

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 139**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2009** **E 18198713 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020** **EP 3494986**

54 Título: **Trampas de GDF**

30 Prioridad:

14.08.2008 US 189094 P

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

25.02.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 808 139 T3

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

DESCRIPCIÓN

Trampas de GDF

5 Aplicaciones relacionadas

Antecedentes

10 El glóbulo rojo maduro, o eritrocito, es responsable del transporte de oxígeno en los sistemas circulatorios de los vertebrados. Los glóbulos rojos transportan altas concentraciones de hemoglobina, una proteína que une el oxígeno en los pulmones a una presión parcial de oxígeno (pO₂) relativamente alta y entrega oxígeno a áreas del cuerpo con una pO₂ relativamente baja.

15 Los glóbulos rojos maduros se producen a partir de células madre hematopoyéticas pluripotentes en un proceso denominado eritropoyesis. La eritropoyesis postnatal ocurre principalmente en la médula ósea y en la pulpa roja del bazo. La acción coordinada de diversas vías de señalización controla el equilibrio de la proliferación celular, la diferenciación, la supervivencia y la muerte. En 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 aumentar o disminuir en respuesta a diversos estímulos, incluido el aumento o la disminución de la tensión de oxígeno o la demanda de tejidos. El proceso de eritropoyesis comienza con la formación de células precursoras comprometidas con el linaje y avanza a través de una serie de distintos tipos de células precursoras. Las etapas finales de la eritropoyesis se producen cuando los reticulocitos se liberan en el torrente sanguíneo y pierden sus mitocondrias y ribosomas al asumir la morfología de los glóbulos rojos maduros. Un nivel elevado de reticulocitos, o una proporción elevada de reticulocitos:eritrocitos, en la sangre es indicativo de un aumento en las tasas de producción de glóbulos rojos.

25 La eritropoyetina (Epo) es ampliamente reconocida como el regulador positivo más significativo de la eritropoyesis en vertebrados postnatales. Epo regula la respuesta eritropoyética compensatoria a la tensión de oxígeno del tejido reducida (hipoxia) y los niveles bajos de glóbulos rojos o niveles bajos de hemoglobina. En humanos, los niveles elevados de Epo promueven la formación de glóbulos rojos al estimular la generación de progenitores eritroides en la médula ósea y el bazo. En el ratón, la Epo mejora la eritropoyesis principalmente en el bazo.

30 Los médicos utilizan diversas formas de Epo recombinante para aumentar los niveles de glóbulos rojos en una variedad de entornos clínicos, y particularmente para el tratamiento de la anemia. La anemia es una afección ampliamente definida caracterizada por niveles de hemoglobina o glóbulos rojos en la sangre más bajos de lo normal. En algunos casos, la anemia es 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 and Provan (2000) Lancet 355, 1169-1175). La anemia puede ser el resultado de una tasa de producción reducida o una tasa de destrucción incrementada de los glóbulos rojos o por la pérdida de glóbulos rojos debido a sangrado. La anemia puede ser el resultado de una variedad de trastornos que incluyen, por ejemplo, insuficiencia renal crónica, tratamiento de quimioterapia, síndrome mielodisplásico, artritis reumatoide y trasplante de médula ósea.

45 El tratamiento con Epo típicamente provoca un aumento de las hemoglobinas en aproximadamente 1-3 g/dL en humanos sanos durante un período de semanas. Cuando se administra a individuos anémicos, este régimen de tratamiento con frecuencia proporciona aumentos sustanciales en los niveles de hemoglobina y glóbulos rojos y conduce a mejoras en la calidad de vida y supervivencia prolongada. La Epo no es uniformemente efectiva, y muchas personas son resistentes incluso a dosis altas (Hori et al. (2000) Nephrol Dial Transplant 15, 43-50). Más del 50% de los pacientes con cáncer tienen una respuesta inadecuada a la Epo, aproximadamente el 10% con enfermedad renal en etapa terminal son hiporreactivos (Glaspy et al. (1997) J Clin Oncol 15, 1218-1234; Demetri et al. (1998) J Clin Oncol 16, 3412-3425), y menos del 10% con síndrome mielodisplásico responden favorablemente (Estey (2003) Curr Opin Hematol 10, 60-67). Varios factores, como inflamación, deficiencia de hierro y vitaminas, diálisis inadecuada, toxicidad por aluminio e hiperparatiroidismo pueden predecir una respuesta terapéutica deficiente, y los mecanismos moleculares de resistencia a Epo aún no están claros.

55 Por lo tanto, es un objeto de la presente divulgación proporcionar composiciones y métodos alternativos para aumentar los niveles de glóbulos rojos en pacientes.

Resumen de la presente divulgación

60 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28. El polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 28. El polipéptido puede consistir en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28.

65 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido del primer aspecto. El ácido nucleico puede comprender la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 30 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 27. El ácido nucleico puede estar operativamente unido a una o más secuencias reguladoras.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende el ácido nucleico aislado del segundo aspecto.

5 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una célula cultivada que comprende el vector del tercer aspecto. La célula puede ser una célula de mamífero, como una célula CHO.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un método para producir el polipéptido del primer aspecto, que comprende:

- 10 a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido, y
- b) recuperar el polipéptido así expresado,
- 15 en donde la célula:
- i) es la célula del cuarto aspecto,
- ii) comprende un vector, en donde el vector comprende un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 30, o
- 20 iii) comprende un vector, en donde el vector comprende un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 27. En el método del quinto aspecto, la célula puede ser una célula de mamífero, tal como una célula CHO.

25 En un sexto aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende el polipéptido del primer aspecto y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 En parte, la divulgación demuestra que las trampas de GDF pueden usarse para aumentar los niveles de hemoglobina y glóbulos rojos. Los polipéptidos variantes de ActRIIB que tienen una afinidad significativamente disminuida por la activina (por ejemplo, activina A y/o activina B) en relación con otros ligandos de ActRIIB, como GDF11 y/o miostatina, se denominan trampas de GDF. Las variantes de ActRIIB descritas en este documento son trampas de GDF a menos que se indique lo contrario. En particular, la divulgación demuestra que una trampa de GDF que es una forma soluble del polipéptido ActRIIB que tiene un residuo ácido en la posición 79 de la SEQ ID NO: 1, cuando se administra in vivo, aumenta los niveles de glóbulos rojos en la sangre. Por lo tanto, la divulgación proporciona métodos para usar trampas de GDF para aumentar los niveles de hemoglobina y glóbulos rojos en pacientes y para tratar trastornos asociados con niveles bajos de hemoglobina o glóbulos rojos en pacientes que los necesitan. Como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 12/012,652, las trampas de GDF se pueden usar para aumentar la masa muscular y disminuir la masa grasa.

40 La presente divulgación proporciona trampas de GDF que son polipéptidos ActRIIB variantes, que incluyen polipéptidos ActRIIB que tienen truncamientos amino y carboxi terminales y alteraciones de secuencia. Opcionalmente, las trampas de GDF pueden diseñarse para antagonizar preferentemente uno o más ligandos de receptores ActRIIB, como GDF8 (también llamado miostatina), GDF11, Nodal y BMP7 (también llamado OP-1). Ejemplos de trampas de GDF incluyen un conjunto de variantes derivadas de ActRIIB que han disminuido en gran medida la afinidad por la activina. Estas variantes exhiben efectos deseables en los glóbulos rojos mientras reducen los efectos en otros tejidos. Ejemplos de tales variantes incluyen aquellos que tienen un aminoácido ácido (por ejemplo, ácido aspártico, D o ácido glutámico, E) en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO 1. La trampa de GDF de la presente invención puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28, opcionalmente comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 28 o además consiste opcionalmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28. Otros polipéptidos de trampa de GDF comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende, consiste o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, 26, 29, 32, 37 o 38, y polipéptidos que son al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idénticos a cualquiera de los anteriores.

55 La divulgación proporciona preparaciones farmacéuticas que comprenden una trampa de GDF que se une a un ligando de ActRIIB tal como GDF8, GDF11, activina (por ejemplo, activina B), BMP7 o nodal, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, la trampa de GDF se une a un ligando ActRIIB con un Kd menor que 10 micromolar, menor que 1 micromolar, menor que 100 nanomolar, menor que 10 nanomolar o menor que 1 nanomolar. Opcionalmente, la trampa de GDF inhibe la señalización de ActRIIB, como los eventos de transducción de señal intracelular activados por un ligando ActRIIB. Una trampa de GDF para usar en dicha preparación puede ser cualquiera de las descritas en el presente documento, incluidas, por ejemplo, las trampas de GDF que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOS: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 o 40, o trampas de GDF que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOS: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 o 40, o trampas de GDF que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% idénticas a una

- secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 o 40 en la que la posición correspondiente a L79 en SEQ ID NO: 1 es un aminoácido ácido. Una trampa de GDF preferida para usar en dicha preparación consiste en, o consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26. Una trampa de GDF puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido ActRIIB natural, tal como uno que comprende al menos 10, 20 o 30 aminoácidos de una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 o 40 o una secuencia de SEQ ID NO: 2, que carece de C-terminal 1, 2, 3, 4, 5 o 10 a 15 aminoácidos y que carecen de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos en el extremo N-terminal. Un polipéptido preferido comprenderá un truncamiento en relación con la SEQ ID NO: 2 o 40 de entre 2 y 5 aminoácidos en el extremo N y no más de 3 aminoácidos en el extremo C. Una trampa de GDF puede incluir una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActRIIB (por ejemplo, en el dominio de unión a ligando) en relación con un polipéptido ActRIIB natural. La alteración en la secuencia de aminoácidos puede, por ejemplo, alterar la glucosilación del polipéptido cuando se produce en un mamífero, insecto u otra célula eucariota o alterar la escisión proteolítica del polipéptido en relación con el polipéptido ActRIIB natural.
- Una trampa de GDF puede ser una proteína de fusión que tiene, como un dominio, un polipéptido ActRIIB (por ejemplo, un dominio de unión a ligando de un ActRIIB con una o más variaciones de secuencia) y uno o más dominios adicionales que proporcionan una propiedad deseable, tales como farmacocinética mejorada, purificación más fácil, focalización en tejidos particulares, etc. Por ejemplo, un dominio de una proteína de fusión puede mejorar uno o más de la estabilidad in vivo, vida media in vivo, absorción/administración, localización o distribución de tejidos, formación de complejos proteicos, multimerización de la proteína de fusión y/o purificación. Las proteínas de fusión de trampa de GDF pueden incluir un dominio Fc de inmunoglobulina (de tipo salvaje o mutante) o una albúmina sérica. Una fusión de trampa de GDF puede comprender un conector relativamente no estructurado colocado entre el dominio Fc y el dominio ActRIIB extracelular. Este enlazador no estructurado puede corresponder a la región no estructurada de aproximadamente 15 aminoácidos en el extremo C-terminal del dominio extracelular de ActRIIB (la "cola"), o puede ser una secuencia artificial de entre 3 y 5, 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos que están relativamente libres de estructura secundaria. Un conector puede ser rico en residuos de glicina y prolina y puede, por ejemplo, contener secuencias repetidas de treonina/serina y glicinas (por ejemplo, TG₄) o SG₄ () singletes o repeticiones) o una serie de tres glicinas. Una proteína de fusión puede incluir una subsecuencia de purificación, tal como una etiqueta de epítipo, una etiqueta de FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión de GST. Una fusión de trampa de GDF puede comprender una secuencia guía. La secuencia guía puede ser una secuencia guía nativa de ActRIIB o una secuencia guía heteróloga. La secuencia guía puede ser una secuencia guía del activador de plasminógeno tisular (TPA). Una proteína de fusión de trampa de GDF puede comprender una secuencia de aminoácidos como se establece en la fórmula A-B-C. La porción B es un polipéptido ActRIIB truncado terminalmente N y C que consiste en la secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO: 2 o 40. Las porciones A y C pueden ser independientemente cero, uno o más de un aminoácido, y ambas porciones A y C son heterólogas a B. Las porciones A y/o C pueden estar unidas a la porción B a través de una secuencia enlazadora.
- Opcionalmente, una trampa de GDF incluye un polipéptido ActRIIB variante que tiene uno o más residuos de aminoácidos modificados seleccionados entre: un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con una unidad estructural lipídica, y un aminoácido conjugado con un agente de derivación orgánico. Una preparación farmacéutica también puede incluir uno o más compuestos adicionales, tales como un compuesto que se usa para tratar un trastorno asociado a ActRIIB. Preferiblemente, una preparación farmacéutica está sustancialmente libre de pirógenos. En general, es preferible que una trampa de GDF se exprese en una línea celular de mamífero que medie la glucosilación natural adecuada de la trampa de GDF para disminuir la probabilidad de una respuesta inmune desfavorable en un paciente. Las líneas celulares humanas y CHO se han usado con éxito, y se espera que sean útiles otros vectores de expresión de mamíferos comunes.
- La divulgación proporciona productos farmacéuticos envasados que comprenden una preparación farmacéutica descrita en este documento y etiquetada para su uso en el aumento de los niveles de glóbulos rojos en un ser humano.
- La divulgación proporciona trampas de GDF que son polipéptidos ActRIIB solubles que comprenden un dominio de unión a ligando alterado (por ejemplo, unión a GDF8). Las trampas de GDF con dominios de unión a ligando alterados pueden comprender, por ejemplo, una o más mutaciones en residuos de aminoácidos tales como E37, E39, R40, K55, R56, Y60, A64, K74, W78, L79, D80, F82 y F101 de ActRIIB humano (la numeración es relativa a la SEQ ID NO: 1). Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado puede tener una selectividad aumentada para un ligando tal como GDF8/GDF11 con respecto a un dominio de unión a ligando de tipo salvaje de un receptor ActRIIB. Para ilustrar, estas mutaciones se demuestran aquí para aumentar la selectividad del dominio de unión a ligando alterado para GDF11 (y por lo tanto, presumiblemente, GDF8) sobre activina: K74Y, K74F, K74I, L79D, L79E y D80I. Las siguientes mutaciones tienen el efecto inverso, aumentando la proporción de unión a activina sobre GDF11: D54A, K55A, L79A y F82A. La actividad de unión global (GDF11 y activina) puede aumentarse mediante la inclusión de la región de "cola" o, presumiblemente, una región enlazadora no estructurada, y también mediante el uso de una mutación K74A. Otras mutaciones que causaron una disminución general en la afinidad de unión al ligando, incluyen: R40A, E37A, R56A, W78A, D80K, D80R, D80A, D80G, D80F, D80M y D80N. Las mutaciones se

pueden combinar para lograr los efectos deseados. Por ejemplo, muchas de las mutaciones que afectan la proporción de GDF11:unión a activina tienen un efecto negativo general sobre la unión al ligando y, por lo tanto, pueden combinarse con mutaciones que generalmente aumentan la unión al ligando para producir una proteína de unión mejorada con selectividad de ligando. Una trampa de GDF puede ser un polipéptido ActRIIB que comprende una mutación L79D o L79E, opcionalmente en combinación con sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos adicionales.

Opcionalmente, una trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando alterado tiene una relación de Kd para la unión de activina a Kd para la unión de GDF8 que es al menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces mayor en relación con la relación para la naturaleza dominio de unión a ligando de tipo. Opcionalmente, la trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando alterado tiene una relación de IC₅₀ para inhibir activina a IC₅₀ para inhibir GDF8/GDF11 que es al menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces mayor en relación con el ligando ActRIIB de tipo salvaje dominio de unión. Opcionalmente, la trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando alterado inhibe GDF8/GDF11 con una IC₅₀ al menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces menos que la IC₅₀ para inhibir la activina. Estas trampas de GDF pueden ser proteínas de fusión que incluyen un dominio Fc de inmunoglobulina (de tipo salvaje o mutante). En ciertos casos, las trampas de GDF solubles en cuestión son antagonistas (inhibidores) de GDF8 y/o GDF11.

Se contemplan otras trampas de GDF, como las siguientes. Una proteína de fusión de trampa de GDF que comprende una porción derivada de la secuencia de ActRIIB de la SEQ ID NO: 1 o 39 y una segunda porción de polipéptido, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de la SEQ ID NO: 1 o 39 (opcionalmente comenzando en 22-25 de SEQ ID NO: 1 o 39) y terminando en cualquiera de los aminoácidos 109-134 de SEQ ID NO: 1 o 39, y en donde la proteína de fusión de trampa de GDF inhibe la señalización por activina, miostatina y/o GDF11 en un ensayo basado en células. La proteína de fusión de trampa de GDF anterior, en la que la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de SEQ ID NO: 1 o 39 (opcionalmente comienza en 22-25 de SEQ ID NO: 1 o 39) y que termina en cualquiera de los aminoácidos 109-133 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF anterior, en la que la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de la SEQ ID NO: 1 o 39 (opcionalmente comenzando en 22-25 de SEQ ID NO: 1 o 39) y terminando en cualquiera de los aminoácidos 109-133 de SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF anterior, en donde la porción deriva de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-24 de la SEQ ID NO: 1 o 39 y termina en cualquiera de los aminoácidos 109-134 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de SEQ ID NO: 1 o 39 y termina en cualquiera de los aminoácidos 118-133 de SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF anterior, en la que la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-24 de SEQ ID NO: 1 o 39 y termina en cualquiera de los aminoácidos 118-134 de SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF anterior, en la que la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de SEQ ID NO: 1 o 39 y termina en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF anterior, en la que la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-24 de SEQ ID NO: 1 o 39 y termina en cualquier de aminoácidos 128-133 de SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF anterior, en la que la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de SEQ ID NO: 1 o 39 y que termina en cualquiera de los aminoácidos 118-134 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF anterior, en la que la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de la SEQ ID NO: 1 o 39 y termina en cualquiera de los aminoácidos 118-133 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF anterior, en donde la porción derivado de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 21-29 de SEQ ID NO: 1 o 39 y termina en cualquiera de los aminoácidos 128-134 de SEQ ID NO: 1 o 39. La proteína de fusión de trampa de GDF anterior, en donde la porción derivada de ActRIIB corresponde a una secuencia que comienza en cualquiera de los aminoácidos 20-29 de SEQ ID NO: 1 y termina en cualquiera de los aminoácidos 128-133 de SEQ ID NO: 1 o 39. Sorprendentemente, los constructos comienzan en 22-25 de SEQ ID NO: 1 o 39 tienen niveles de actividad mayores que las proteínas que tienen el dominio extracelular completo de ActRIIB humano. La proteína de fusión de trampa de GDF puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en, una secuencia de aminoácidos que comienza en la posición de aminoácido 25 de SEQ ID NO: 1 o 39 y termina en la posición de aminoácido 131 de SEQ ID NO: 1 o 39. El polipéptido de trampa de GDF puede consistir en, o consistir esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, 26, 28, 29, 32, 37 o 38. Cualquiera de las proteínas de fusión de trampa de GDF anteriores se puede producir como un homodímero. Cualquiera de las proteínas de fusión de trampa de GDF anteriores puede tener una porción heteróloga que comprende una región constante de una cadena pesada de IgG, como un dominio Fc. Cualquiera de las proteínas de fusión de trampa de GDF anteriores puede comprender un aminoácido ácido en la posición correspondiente a la posición 79 de la SEQ ID NO: 1, opcionalmente en combinación con una o más sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos adicionales con respecto a la SEQ ID NO: 1.

Se contemplan otras proteínas de trampa de GDF, tales como las siguientes. Una proteína de trampa de GDF que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de

SEQ ID NO: 1 o 39, en donde la posición correspondiente a 64 de SEQ ID NO: 1 es una R o K, y en donde la proteína de trampa de GDF inhibe la señalización por activina, miostatina y/o GDF11 en un ensayo basado en células. La proteína de trampa de GDF anterior, en la que al menos una alteración con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 1 o 39 se coloca fuera del bolsillo de unión al ligando. La proteína de trampa de GDF anterior, en la que al menos una alteración con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 1 o 39 es una alteración conservadora colocada dentro del bolsillo de unión al ligando. La proteína de trampa de GDF anterior, en la que al menos una alteración con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 1 o 39 es una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en K74, R40, Q53, K55, F82 y L79. La proteína de trampa de GDF anterior, en la que la proteína comprende al menos una secuencia N-X-S/T en una posición distinta de una secuencia endógena N-X-S/T de ActRIIB, y en una posición fuera del bolsillo de unión al ligando.

Se contemplan otras trampas de GDF, como las siguientes. Una proteína de trampa de GDF que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1 o 39, y en donde la proteína comprende al menos una secuencia NXS/T en una posición diferente que una secuencia endógena NXS/T de ActRIIB, y en una posición fuera del bolsillo de unión al ligando. La trampa de GDF anterior, en la que la proteína de la trampa de GDF comprende un N en la posición correspondiente a la posición 24 de SEQ ID NO: 1 o 39 y un S o T en la posición correspondiente a la posición 26 de SEQ ID NO: 1 o 39, y en donde la trampa de GDF inhibe la señalización por activina, miostatina y/o GDF11 en un ensayo basado en células. La trampa de GDF anterior, en la que la proteína trampa de GDF comprende una R o K en la posición correspondiente a la posición 64 de la SEQ ID NO: 1 o 39. La trampa de GDF anterior, en la que la proteína ActRIIB comprende una D o E en la posición correspondiente a posición 79 de SEQ ID NO: 1 o 39 y en donde la trampa de GDF inhibe la señalización por activina, miostatina y/o GDF11 en un ensayo basado en células. La trampa de GDF anterior, en la que al menos una alteración con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 1 o 39 es una alteración conservadora colocada dentro del bolsillo de unión al ligando. La trampa de GDF anterior, en la que al menos una alteración con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 1 o 39 es una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en K74, R40, Q53, K55, F82 y L79. La trampa de GDF anterior, en la que la proteína es una proteína de fusión que comprende además una porción heteróloga. Cualquiera de las proteínas de fusión de trampa de GDF anteriores se puede producir como un homodímero. Cualquiera de las proteínas de fusión de trampa de GDF anteriores puede tener una porción heteróloga que comprende una región constante de una cadena pesada de IgG, como un dominio Fc.

