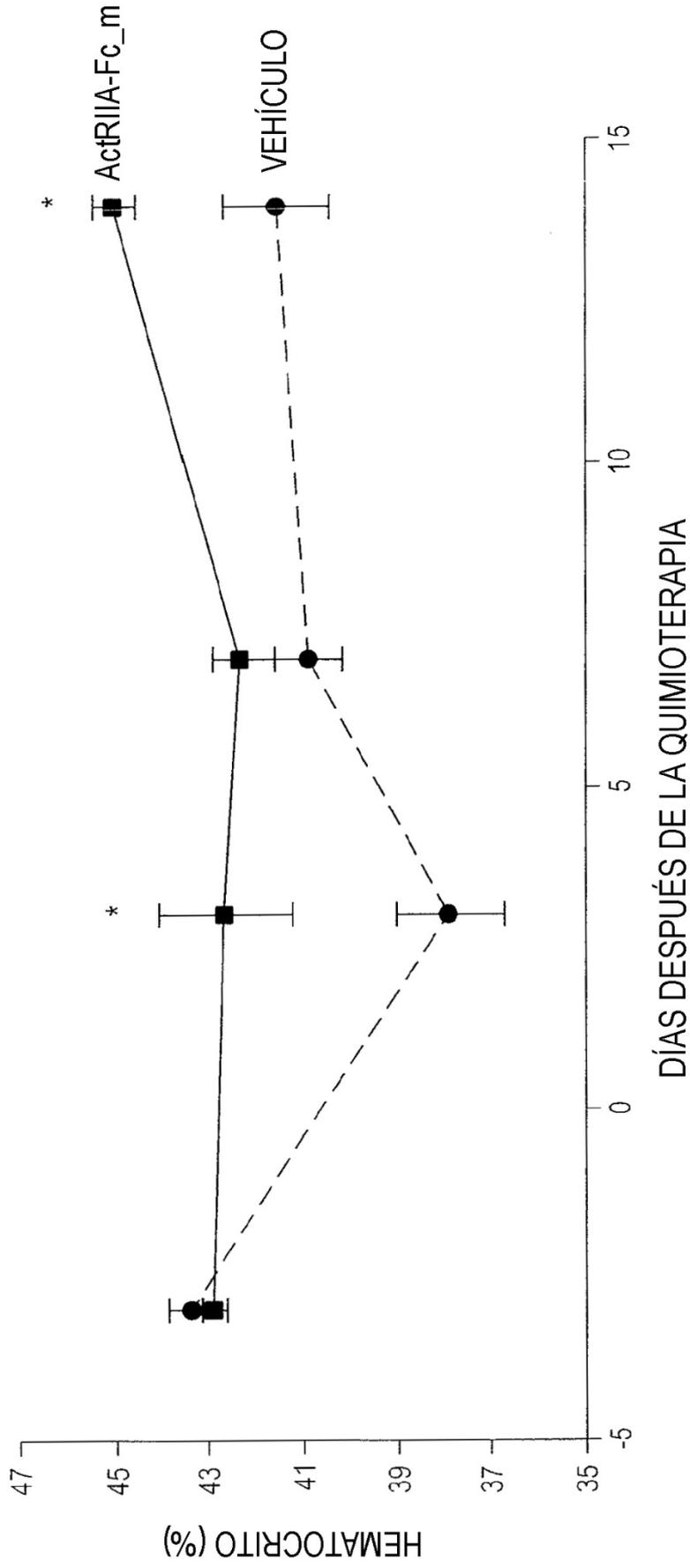


Figura 15

EFFECTO DEPENDIENTE DE LA DOSIS DE ActRIIA-Fc_m SOBRE ANEMIA INDUCIDA POR QUIMIOTERAPIA EN RATONES