La divulgación proporciona ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de trampa de GDF. Un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia codificadora para un polipéptido de trampa de GDF soluble, tal como se describió anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia que codifica una trampa de GDF que comprende un dominio extracelular (por ejemplo, dominio de unión a ligando) de un polipéptido ActRIIB que tiene una o más variaciones de secuencia y una secuencia que codificaría parte o la totalidad de dominio transmembrana y/o el dominio citoplasmático de un polipéptido ActRIIB, pero para un codón de parada colocado dentro del dominio transmembrana o el dominio citoplasmático, o colocado entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana o dominio citoplasmático. Por ejemplo, un polinucleótido aislado que codifica una trampa de GDF puede comprender una secuencia de polinucleótidos de ActRIIB de longitud completa tal como SEQ ID NO: 4 que tiene una o más variaciones, o una versión parcialmente truncada, dicho polinucleótido aislado que además comprende un codón de terminación de la transcripción al menos seiscientos nucleótidos antes del término 3' o de otra manera posicionados de tal manera que la traducción del polinucleótido dé lugar a un dominio extracelular opcionalmente fusionado a una porción truncada de un ActRIIB de longitud completa. Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento pueden estar operativamente unidos a un promotor para la expresión, y la divulgación proporciona células transformadas con tales polinucleótidos recombinantes. Preferiblemente, la célula es una célula de mamífero tal como una célula CHO.

La divulgación proporciona métodos para hacer un polipéptido de trampa de GDF. Tal método puede incluir la expresión de cualquiera de los ácidos nucleicos (por ejemplo, SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o 31) descritos aquí en una célula adecuada, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO). Tal método puede comprender: a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido de trampa de GDF, en donde dicha célula se transforma con una construcción de expresión de trampa de GDF; y b) recuperar el polipéptido de trampa de GDF así expresado. Los polipéptidos de trampa de GDF se pueden recuperar como fracciones crudas, parcialmente purificadas o altamente purificadas usando cualquiera de las técnicas bien conocidas para obtener proteínas de cultivos celulares.

Un polipéptido de trampa de GDF descrito en este documento puede usarse en un método para promover la producción de glóbulos rojos o aumentar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto. La divulgación proporciona métodos para tratar un trastorno asociado con recuentos bajos de glóbulos rojos o niveles bajos de hemoglobina (por ejemplo, una anemia), o para promover la producción de glóbulos rojos, en pacientes que lo necesitan. Un método puede comprender administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva de un polipéptido de trampa de GDF. La divulgación proporciona usos de polipéptidos de trampa de GDF para hacer un medicamento para el tratamiento de un trastorno o afección como se describe en el presente documento.

La divulgación proporciona métodos para administrar un polipéptido de trampa de GDF a un paciente. En parte, la divulgación demuestra que los polipéptidos de trampa de GDF pueden usarse para aumentar los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina. Los polipéptidos de trampa de GDF también se pueden usar para tratar o prevenir otros usos terapéuticos, como promover el crecimiento muscular. En ciertos casos, cuando se administra un polipéptido de trampa de GDF para promover el crecimiento muscular, puede ser conveniente controlar los efectos sobre los glóbulos rojos durante la administración del polipéptido de trampa de GDF, o determinar o ajustar la dosis del polipéptido de trampa de GDF, en orden para reducir los efectos no deseados en los glóbulos rojos. Por ejemplo, los aumentos en los niveles de glóbulos rojos, los niveles de hemoglobina o los niveles de hematocrito pueden causar aumentos en la presión arterial.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una alineación de los dominios extracelulares de ActRIIA humano (SEQ ID NO: 15) y ActRIIB humano (SEQ ID NO: 2) con los residuos que se deducen en este documento, en base al análisis compuesto de múltiples estructuras de cristal ActRIIB y ActRIIA directamente ligando de contacto (el bolsillo de unión de ligando) indicado con cajas.

La Figura 2 muestra una alineación de secuencia múltiple de diversas proteínas de ActRIIB de vertebrados y ActRIIA humana (SEQ ID NOs: 16-23).

La Figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos completa para la trampa de GDF ActRIIB (L79D 20-134)-hFc (SEQ ID NO: 11), incluida la secuencia guía de TPA (doble subrayado), el dominio extracelular ActRIIB (residuos 20-134 en SEQ ID NO: 1; subrayado), y dominio hFc. El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia nativa está doblemente subrayado y resaltado, al igual que la glicina revelada por secuenciación como el residuo N-terminal en la proteína de fusión madura.

La Figura 4 muestra una secuencia de nucleótidos que codifica ActRIIB (L79D 20-134)-hFc. SEQ ID NO: 25 corresponde a la cadena de sentido, y SEQ ID NO: 33 corresponde a la cadena antisentido. El líder TPA (nucleótidos 1-66) está doblemente subrayado, y el dominio extracelular de ActRIIB (nucleótidos 76-420) está subrayado.

La Figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos completa para la trampa de GDF truncada ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (SEQ ID NO: 26), que incluye el líder TPA (doble subrayado), dominio extracelular de ActRIIB truncado (residuos 25-131 en SEQ ID NO: 1; subrayado), y dominio hFc. El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia nativa está doblemente subrayado y resaltado, al igual que el glutamato revelado por secuenciación como el residuo N-terminal en la proteína de fusión madura.

La Figura 6 muestra una secuencia de nucleótidos que codifica ActRIIB (L79D 25-131)-hFc. SEQ ID NO: 27 corresponde a la cadena de sentido, y SEQ ID NO: 34 corresponde a la cadena antisentido. El líder TPA (nucleótidos 1-66) está doblemente subrayado, y el dominio extracelular de ActRIIB truncado (nucleótidos 76-396) está subrayado. También se muestra la secuencia de aminoácidos para el dominio extracelular de ActRIIB (residuos 25-131 en SEQ ID NO: 1).

La Figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos para la trampa de GDF ActRIIB truncado (L79D 25-131)-hFc sin un líder (SEQ ID NO: 28). El dominio extracelular ActRIIB truncado (residuos 25-131 en SEQ ID NO: 1) está subrayado. El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia nativa está doblemente subrayado y resaltado, al igual que el glutamato revelado por secuenciación como el residuo N-terminal en la proteína de fusión madura.

La Figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos para la trampa de GDF ActRIIB truncada (L79D 25-131) sin el líder, el dominio hFc y el enlazador (SEQ ID NO: 29). El aspartato sustituido en la posición 79 en la secuencia nativa está subrayado y resaltado, al igual que el glutamato revelado por secuenciación como el residuo N-terminal en la proteína de fusión madura.

La Figura 9 muestra una secuencia de nucleótidos alternativa que codifica ActRIIB (L79D 25-131)-hFc. SEQ ID NO: 30 corresponde a la cadena de sentido, y SEQ ID NO: 35 corresponde a la cadena antisentido. El líder de TPA (nucleótidos 1-66) está doblemente subrayado, el dominio extracelular ActRIIB truncado (nucleótidos 76-396) está subrayado y las sustituciones en la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje del dominio extracelular están doblemente subrayadas y resaltadas (compárese con la SEQ ID NO: 27, Figura 6). También se muestra la secuencia de aminoácidos para el dominio extracelular de ActRIIB (residuos 25-131 en SEQ ID NO: 1).

La Figura 10 muestra los nucleótidos 76-396 (SEQ ID NO: 31) de la secuencia de nucleótidos alternativa mostrada en la Figura 9 (SEQ ID NO: 30). Las mismas sustituciones de nucleótidos indicadas en la Figura 9 también están subrayadas y resaltadas aquí. La SEQ ID NO: 31 codifica solo el dominio extracelular ActRIIB truncado (correspondiente a los residuos 25-131 en la SEQ ID NO: 1) con una sustitución L79D, por ejemplo, ActRIIB (L79D 25-131).

La Figura 11 muestra el efecto de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc sobre la concentración de hemoglobina en un modelo de ratón de anemia inducida por quimioterapia. Los datos son medias \pm SEM. **, P <0.01 vs. paclitaxel en el mismo punto de tiempo. Esta trampa de GDF compensa la anemia inducida por el tratamiento con paclitaxel.

5 La Figura 12 muestra el efecto de ActRIIB (L79D 25-13 1)-hFc en los niveles de glóbulos rojos (RBC) en un modelo de ratón con nefrectomía unilateral (NEPHX) de enfermedad renal crónica. Los datos son medias \pm SEM. ***, P <0.001 vs. línea de base. Esta trampa de GDF revirtió la anemia inducida por nefrectomía observada en ratones control.

10 La Figura 13 muestra el efecto de ActRIIB (L79D 25-13 1)-hFc sobre los niveles de glóbulos rojos (RBC), hemoglobina (HGB) y hematocrito (HCT) en un modelo de ratón de nefrectomía unilateral (NEPHX) de enfermedad renal crónica. Los datos son cambios medios desde la línea base durante 4 semanas (\pm SEM). *, P <0.05; **, P <0.01; ***, P <0.001 vs. controles NEPHX. Esta trampa de GDF evitó la disminución asociada a la nefrectomía en estos parámetros eritrocíticos, aumentando cada uno en una magnitud similar a la de los ratones con riñón intacto (simulado).

15 La Figura 14 muestra el efecto de ActRIIB (L79D 25-13 1)-hFc sobre los niveles de glóbulos rojos (RBC) en un modelo de rata de anemia inducida por pérdida aguda de sangre. La extracción de sangre se produjo el día -1, con la dosificación en los días 0 y 3. Los datos son medias \pm SEM. **, P <0.01; ***, P <0.001 vs. vehículo en el mismo punto de tiempo. Esta trampa de GDF mejoró la tasa y el grado de recuperación de la anemia inducida por pérdida de sangre.

20 La Figura 15 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB (L79D 20-134)-hFc (gris) o ActRIIB (L79D 25-13 1)-hFc (negro) sobre el cambio absoluto en la concentración de glóbulos rojos desde la línea base en el mono cynomolgus. VEH = vehículo. Los datos son medias \pm SEM. n = 4-8 por grupo.

25 La Figura 16 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB (L79D 20-134)-hFc (gris) o ActRIIB (L79D 25-13 1)-hFc (negro) sobre el cambio absoluto en el hematocrito desde la línea base en el mono cynomolgus. VEH = vehículo. Los datos son medias \pm SEM. n = 4-8 por grupo.

30 La Figura 17 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB (L79D 20-134)-hFc (gris) o ActRIIB (L79D 25-13 1)-hFc (negro) sobre el cambio absoluto en la concentración de hemoglobina desde la línea base en el mono cynomolgus. VEH = vehículo. Los datos son medias \pm SEM. n = 4-8 por grupo.

35 La Figura 18 muestra el efecto del tratamiento con ActRIIB (L79D 20-134)-hFc (gris) o ActRIIB (L79D 25-13 1)-hFc (negro) sobre el cambio absoluto en la concentración de reticulocitos circulantes desde la línea base en el mono cynomolgus. VEH = vehículo. Los datos son medias \pm SEM. n = 4-8 por grupo.

40 Descripción detallada de la invención

1. Información general

45 La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) contiene una variedad de factores de crecimiento que comparten elementos de secuencia comunes y motivos estructurales. Se sabe que estas proteínas ejercen efectos biológicos en una gran variedad de tipos celulares tanto en vertebrados como en invertebrados. Los miembros de la superfamilia realizan funciones importantes durante el desarrollo embrionario en la formación de patrones y la especificación de tejidos y pueden influir en una variedad de procesos de diferenciación, que incluyen adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, cardiogénesis, hematopoyesis, neurogénesis y diferenciación de células epiteliales. La familia se divide en dos ramas generales: las ramas BMP/GDF y TGF-beta/Activin/BMP10, cuyos miembros tienen efectos diversos, con frecuencia complementarios. Al manipular la actividad de un miembro de la familia TGF-beta, con frecuencia es posible causar cambios fisiológicos significativos en un organismo. Por ejemplo, las razas de ganado piamontés y azul belga portan una mutación de pérdida de función en el gen GDF8 (también llamado miostatina) que causa un marcado aumento en la masa muscular. Grobet et al., Nat Genet. 1997, 17(1): 71-4. Además, en humanos, los alelos inactivos de GDF8 están asociados con un aumento de la masa muscular y, según se informa, una fuerza excepcional. Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350: 2682-8.

50 Las señales de TGF- β están mediadas por complejos heteroméricos de receptores de serina/treonina quinasa tipo I y tipo II, que fosforilan y activan las proteínas Smad posteriores a la estimulación del ligando (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1: 169-178). Estos receptores tipo I y tipo II son proteínas transmembrana, compuestas por un dominio extracelular de unión a ligando con región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con especificidad de serina/treonina predicha. Los receptores tipo I son esenciales para la señalización. Se requieren receptores de tipo II para unir ligandos y para la expresión de receptores de tipo I. Los receptores de activina tipo I y II forman un complejo estable después de la unión del ligando, lo que resulta en la fosforilación de los receptores tipo I por los receptores tipo II.

65

Se han identificado dos receptores Tipo II relacionados (ActRII), ActRIIA y ActRIIB, como los receptores Tipo II para activinas (Mathews and Vale, 1991, Cell 65: 973-982; Attisano et al., 1992, Cell 68: 97-108). Además de las activinas, ActRIIA y ActRIIB pueden interactuar bioquímicamente con varias otras proteínas de la familia TGF- β , incluidas BMP7, Nodal, GDF8 y GDF11 (Yamashita et al., 1995, J. Cell Biol. 130: 217-226; Lee and McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 9306-9311; Yeo and Whitman, 2001, Mol. Cell 7: 949-957; Oh et al., 2002, Genes Dev. 16: 2749-54). ALK4 es el receptor primario de tipo I para las activinas, particularmente para la activina A, y ALK-7 también puede servir como un receptor para las activinas, particularmente para la activina B. La presente divulgación se refiere en parte a antagonizar un ligando de receptores ActRIIB (también referido como un ligando ActRIIB) con un sujeto polipéptido de trampa de GDF. Los ligandos de ejemplo de los receptores ActRIIB incluyen algunos miembros de la familia TGF- β , como activina, Nodal, GDF8, GDF11 y BMP7.

Las activinas son factores de crecimiento de polipéptidos diméricos que pertenecen a la superfamilia TGF-beta. Hay tres formas principales de activina (A, B y AB) que son homo/heterodímeros de dos subunidades β estrechamente relacionadas ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$ y $\beta_A\beta_B$, respectivamente). El genoma humano también codifica 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 TGF-beta, las activinas son factores únicos y multifuncionales que pueden estimular la producción de hormonas en las células ováricas y placentarias, apoyar la supervivencia de las células neuronales, influir en el progreso del ciclo celular de manera positiva o negativa dependiendo del tipo de célula e inducir la diferenciación mesodérmica al menos en embriones de anfibios. (DePaolo et al., 1991, Proc Soc Ep Biol Med. 198: 500-512; Dyson et al., 1997, Curr Biol. 7: 81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55: 953-963). Además, se encontró que el factor de diferenciación eritroide (FED) aislado de las células leucémicas monocíticas humanas estimuladas era idéntico a la activina A (Murata et al., 1988, PNAS, 85: 2434). Se ha sugerido que la activina A promueve la eritropoyesis en la médula ósea. En varios tejidos, la señalización de activina es antagonizada por su heterodímero relacionado, la inhibina. Por ejemplo, durante la liberación de la hormona foliculoestimulante (FSH) de la pituitaria, la activina promueve la secreción y síntesis de FSH, mientras que la inhibina previene la secreción y síntesis de FSH. Otras proteínas que pueden regular la bioactividad de la activina y/o unirse a la activina incluyen la folistatina (FS), la proteína relacionada con la folistatina (FSRP) y la macroglobulina α_2 .

Las proteínas nodales tienen funciones en la inducción y formación de mesodermo y endodermo, así como la posterior organización de estructuras axiales tales como corazón y estómago en la embriogénesis temprana. Se ha demostrado que el tejido dorsal en un embrión de vertebrado en desarrollo contribuye predominantemente a las estructuras axiales del notocordio y la placa precordial mientras recluta las células circundantes para formar estructuras embrionarias no axiales. Nodal parece señalar a través de receptores tipo I y tipo II y efectores intracelulares conocidos como proteínas Smad. Estudios recientes apoyan la idea de que ActRIIA y ActRIIB sirven como receptores de tipo II para Nodal (Sakuma et al., Genes Cells. 2002, 7: 401-12). Se sugiere que los ligandos nodales interactúen con sus cofactores (por ejemplo, cripto) para activar los receptores de activina tipo I y tipo II, que fosforilan Smad2. Las proteínas nodales están implicadas en muchos eventos críticos para el embrión temprano de vertebrados, incluida la formación de mesodermo, el patrón anterior y la especificación del eje izquierdo-derecho. La evidencia experimental ha demostrado que la señalización nodal activa pAR3-Lux, un reportero de luciferasa que previamente se demostró que responde específicamente a activina y TGF-beta. Sin embargo, Nodal no puede inducir pTlx2-Lux, un reportero que responde específicamente a las proteínas morfogenéticas óseas. Los resultados recientes proporcionan evidencia bioquímica directa de que la señalización nodal está mediada por las vías Smads, Smad2 y Smad3 de activina-TGF-beta. La evidencia adicional ha demostrado que la criptoproteína extracelular es necesaria para la señalización nodal, lo que la diferencia de la señalización de activina o TGF-beta.

El factor de crecimiento y diferenciación-8 (GDF8) también se conoce como miostatina. GDF8 es un regulador negativo de la masa muscular esquelética. GDF8 se expresa altamente en el músculo esquelético en desarrollo y adulto. La mutación nula GDF8 en ratones transgénicos se caracteriza por una marcada hipertrofia e hiperplasia del músculo esquelético (McPherron et al., Nature, 1997, 387: 83-90). Aumentos similares en la masa del músculo esquelético son evidentes en las mutaciones naturales de GDF8 en reses (Ashmore et al., 1974, Growth, 38: 501-507; Swatland and Kieffer, J. Anim. Sci., 1994, 38: 752-757; McPherron and Lee, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94: 12457-12461; y Kambadur et al., Genome Res., 1997, 7: 910-915) y, sorprendentemente, en humanos (Schuelke et al., N Engl J Med 2004; 350: 2682-8). Los estudios también han demostrado que el desgaste muscular asociado con la infección por VIH en humanos está acompañado por un aumento en la expresión de la proteína GDF8 (Gonzalez-Cadavid et al., PNAS, 1998, 95: 14938-43). Además, GDF8 puede modular la producción de enzimas específicas del músculo (por ejemplo, creatina quinasa) y modular la proliferación de células de mioblastos (documento WO 00/43781). El propéptido GDF8 puede unirse de forma no covalente al dímero del dominio GDF8 maduro, inactivando su actividad biológica (Miyazono et al. (1988) J. Biol. Chem., 263: 6407-6415; Wakefield et al. (1988) J. Biol. Chem., 263: 7646-7654; y Brown et al. (1990) Growth Factors, 3: 35-43). Otras proteínas que se unen a GDF8 o proteínas relacionadas estructuralmente e inhiben su actividad biológica incluyen folistatina y, potencialmente, proteínas relacionadas con folistatina (Gamer et al. (1999) Dev. Biol., 208: 222-232).

El factor de crecimiento y diferenciación-11 (GDF11), también conocido como BMP11, es una proteína secretada (McPherron et al., 1999, Nat. Genet. 22: 260-264). GDF11 se expresa en la yema de la cola, la yema de la extremidad, los arcos maxilar y mandibular y los ganglios de la raíz dorsal durante el desarrollo del ratón (Nakashima

et al., 1999, Mech. Dev. 80: 185-189). GDF11 desempeña un papel único en el diseño de tejidos tanto mesodérmicos como neuronales (Gamer et al., 1999, Dev Biol., 208: 222-32). Se demostró que GDF11 es un regulador negativo de la condrogénesis y la miogénesis en el desarrollo del miembro de pollo (Gamer et al., 2001, Dev Biol. 229: 407-20). La expresión de GDF11 en el músculo también sugiere su papel en la regulación del crecimiento muscular de manera similar a GDF8. Además, la expresión de GDF11 en el cerebro sugiere que GDF11 también puede poseer actividades relacionadas con la función del sistema nervioso. Curiosamente, se descubrió que GDF11 inhibe la neurogénesis en el epitelio olfativo (Wu et al., 2003, Neuron. 37: 197-207). Por lo tanto, GDF11 puede tener aplicaciones in vitro e in vivo en el tratamiento de enfermedades tales como enfermedades musculares y enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica).

La proteína morfogenética ósea (BMP7), también llamada proteína osteogénica 1 (OP-1), es bien conocida por inducir la formación de cartílago y hueso. Además, BMP7 regula una amplia gama de procesos fisiológicos. Por ejemplo, BMP7 puede ser el factor osteoinductivo responsable del fenómeno de la osteogénesis epitelial. También se encuentra que BMP7 juega un papel en la regulación del calcio y la homeostasis ósea. Al igual que la activina, BMP7 se une a los receptores de Tipo II, ActRIIA y ActRIIB. Sin embargo, BMP7 y activina reclutan distintos receptores de Tipo I en complejos de receptores heteroméricos. El principal receptor BMP7 Tipo I observado fue ALK2, mientras que la activina se unió exclusivamente a ALK4 (ActRIIB). BMP7 y activina provocaron distintas respuestas biológicas y activaron diferentes vías Smad (Macias-Silva et al., 1998, J Biol Chem. 273: 25628-36).

Como se demuestra aquí, un polipéptido de trampa de GDF, que es un polipéptido ActRIIB variante (ActRIIB), es más eficaz para aumentar los niveles de glóbulos rojos in vivo en comparación con un polipéptido ActRIIB soluble de tipo salvaje y tiene efectos beneficiosos en una variedad de modelos para anemias. Cabe señalar que la hematopoyesis es un proceso complejo, regulado por una variedad de factores, que incluyen eritropoyetina, G-CSF y homeostasis del hierro. Los términos "aumentar los niveles de glóbulos rojos" y "promover la formación de glóbulos rojos" se refieren a métricas clínicamente observables, tales como hematocrito, recuentos de glóbulos rojos y mediciones de hemoglobina, y están destinadas a ser neutrales en cuanto al mecanismo por el cual se producen dichos cambios.