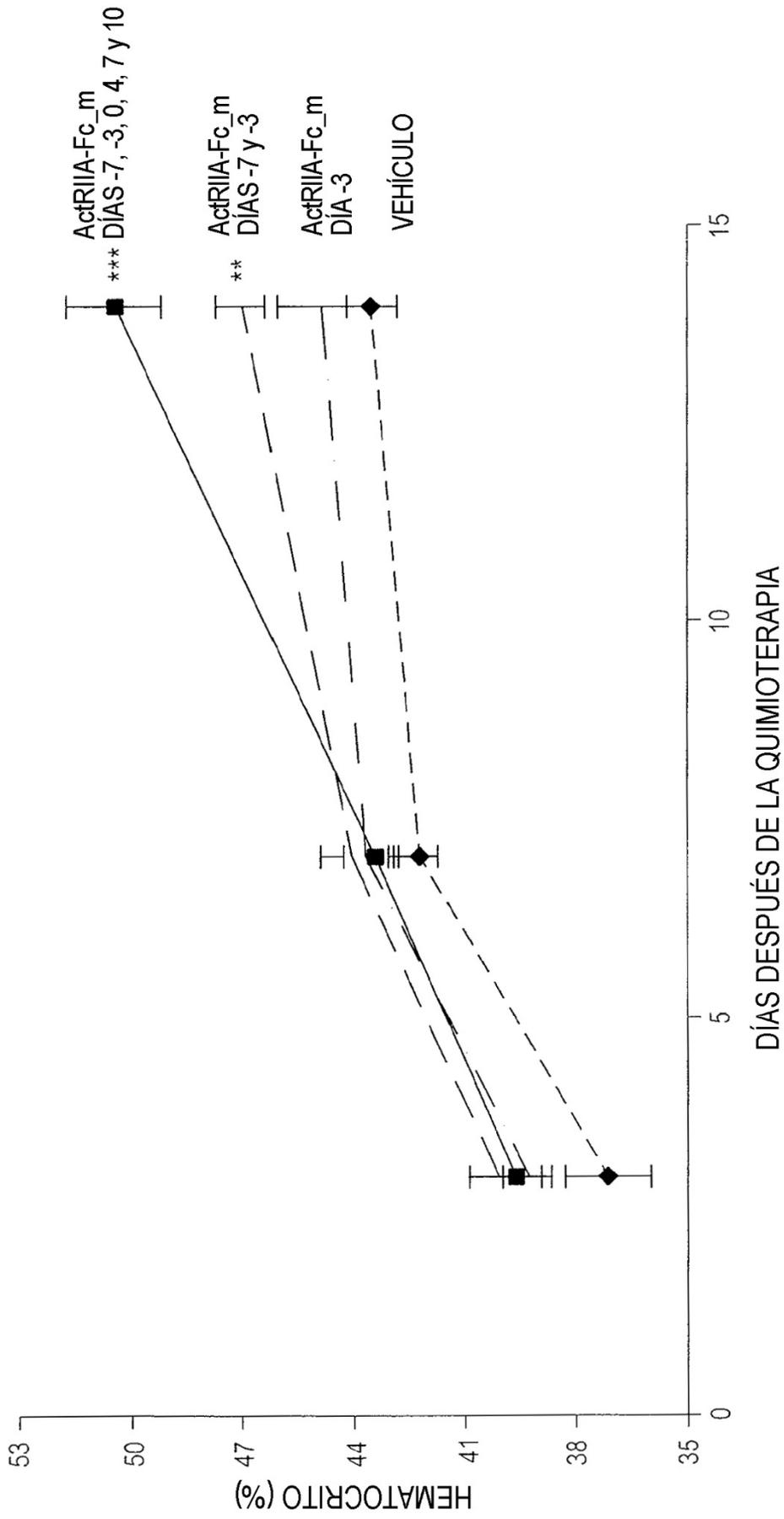


Figura 16

EFFECTO DE ActRIIA-Fc_m SOBRE ANEMIA EN UN MODELO DE RATÓN DE ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