Además de estimular los niveles de glóbulos rojos, los polipéptidos de trampa de GDF son útiles para una variedad de aplicaciones terapéuticas, que incluyen, por ejemplo, promover el crecimiento muscular (véanse las publicaciones PCT Nos. WO 2006/012627 y WO 2008/097541). En ciertos casos, cuando se administra un polipéptido de trampa de GDF con el fin de aumentar el músculo, puede ser conveniente reducir o minimizar los efectos sobre los glóbulos rojos. Al monitorizar varios parámetros hematológicos en pacientes tratados o que son candidatos para el tratamiento con un polipéptido de trampa de GDF, se puede determinar la dosis adecuada (incluidas las cantidades y la frecuencia de administración) en función de las necesidades de un paciente individual, los parámetros hematológicos iniciales y el propósito para tratamiento. Además, el progreso terapéutico y los efectos sobre uno o más parámetros hematológicos a lo largo del tiempo pueden ser útiles para controlar a los pacientes que reciben una dosis de un polipéptido de trampa de GDF, facilitando la atención al paciente, determinando la dosis de mantenimiento adecuada (cantidades y frecuencia), etc.

Los términos usados en esta especificación generalmente tienen sus significados normales en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico donde se usa cada término. Ciertos términos se discuten a continuación o en otra parte de la especificación, para proporcionar una guía adicional al profesional en la descripción de las composiciones y métodos de la invención y cómo hacerlos y usarlos. El alcance o significado de cualquier uso de un término será evidente a partir del contexto específico en donde se usa el término.

"Alrededor de" y "aproximadamente" generalmente significarán un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las mediciones. Típicamente, los grados de error de ejemplo están dentro del 20 por ciento (%), preferiblemente dentro del 10%, y más preferiblemente dentro del 5% de un valor o rango de valores dado.

Como alternativa, y particularmente en sistemas biológicos, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" pueden significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 5 veces y más preferiblemente dentro de 2 veces de un valor dado. Las cantidades numéricas dadas en este documento son aproximadas, a menos que se indique lo contrario, lo que significa que el término "alrededor de" o "aproximadamente" puede inferirse cuando no se indica expresamente.

Los métodos de la invención pueden incluir etapas de comparación de secuencias entre sí, incluida la secuencia de tipo salvaje con uno o más mutantes (variantes de secuencia). Dichas comparaciones comprenden típicamente alineaciones de secuencias de polímeros, por ejemplo, usando programas de alineación de secuencias y/o algoritmos que son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, BLAST, FASTA y MEGALIGN, por nombrar algunos). El experto en la materia puede apreciar fácilmente que, en tales alineamientos, donde una mutación contiene una inserción o eliminación de residuos, la alineación de secuencia introducirá un "espacio" (típicamente representado por un guion o "A") en la secuencia de polímero que no contiene el residuo insertado o eliminado.

"Homólogo", en todas sus formas gramaticales y variaciones ortográficas, se refiere a la relación entre dos proteínas que poseen un "origen evolutivo común", incluidas proteínas de superfamilias de la misma especie de organismo, así como proteínas homólogas de diferentes especies de organismo. Dichas proteínas (y sus ácidos nucleicos codificadores) tienen homología de secuencia, como se refleja por su similitud de secuencia, ya sea en términos de porcentaje de identidad o por la presencia de residuos o motivos específicos y posiciones conservadas.

El término "similitud de secuencia", en todas sus formas gramaticales, se refiere al grado de identidad o correspondencia entre las secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos que pueden o no compartir un origen evolutivo común.

Sin embargo, en el uso común y en la aplicación instantánea, el término "homólogo", cuando se modifica con un adverbio como "altamente", puede referirse a la similitud de secuencia y puede o no estar relacionado con un origen evolutivo común.

2. Polipéptidos de trampa de GDF

La presente divulgación se refiere en parte a polipéptidos de trampa de GDF, por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB variante soluble, que incluyen, por ejemplo, fragmentos, variantes funcionales y formas modificadas de polipéptidos de ActRIIB. Los polipéptidos de trampa de GDF pueden tener al menos una actividad biológica similar o igual que un polipéptido ActRIIB de tipo salvaje correspondiente. Por ejemplo, un polipéptido de trampa de GDF de la invención puede unirse e inhibir la función de un ligando ActRIIB (por ejemplo, activina A, activina AB, activina B, Nodal, GDF8, GDF11 o BMP7). Opcionalmente, un polipéptido de trampa de GDF aumenta los niveles de glóbulos rojos. Ejemplos de polipéptidos de trampa de GDF incluyen polipéptidos precursores de ActRIIB humanos (SEQ ID NO: 1 o 39) que tienen una o más variaciones de secuencia, y polipéptidos solubles de ActRIIB humanos (por ejemplo, SEQ ID NOs: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 y 41) que tienen una o más variaciones de secuencia. Una trampa de GDF se refiere a un polipéptido ActRIIB que tiene una afinidad disminuida por la activina en relación con otros ligandos de ActRIIB, que incluyen, por ejemplo, GDF11 y/o miostatina.

Como se usa en este documento, el término "ActRIIB" se refiere a una familia de proteínas del receptor de activina tipo IIb (ActRIIB) de cualquier especie y variantes derivadas de dichas proteínas ActRIIB por mutagénesis u otra modificación. La referencia a ActRIIB en el presente documento se entiende como una referencia a cualquiera de las formas identificadas actualmente. Los miembros de la familia ActRIIB son generalmente proteínas transmembrana, compuestas de un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad de serina/treonina quinasa predicha. Las secuencias de aminoácidos del dominio extracelular soluble en ActRIIA humano (proporcionado para comparación) y el dominio extracelular soluble en ActRIIB se ilustran en la Figura 1.

El término "polipéptido ActRIIB" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido natural de un miembro de la familia ActRIIB, así como cualquier variante del mismo (incluidos mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que retienen una actividad útil. Véase, por ejemplo, el documento WO 2006/012627. Por ejemplo, los polipéptidos ActRIIB incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier ActRIIB conocido que tenga una secuencia al menos aproximadamente 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido ActRIIB, y opcionalmente al menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o mayor identidad. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIB puede unirse a e inhibir la función de una proteína y/o activina ActRIIB. Un polipéptido ActRIIB que es una trampa de GDF puede seleccionarse por su actividad para promover la formación de glóbulos rojos in vivo. Ejemplos de polipéptidos ActRIIB incluyen el polipéptido precursor ActRIIB humano (SEQ ID NO: 1 y 39) y polipéptidos ActRIIB humanos solubles (por ejemplo, SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 y 41). La numeración de los aminoácidos para todos los polipéptidos relacionados con ActRIIB descritos en este documento se basa en la numeración de la SEQ ID NO: 1, a menos que se indique específicamente lo contrario.

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

MTAPWVALALLWGSLWPGS**GRGEAETRECIYYNANWELERTN**N**QSGLERC**
EGEQDKRLHCYASWRNN**SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ**
VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIG
 GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPPSPLVGLKPLQLEIK
 ARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLL
 QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGKNIITWNELCHVAETM
 SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLA
 VRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLV
 LWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVHKKMRPTIK
 DHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS
 DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEQ ID NO: 1)

El péptido señal está subrayado individualmente; el dominio extracelular está en negrita y los sitios potenciales de glicosilación unidos a N están en recuadros.

5

Una forma con una alanina en la posición 64 también se informa en la literatura, como sigue:

MTAPWVALALLWGSLWPGS**GRGEAETRECIYYNANWELERTN**N**QSGLERC**
EGEQDKRLHCYASWANN**SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ**
VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIG
 GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPPSPLVGLKPLQLEIK
 ARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLL
 QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGKNIITWNELCHVAETM
 SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLA
 VRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLV
 LWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVHKKMRPTIK
 DHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS
 DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEQ ID NO: 39)

10 La secuencia de polipéptidos procesados solubles en ActRIIB humano (extracelular) es la siguiente:

GRGEAETRECIYYNANWELERTN**QSGLERCEGEQDKRLHCYASWRN****SSG**
TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ**VYFCCCEGNFCNERFTHLP**
EAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 2)

La forma alternativa con un A64 es la siguiente:

15

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANS
SSG
TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
EAGGPEVTYEPPPTAPT (SEQ ID NO: 40)

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

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG
TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
EA (SEQ ID NO: 3)

10 La forma alternativa con un A64 es la siguiente:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANS
SSG
TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
EA (SEQ ID NO: 41)

15 En algunas condiciones, la proteína puede producirse con una secuencia "SGR ..." en el extremo N-terminal. La secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína precursora de ActRIIB humana es la siguiente: (nucleótidos 5-1543 de la entrada de Genbank NM_001106) (la secuencia que se muestra proporciona una alanina en la posición 64, y puede modificarse para proporcionar una arginina)

ES 2 808 139 T3

ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGGC
CCGGCTCTGGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAA
CGCCAACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGC
GAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACA
GCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTT
CAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAG
GTGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTC
ATTTGCCAGAGGCTGGGGGGCCCGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGAC
AGCCCCACCCCTGCTCACGGTGTGGCCTACTCACTGCTGCCCATCGGG
GGCCTTTCCTCATCGTCCTGCTGGCCTTTTGGATGTACCGGCATCGCA
AGCCCCCTACGGTCATGTGGACATCCATGAGGACCCTGGGCCTCCACC
ACCATCCCCTCTGGTGGGCCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAAG
GCTCGGGGGCGCTTTGGCTGTGTCTGGAAGGCCAGCTCATGAATGACT
TTGTAGCTGTCAAGATCTTCCCCTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAG
TGAACGGGAGATCTTCAGCACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCTGCTA
CAGTTCATTGCTGCCGAGAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAGCTGT
GGTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCCTCACGGATTACCTCAA
GGGGAACATCATCACATGGAACGAACTGTGTGCATGTAGCAGAGACGATG
TCACGAGGCCTTCATACCTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGGCGTGGCG
AGGGCCACAAGCCGTCTATTGCCACAGGGACTTTAAAAGTAAGAATGT
ATTGCTGAAGAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCTGACTTTGGCTTGGCT
GTTTCGATTTGAGCCAGGGAAACCTCCAGGGGACACCCACGGACAGGTAG
GCACGAGACGGTACATGGCTCCTGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTT
CCAGAGAGATGCCCTTCCCTGCGCATTGACATGTATGCCATGGGGTTGGTG
CTGTGGGAGCTTGTGTCTCGCTGCAAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATG
AGTACATGCTGCCCTTTGAGGAAGAGATTGGCCAGCACCCCTTCGTTGGA
GGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTGCACAAGAAGATGAGGCCACCATTAAA
GATCACTGGTTGAAACACCCGGGCCTGGCCCAGCTTTGTGTGACCATCG
AGGAGTGTGGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTGTCCGCGGGCTGTGT
GGAGGAGCGGGTGTCCCTGATTCCGAGGTCCGTCAACGGCACTACCTCG
GACTGTCTCGTTTCCCTGGTGACCTCTGTACCAATGTGGACCTGCCCC
CTAAAGAGTCAAGCATCTAA (SEQ ID NO: 4)

La secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido soluble (extracelular) ActRIIA humano es la siguiente (la secuencia que se muestra proporciona una alanina en la posición 64, y puede modificarse para proporcionar una arginina):

```

GGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCAACT
GGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCCAAGGCGA
GCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACAGCTCTGGC
ACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACTGCT
5  ACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTACTT
CTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTTGCCA
GAGGCTGGGGGCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGACAGCCCCCA
CC (SEQ ID NO: 5)

```

En el presente documento se divulgan polipéptidos de trampa de GDF que son formas variantes de polipéptidos ActRIIB solubles. Como se describe en este documento, el término "polipéptido ActRIIB soluble" generalmente se refiere a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ActRIIB. El término "polipéptido ActRIIB soluble", como se usa en el presente documento, incluye cualquier dominio extracelular natural de una proteína ActRIIB, así como cualquier variante de la misma (incluidos mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas) que retienen una actividad útil. Por ejemplo, el dominio extracelular de una proteína ActRIIB se une a un ligando y generalmente es soluble. Ejemplos de polipéptidos solubles de ActRIIB incluyen polipéptidos solubles de ActRIIB (por ejemplo, SEQ ID NOS: 22, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 y 41). Otros ejemplos de polipéptidos ActRIIB solubles comprenden una secuencia señal además del dominio extracelular de una proteína ActRIIB, véase Ejemplo 1. La secuencia señal puede ser una secuencia señal nativa de un ActRIIB, o una secuencia señal de otra proteína, como una secuencia de señalización del activador de plasminógeno de tejido (TPA) o una secuencia de señalización de melitina de abeja melífera (HBM).

La divulgación identifica porciones funcionalmente activas y variantes de ActRIIB. Los solicitantes han comprobado que una proteína de fusión Fc que tiene la secuencia descrita por Hilden et al. (Blood. 1994 Apr 15; 83 (8): 2163-70), que tiene una alanina en la posición correspondiente al aminoácido 64 de la SEQ ID NO: 1 (A64), tiene una afinidad relativamente baja por activina y GDF-11. Por el contrario, la misma proteína de fusión Fc con una arginina en la posición 64 (R64) tiene una afinidad por la activina y el GDF-11 en el rango de bajo nanomolar a alto picomolar. Por lo tanto, se usa una secuencia con un R64 como secuencia de referencia de tipo salvaje para ActRIIB humano en esta divulgación.

Attisano et al. (Cell. 10 de enero de 1992; 68(1): 97-108) mostró que una eliminación del nudo de prolina en el extremo C del dominio extracelular de ActRIIB redujo la afinidad del receptor por la activina. Una proteína de fusión ActRIIB-Fc que contiene los aminoácidos 20-119 de la SEQ ID NO: 1, "ActRIIB (20-119)-Fc", ha reducido la unión a GDF-11 y activina en relación con un ActRIIB (20-134)-Fc, que incluye la región del nudo prolina y el dominio completo de la yuxtamembrana. Sin embargo, una proteína ActRIIB (20-129)-Fc retiene una actividad similar pero algo reducida en relación con el tipo salvaje, a pesar de que la región del nudo prolina está interrumpida. Por lo tanto, se espera que los dominios extracelulares de ActRIIB que se detienen en el aminoácido 134, 133, 132, 131, 130 y 129 estén activos, pero los constructos que se detienen en 134 o 133 pueden ser más activas. De manera similar, no se espera que las mutaciones en ninguno de los residuos 129-134 alteren la afinidad de unión al ligando por márgenes grandes. En apoyo de esto, las mutaciones de P129 y P130 no disminuyen sustancialmente la unión del ligando. Por lo tanto, un polipéptido de trampa de GDF que es una proteína de fusión ActRIIB-Fc puede terminar tan pronto como el aminoácido 109 (la cisteína final), sin embargo, se espera que las formas que terminan en o entre 109 y 119 tengan una unión de ligando reducida. El aminoácido 119 está pobremente conservado y, por lo tanto, se altera o trunca fácilmente. Las formas que terminan en 128 o posterior retienen la actividad de unión al ligando. Las formas que terminan en o entre 119 y 127 tendrán una capacidad de unión intermedia. Cualquiera de estas formas puede ser deseable de usar, dependiendo del entorno clínico o experimental.

En el extremo N-terminal de ActRIIB, se espera que una proteína que comienza en el aminoácido 29 o antes retenga la actividad de unión al ligando. El aminoácido 29 representa la cisteína inicial. Una mutación de alanina a asparagina en la posición 24 introduce una secuencia de glicosilación ligada a N sin afectar sustancialmente la unión del ligando. Esto confirma que las mutaciones en la región entre el péptido de escisión de señal y la región reticulada de cisteína, correspondiente a los aminoácidos 20-29, se toleran bien. En particular, los constructos que comienzan en las posiciones 20, 21, 22, 23 y 24 retendrán actividad, y también se espera que los constructos que comiencen en

las posiciones 25, 26, 27, 28 y 29 retengan actividad. Los datos mostrados en los Ejemplos demuestran que, sorprendentemente, una construcción que comienza en 22, 23, 24 o 25 tendrá la mayor actividad.

En conjunto, una porción activa de ActRIIB comprende los aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1, y los constructos de trampa de GDF pueden, por ejemplo, comprender una porción de ActRIIB que comienza en un residuo correspondiente a los aminoácidos 20-29 de SEQ ID NO: 1 o 39 y termina en una posición correspondiente a los aminoácidos 109-134 de SEQ ID NO: 1 o 39. Otros ejemplos incluyen constructos que comienzan en una posición de 20-29 o 21-29 y terminan en una posición de 119-134, 119-133, 129-134 o 129-133 de la SEQ ID NO: 1 o 39. Otros ejemplos incluyen constructos que comienzan en una posición de 20-24 (o 21-24, o 22-25) y termina en una posición de 109-134 (o 109-133), 119-134 (o 119-133) o 129-134 (o 129-133) de SEQ ID NO: 1 o 39. Las variantes dentro de estos rangos también son contemplado, particularmente aquellos que tienen al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de identidad con la porción correspondiente de SEQ ID NO: 1 o 39. El polipéptido de trampa de GDF puede comprender, consistir esencialmente o consistir en, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticos a los residuos de aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO: 1 o 39. En la trampa de GDF el polipéptido puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en, un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos que sea al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntico a las SEQ ID NO: 7, 26, 28, 29, 32, 37 o 38. En las realizaciones preferidas de la invención, el polipéptido de trampa de GDF consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28. Otros polipéptidos de trampa de GDF consisten en, o consisten esencialmente en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, 26, 29, 32, 37 o 38.

La divulgación incluye los resultados de un análisis de estructuras de ActRIIB compuestas, mostradas en la Figura 1, que demuestran que el bolsillo de unión al ligando está definido por los residuos Y, N33, N35, L38 a T41, E47, E50, Q53 a K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 a N83, Y85, R87, A92 y E94 a F101. En estas posiciones, se espera que se toleren mutaciones conservadoras, aunque una mutación K74A se tolera bien, al igual que R40A, K55A, F82A y mutaciones en la posición L79. R40 es una K en Xenopus, lo que indica que los aminoácidos básicos en esta posición serán tolerados. Q53 es R en ActRIIB bovino y K en Xenopus ActRIIB, y por lo tanto, los aminoácidos que incluyen R, K, Q, N y H serán tolerados en esta posición. Por lo tanto, una fórmula general para una proteína de trampa de GDF es aquella que comprende los aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1 o 39, pero opcionalmente comienza en una posición que varía de 20-24 o 22-25 y termina en una posición que varía de 129-134, y que comprende no más de 1, 2, 5, 10 o 15 cambios conservadores de aminoácidos en la bolsa de unión del ligando, y cero, una o más alteraciones no conservadoras en las posiciones 40, 53, 55, 74, 79 y/u 82 en el bolsillo de unión de ligando. Dicha proteína puede retener más del 80%, 90%, 95% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos 29-109 de la SEQ ID NO: 1 o 39. Sitios fuera del bolsillo de unión, en los que la variabilidad puede ser particularmente bien tolerada, incluyen los términos amino y carboxi del dominio extracelular (como se indicó anteriormente), y las posiciones 42-46 y 65-73. Una alteración de asparagina a alanina en la posición 65 (N65A) en realidad mejora la unión del ligando en el fondo A64, y por lo tanto se espera que no tenga un efecto perjudicial sobre la unión del ligando en el fondo R64. Este cambio probablemente elimina la glucosilación en N65 en el fondo A64, lo que demuestra que es probable que se tolere un cambio significativo en esta región. Mientras que un cambio de R64A se tolera mal, R64K se tolera bien y, por lo tanto, se puede tolerar otro residuo básico, como H, en la posición 64.

ActRIIB está bien conservado en casi todos los vertebrados, con grandes extensiones del dominio extracelular conservadas por completo. Muchos de los ligandos que se unen a ActRIIB también están altamente conservados. En consecuencia, las comparaciones de secuencias de ActRIIB de varios organismos vertebrados proporcionan información sobre los residuos que pueden alterarse. Por lo tanto, un polipéptido variante ActRIIB humano activo útil como una trampa de GDF puede incluir uno o más aminoácidos en las posiciones correspondientes de la secuencia de otro vertebrado ActRIIB, o puede incluir un residuo que es similar al de la secuencia humana u otra secuencia de vertebrados. Los siguientes ejemplos ilustran este enfoque para definir una variante activa de ActRIIB. L46 es una valina en Xenopus ActRIIB, por lo que esta posición puede modificarse y, opcionalmente, puede modificarse a otro residuo hidrófobo, como V, I o F, o un residuo no polar como A. E52 es una K en Xenopus, lo que indica que este sitio puede tolerar una gran variedad de cambios, incluidos los residuos polares, como E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y y probablemente A. T93 es una K en Xenopus, lo que indica que se tolera una amplia variación estructural en esta posición, favoreciendo los residuos polares, como S, K, R, E, D, H, G, P, G e Y. F108 es una Y en Xenopus, y por lo tanto Y u otro grupo hidrófobo, como I, V o L deben ser tolerados. E111 es K en Xenopus, lo que indica que los residuos cargados serán tolerados en esta posición, incluidos D, R, K y H, así como Q y N. R112 es K en Xenopus, lo que indica que los residuos básicos se toleran en esta posición, incluyendo R y H. A en la posición 119 está relativamente mal conservada, y aparece como P en roedores y V en Xenopus, por lo que esencialmente cualquier aminoácido debe ser tolerado en esta posición.

La divulgación demuestra que la adición de otro sitio de glicosilación unido a N (N-X-S/T) aumenta la vida media en suero de una proteína de fusión ActRIIB-Fc, en relación con la forma ActRIIB(R64)-Fc. Al introducir una asparagina en la posición 24 (construcción A24N), se crea una secuencia NXT que confiere una vida media más larga. Otras secuencias NX(T/S) se encuentran en 42-44 (NQS) y 65-67 (NSS), aunque esta última puede no estar glicosilada de manera eficiente con el R en la posición 64. Las secuencias N-X-S/T generalmente se pueden introducir en las posiciones fuera del bolsillo de unión al ligando definido en la Figura 1. Los sitios particularmente adecuados para la

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

La posición L79 de ActRIIB puede alterarse para conferir propiedades de unión activina-miostatina (GDF-11) alteradas. L79A o L79P reduce la unión a GDF-11 en mayor medida que la unión a activina. L79E o L79D retiene la unión de GDF-11. Sorprendentemente, las variantes L79E y L79D han reducido en gran medida la unión de activina. Los experimentos in vivo indican que estos receptores que no son de activina retienen una capacidad significativa para aumentar los glóbulos rojos, pero muestran una disminución de los efectos en otros tejidos. Estos datos demuestran la conveniencia y viabilidad para obtener polipéptidos con efectos reducidos sobre la activina. Los métodos descritos en el presente documento pueden utilizar un polipéptido de trampa de GDF que es un polipéptido ActRIIB variante que comprende un aminoácido ácido (por ejemplo, D o E) en la posición correspondiente a la posición 79 de SEQ ID NO: 1 o 39, opcionalmente en combinación con uno o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos adicionales.