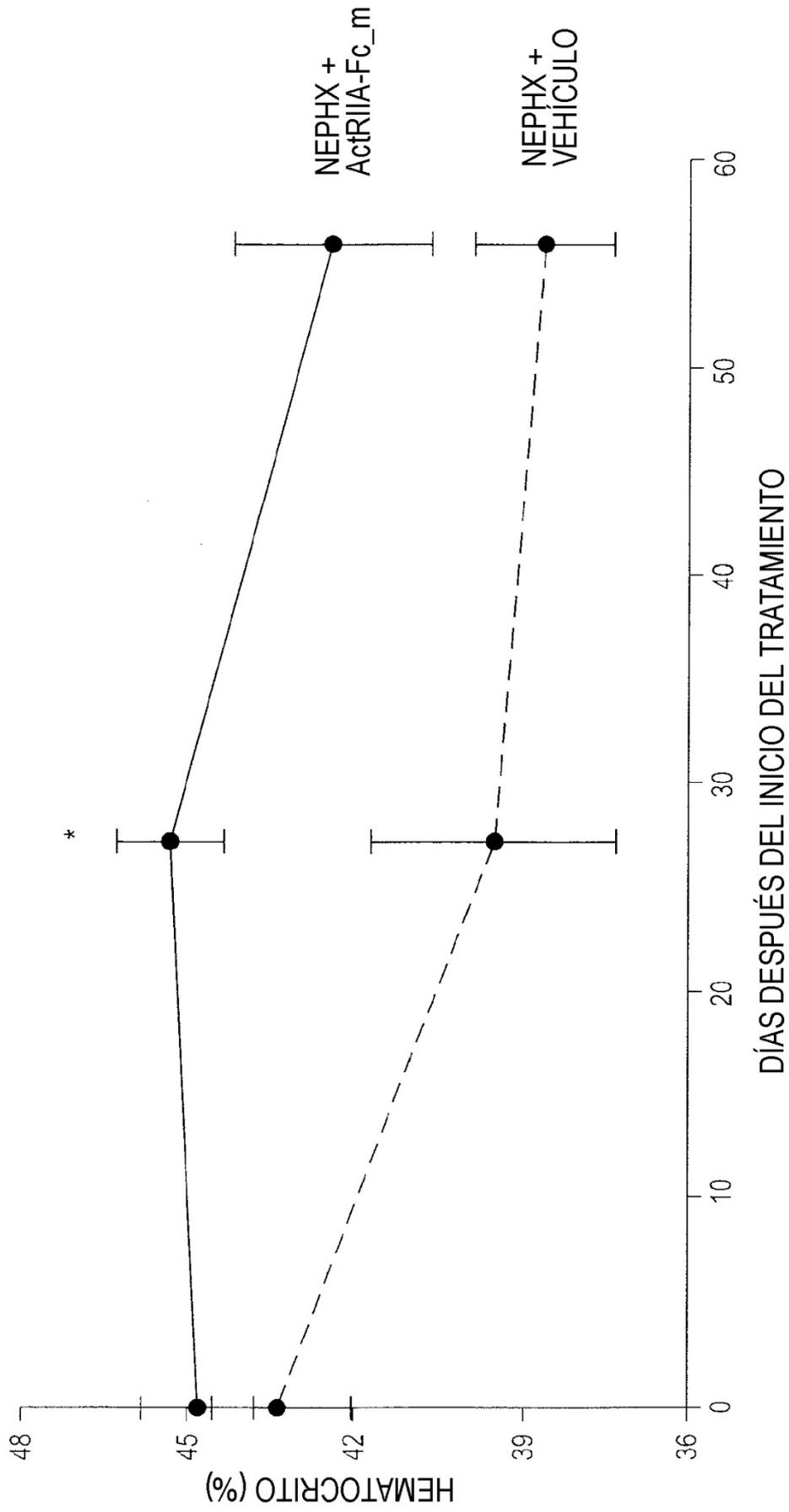


Figura 17