Las variaciones descritas se pueden combinar de varias maneras. Además, los resultados del programa de mutagénesis descrito en este documento indican que hay posiciones de aminoácidos en ActRIIB que con frecuencia son beneficiosas para conservar. Estos incluyen la posición 64 (aminoácido básico), la posición 80 (aminoácido ácido o hidrófobo), la posición 78 (hidrófobo y particularmente triptófano), la posición 37 (ácido y particularmente ácido aspártico o glutámico), la posición 56 (aminoácido básico), posición 60 (aminoácido hidrófobo, particularmente fenilalanina o tirosina). Por lo tanto, en cada una de las variantes descritas en el presente documento, la divulgación proporciona un marco de aminoácidos que pueden conservarse. Otras posiciones que pueden ser deseables para conservar son las siguientes: posición 52 (aminoácido ácido), posición 55 (aminoácido básico), posición 81 (ácido), 98 (polar o cargado, particularmente E, D, R o K).

Los fragmentos aislados de polipéptidos ActRIIB se pueden obtener mediante el rastreo de polipéptidos producidos de forma recombinante a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRIIB (por ejemplo, SEQ ID NOs: 4 y 5). Además, los fragmentos pueden sintetizarse químicamente usando técnicas conocidas en el arte, tales como la química convencional Merrifield en fase sólida f-Moc o t-Boc. Los fragmentos pueden producirse (de forma recombinante o por síntesis química) y probarse para identificar aquellos fragmentos de peptidilo que pueden funcionar, por ejemplo, como antagonistas (inhibidores) o agonistas (activadores) de una proteína ActRIIB o un ligando ActRIIB.

Un polipéptido de trampa de GDF puede ser un polipéptido ActRIIB variante que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 75% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 o 41. En ciertos casos, la trampa de GDF tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 o 41. La trampa de GDF puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en, una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 o 41, en donde la posición correspondiente a L79 de la SEQ ID NO: 1 es un aminoácido ácido (por ejemplo, un residuo de aminoácido D o E).

La presente invención contempla hacer variantes funcionales modificando la estructura de un polipéptido de trampa de GDF para propósitos tales como mejorar la eficacia terapéutica o la estabilidad (por ejemplo, vida útil ex vivo y resistencia a la degradación proteolítica in vivo). Los polipéptidos de trampa de GDF también se pueden producir mediante sustitución, eliminación o adición de aminoácidos. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado (por ejemplo, mutaciones conservadoras) no tendrán un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Los reemplazos conservadores son aquellos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Se puede determinar fácilmente si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de trampa de GDF da como resultado una variante funcional evaluando la capacidad del polipéptido de trampa de GDF para producir una respuesta en las células en relación con el polipéptido de trampa de GDF no modificado o un ActRIIB de tipo salvaje polipéptido, o para unirse a uno o más ligandos, tales como activina, GDF-11 o miostatina en comparación con el polipéptido de trampa de GDF no modificado o un polipéptido ActRIIB de tipo salvaje.

La presente invención contempla realizar mutaciones en el dominio extracelular (también denominado dominio de unión a ligando) de un polipéptido ActRIIB de modo que el polipéptido ActRIIB tenga actividades de unión a ligando alteradas (por ejemplo, afinidad de unión o especificidad de unión). En ciertos casos, dichos polipéptidos de trampa de GDF tienen una afinidad de unión alterada (elevada o reducida) por un ligando específico. En otros casos, los polipéptidos de trampa de GDF han alterado la especificidad de unión para los ligandos de ActRIIB.

Por ejemplo, la divulgación proporciona polipéptidos de trampa de GDF que se unen preferentemente a GDF8/GDF11 en relación con las activinas. La divulgación establece además la conveniencia de tales polipéptidos para reducir los efectos fuera del objetivo, aunque tales variantes selectivas pueden ser menos deseables para el tratamiento de enfermedades graves en las que se pueden necesitar ganancias muy grandes en los niveles de glóbulos rojos para un efecto terapéutico y donde algún nivel de efecto fuera del objetivo es aceptable. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos de la proteína ActRIIB, como E39, K55, Y60, K74, W78, D80 y F101, están en la bolsa de unión al ligando y median la unión a sus ligandos, como activina y GDF8. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona una trampa de GDF que comprende un dominio de unión a ligando alterado (por ejemplo, dominio de unión a GDF8) de un receptor ActRIIB, que comprende una o más mutaciones en esos residuos de aminoácidos. Opcionalmente, el dominio de unión a ligando alterado puede tener una selectividad aumentada para un ligando tal como GDF8 con respecto a un dominio de unión a ligando de tipo salvaje de un receptor ActRIIB. Para ilustrar, estas mutaciones aumentan la selectividad del dominio de unión al ligando alterado para GDF8 sobre activina. Opcionalmente, el dominio de unión al ligando alterado tiene una relación de K_d para la unión de activina a K_d para la unión a GDF8 que es al menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces mayor en relación con la relación para el dominio de unión al ligando de tipo salvaje. Opcionalmente, el dominio de unión al ligando alterado tiene una proporción de IC_{50} para inhibir activina a IC_{50} para inhibir GDF8 que es al menos 2, 5, 10 o incluso 100 veces mayor en relación con el dominio de unión a ligando de tipo salvaje. Opcionalmente, el dominio de unión al ligando alterado inhibe GDF8 con un IC_{50} al menos 2, 5, 10, o incluso 100 veces menos que el IC_{50} para inhibir la activina.

Como un ejemplo específico, el residuo de aminoácido cargado positivamente Asp (D80) del dominio de unión a ligando de ActRIIB puede mutar a un residuo de aminoácido diferente para producir un polipéptido de trampa de GDF que se une preferentemente a GDF8, pero no a activina. Preferiblemente, el residuo D80 se cambia a un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: un residuo de aminoácido no cargado, un residuo de aminoácido negativo y un residuo de aminoácido hidrófobo. Como otro ejemplo específico, el residuo hidrófobo, L79, se puede alterar a los aminoácidos ácido aspártico o ácido glutámico para reducir en gran medida la unión de activina mientras se retiene la unión de GDF11. Como reconocerá un experto en la materia, la mayoría de las mutaciones, variantes o modificaciones descritas pueden realizarse a nivel de ácido nucleico o, en algunos casos, mediante modificación postraducción o síntesis química. Dichas técnicas son bien conocidas en la técnica.

La presente invención contempla polipéptidos de trampa de GDF que tienen mutaciones específicas en ActRIIB para alterar la glucosilación del polipéptido ActRIIB. Ejemplos de sitios de glicosilación en polipéptidos de trampa de GDF se ilustran en la Figura 1 (por ejemplo, los sitios subrayados NX(S/T)). Dichas mutaciones se pueden seleccionar para introducir o eliminar uno o más sitios de glicosilación, tales como sitios de glicosilación unidos a O u N. Los sitios de reconocimiento de glicosilación unidos a asparagina generalmente comprenden una secuencia de tripéptidos, asparagina-X-treonina (donde "X" es cualquier aminoácido) que se reconoce específicamente por las enzimas de glicosilación celular apropiadas. La alteración también puede realizarse mediante la adición o sustitución por uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del polipéptido ActRIIB de tipo salvaje (para sitios de glicosilación unidos a O). Una variedad de sustituciones o eliminaciones de aminoácidos en una o ambas de las posiciones de aminoácidos primera o tercera de un sitio de reconocimiento de glucosilación (y/o eliminación de aminoácidos en la segunda posición) da como resultado la no glucosilación en la secuencia de tripéptidos modificada. Otro medio de aumentar el número de unidades estructurales de carbohidratos en un polipéptido de trampa de GDF es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido de trampa de GDF. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el (los) azúcar(s) pueden unirse a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína; (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina; (e) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano; o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en WO 87/05330 y en Aplin and Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., Págs. 259-306. La eliminación de una o más unidades estructurales de carbohidratos presentes en un polipéptido de trampa de GDF puede realizarse química y/o enzimáticamente. La desglucosilación química puede implicar, por ejemplo, la exposición del polipéptido de trampa de GDF al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o de todos los azúcares, excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras deja intacta la secuencia de aminoácidos. La desglucosilación química se describe adicionalmente por Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys 259: 52 y por Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118: 131. La escisión enzimática de unidades estructurales de carbohidratos en los polipéptidos de trampa de GDF se puede lograr mediante el uso de una variedad de endo y exoglicosidasas como lo describe Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol 138: 350. La secuencia de un polipéptido de trampa de GDF puede ajustarse, según corresponda, dependiendo del tipo de sistema de expresión utilizado, ya que las células de mamíferos, levaduras, insectos y plantas pueden introducir diferentes patrones de glicosilación que pueden verse afectados por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, los polipéptidos de trampa de GDF para uso en humanos se expresarán en una línea celular de mamífero

que proporciona una glucosilación adecuada, tal como líneas celulares HEK293 o CHO, aunque también se espera que otras líneas celulares de expresión en mamíferos sean útiles.

Esta divulgación contempla además un método para generar variantes, particularmente conjuntos de variantes combinatorias de un polipéptido de trampa de GDF, que incluye, opcionalmente, variantes de truncamiento; los grupos de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificar secuencias de trampa de GDF. El propósito de explorar tales bibliotecas combinatorias puede ser generar, por ejemplo, variantes de polipéptidos de trampa de GDF que tengan propiedades alteradas, tales como farmacocinética alterada o unión de ligando alterada. A continuación, se proporciona una variedad de ensayos de detección, y dichos ensayos pueden usarse para evaluar variantes. Por ejemplo, una variante de polipéptido de trampa de GDF puede seleccionarse para determinar la capacidad de unirse a un polipéptido ActRIIB, para evitar la unión de un ligando ActRIIB a un polipéptido ActRIIB o para interferir con la señalización causada por un ligando ActRIIB.

La actividad de un polipéptido de trampa de GDF o sus variantes también se puede probar en un ensayo basado en células o in vivo. Por ejemplo, se puede evaluar el efecto de una variante de polipéptido de trampa de GDF en la expresión de genes implicados en la hematopoyesis. Esto puede, según sea necesario, realizarse en presencia de una o más proteínas de ligando ActRIIB recombinantes (por ejemplo, activina), y las células pueden transfectarse para producir un polipéptido de trampa de GDF y/o variantes del mismo, y opcionalmente, un ligando ActRIIB. Del mismo modo, un polipéptido de trampa de GDF puede administrarse a un ratón u otro animal, y una o más mediciones de sangre, como un recuento de glóbulos rojos, niveles de hemoglobina, niveles de hematocrito, depósitos de hierro o recuento de reticulocitos pueden evaluarse utilizando métodos reconocidos en la técnica.

Se pueden generar variantes derivadas combinatoriamente que tienen una potencia selectiva con respecto a un polipéptido de trampa de GDF de referencia. Dichas proteínas variantes, cuando se expresan a partir de constructos de ADN recombinante, pueden usarse en protocolos de terapia génica. Del mismo modo, la mutagénesis puede dar lugar a variantes que tienen vidas medias intracelulares dramáticamente diferentes que el polipéptido de trampa de GDF no modificado correspondiente. Por ejemplo, la proteína alterada puede volverse más estable o menos estable a la degradación proteolítica u otros procesos que dan como resultado la destrucción o la inactivación de un polipéptido de trampa de GDF no modificado. Dichas variantes, y los genes que las codifican, se pueden utilizar para alterar los niveles de polipéptido de trampa de GDF mediante la modulación de la vida media de los polipéptidos de trampa de GDF. Por ejemplo, una vida media corta puede dar lugar a efectos biológicos más transitorios y, cuando forma parte de un sistema de expresión inducible, puede permitir un control más estricto de los niveles de polipéptido de trampa de GDF recombinante dentro de la célula. En una proteína de fusión Fc, se pueden hacer mutaciones en el conector (si lo hay) y/o la porción Fc para alterar la vida media de la proteína.

Los polipéptidos de trampa de GDF de la invención pueden comprender además modificaciones postraducción además de cualquiera que esté naturalmente presente en los polipéptidos ActRIIB. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos de trampa de GDF pueden contener elementos que no son aminoácidos, como polietilenglicoles, lípidos, poli o monosacáridos y fosfatos. Los efectos de dichos elementos que no son aminoácidos sobre la funcionalidad de un polipéptido de trampa de GDF pueden probarse como se describe en el presente documento para otras variantes del polipéptido de trampa de GDF. Cuando se produce un polipéptido de trampa de GDF en células al escindir una forma naciente del polipéptido de trampa de GDF, el procesamiento postraducción también puede ser importante para el correcto plegamiento y/o función de la proteína. Las diferentes células (como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades postraducción y pueden elegirse para garantizar la correcta modificación y procesamiento de los polipéptidos de trampa de GDF.

Los polipéptidos de trampa de GDF pueden incluir proteínas de fusión que tienen al menos una porción de un polipéptido ActRIIB y uno o más dominios de fusión. Ejemplos bien conocidos de tales dominios de fusión incluyen, pero no se limitan a, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tiorredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, un Fc), maltosa proteína de unión (MBP) o albúmina sérica humana. Se puede seleccionar un dominio de fusión para conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión por cromatografía de afinidad. Para fines de purificación por afinidad, se utilizan matrices relevantes para la cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas con glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Muchas de esas matrices están disponibles en forma de "kit", como el sistema de purificación Pharmacia GST y el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útiles con asociados de fusión (HIS₆). Como otro ejemplo, se puede seleccionar un dominio de fusión para facilitar la detección de los polipéptidos de trampa de GDF. Ejemplos de tales dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP) así como las "etiquetas de epítipo", que generalmente son secuencias peptídicas cortas para las que está disponible un anticuerpo específico. Etiquetas de epítipos bien conocidas para las cuales los anticuerpos monoclonales específicos están fácilmente disponibles incluyen FLAG, hemaglutinina (HA) del virus de la influenza y etiquetas c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de la proteasa, como el Factor Xa o la Trombina, que permite que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y, por lo tanto, libere las proteínas recombinantes de las mismas. Las proteínas liberadas pueden aislarse luego del dominio de fusión mediante separación cromatográfica

posterior. Un polipéptido de trampa de GDF puede fusionarse con un dominio que estabiliza el polipéptido de trampa de GDF in vivo (un dominio "estabilizador"). Por "estabilizar" se entiende cualquier cosa que aumente la vida media del suero, independientemente de si esto se debe a una disminución de la destrucción, disminución de la eliminación renal u otro efecto farmacocinético. Se sabe que las fusiones con la porción Fc de una inmunoglobulina confieren propiedades farmacocinéticas deseables a una amplia gama de proteínas. Asimismo, las fusiones a la albúmina sérica humana pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que pueden seleccionarse incluyen dominios multimerizantes (por ejemplo, dimerizantes, tetramerizantes) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, como aumentar aún más los niveles de glóbulos rojos).

10 Como un ejemplo específico, la presente divulgación proporciona una trampa de GDF que es una proteína de fusión ActRIIB-Fc que comprende un dominio extracelular (por ejemplo, unión a ligando) del polipéptido ActRIIB fusionado a un dominio Fc. La secuencia de un dominio Fc de ejemplo se muestra a continuación (SEQ ID NO: 6).

THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVP IEKTI SKAK
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
 PFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK*

15 Opcionalmente, el dominio Fc tiene una o más mutaciones en residuos tales como Asp-265, lisina 322 y Asn-434. En ciertos casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo, mutación Asp-265) tiene una capacidad reducida de unión al receptor Fcy en relación con un dominio Fc de tipo salvaje. En otros casos, el dominio Fc mutante que tiene una o más de estas mutaciones (por ejemplo, la mutación Asn-434) tiene una mayor capacidad de unión al receptor Fc relacionado con MHC de clase I (FcRN) en relación con un dominio Fc de tipo salvaje.

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

30 Una proteína de fusión de trampa de GDF puede comprender una secuencia de aminoácidos como se establece en la fórmula A-B-C. La porción B es un polipéptido ActRIIB truncado N y C terminal que consiste en la secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 26-132 de la SEQ ID NO: 26. Las porciones A y C pueden ser independientemente cero, uno o más de un aminoácidos, y las porciones A y C cuando están presentes son heterólogas a B. Las porciones A y/o C pueden unirse a la porción B a través de una secuencia enlazadora. Enlazadores de ejemplo incluyen enlazadores de polipéptidos cortos tales como 2-10, 2-5, 2-4, 2-3 residuos de glicina, tales como, por ejemplo, un enlazador Gly-Gly-Gly. Otros enlazadores adecuados se describen aquí anteriormente. Una proteína de fusión de trampa de GDF puede comprender una secuencia de aminoácidos como se establece en la fórmula A-B-C, en donde A es una secuencia guía, B consiste en los aminoácidos 26-132 de la SEQ ID NO: 26, y C es una porción de polipéptido que mejora uno o más de estabilidad in vivo, vida media in vivo, absorción/administración, localización o distribución de tejidos, formación de complejos de proteínas y/o purificación. Una proteína de fusión de trampa de GDF puede comprender una secuencia de aminoácidos como se establece en la fórmula A-B-C, en la que A es una secuencia guía de TPA, B consiste en los aminoácidos 26-132 de la SEQ ID NO: 26 y C es un dominio Fc de inmunoglobulina. Una proteína de fusión de trampa de GDF preferida comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 26.

45 Los polipéptidos de trampa de GDF de la presente invención pueden contener una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos de trampa de GDF. Por ejemplo, tales modificaciones mejoran la vida media in vitro de los polipéptidos de trampa de GDF, mejoran la vida media circulatoria de los polipéptidos de trampa de GDF o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos de trampa de GDF. Dichas modificaciones estabilizadoras incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión (que incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de trampa de GDF y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glicosilación (que incluye, por ejemplo, la adición de un sitio de glicosilación a un polipéptido de trampa de GDF) y modificaciones del unidad estructural de carbohidrato (incluyendo, por ejemplo, la eliminación de unidades estructurales de carbohidrato de un polipéptido de trampa de GDF). En el caso de las proteínas de fusión, un polipéptido de trampa de GDF se fusiona a un dominio estabilizador tal como una molécula de IgG (por ejemplo, un dominio Fc). Como se usa en el presente documento, el término "dominio estabilizador" no solo se refiere a un dominio de fusión (por ejemplo, Fc) como en el caso de las proteínas de fusión, sino que también incluye modificaciones no proteicas como una unidad estructural de carbohidrato o un polímero no proteico, como el polietilenglicol.

60

La presente divulgación pone a disposición formas aisladas y/o purificadas de los polipéptidos de trampa de GDF, que están aisladas de otras proteínas o, de otro modo, sustancialmente libres de ellas.

5 Los polipéptidos de trampa de GDF (no modificados o modificados) de la invención pueden producirse mediante una
 variedad de técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, dichos polipéptidos de trampa de GDF se pueden sintetizar
 utilizando técnicas de química de proteínas estándar como las descritas en Bodansky, M. Principles of Peptide
 Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993) y Grant G.A. (ed.), Synthetic Peptides: A User Guide, W.H. Freeman and
 Company, New York (1992). Además, los sintetizadores automáticos de péptidos están disponibles comercialmente
 10 (por ejemplo, Advanced ChemTech Modelo 396; Milligen/Biosearch 9600). Alternativamente, los polipéptidos,
 fragmentos o variantes de la trampa de GDF pueden producirse de manera recombinante usando diversos sistemas
 de expresión (por ejemplo, E. coli, células de ovario de hámster chino (CHO), células COS, baculovirus) como es
 bien conocido en la técnica. Los polipéptidos de trampa de GDF modificados o no modificados se pueden producir
 por digestión de polipéptidos de trampa de GDF de longitud completa producidos de manera recombinante
 utilizando, por ejemplo, una proteasa, por ejemplo, tripsina, termolisina, quimotripsina, pepsina o enzima
 15 convertidora de aminoácidos básicos apareados (PACE). El análisis por computadora (usando un software
 comercialmente disponible, por ejemplo, MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) puede usarse
 para identificar sitios de escisión proteolítica. Alternativamente, dichos polipéptidos de trampa de GDF pueden
 producirse a partir de polipéptidos de trampa de GDF de longitud completa producidos de manera recombinante
 tales como técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como por escisión química (por ejemplo, bromuro de
 20 cianógeno, hidroxilamina).

3. Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de trampa de GDF

25 En ciertos aspectos, la invención proporciona ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican cualquiera
 de los polipéptidos de trampa de GDF de la divulgación. La SEQ ID NO: 4 codifica un polipéptido precursor ActRIIB
 natural, mientras que la SEQ ID NO: 5 codifica un polipéptido ActRIIB soluble, y las SEQ ID NO: 25, 27, 30 y 31
 codifican trampas de GDF solubles. Los ácidos nucleicos objeto pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Dichos
 ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Estos ácidos nucleicos pueden usarse, por ejemplo, en
 30 métodos para fabricar polipéptidos de trampa de GDF o como agentes terapéuticos directos (por ejemplo, en una
 metodología de terapia génica).

Los ácidos nucleicos sujetos que codifican los polipéptidos de trampa de GDF pueden entenderse además por incluir
 ácidos nucleicos que son variantes de las SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 y 31. Las secuencias de nucleótidos variantes
 incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones de nucleótidos, adiciones o eliminaciones, tales como
 35 variantes alélicas; y, por lo tanto, incluirá secuencias de codificación que difieren de la secuencia de nucleótidos de
 la secuencia de codificación designada en las SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 y 31.

La invención proporciona secuencias de ácido nucleico aisladas o recombinantes que son al menos 80%, 85%, 90%,
 40 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticas a la SEQ ID NO: 27 o 30. Un experto en la materia apreciarán que las
 secuencias de ácido nucleico complementarias a la SEQ ID NO: 27 o 30, y las variantes de la SEQ ID NO: 27 o 30,
 también están dentro del alcance de esta invención. En realizaciones adicionales, las secuencias de ácido nucleico
 de la invención se pueden aislar, recombinar y/o fusionar con una secuencia de nucleótidos heteróloga, o en una
 biblioteca de ADN.

45 Los ácidos nucleicos de la invención también pueden incluir secuencias de nucleótidos que hibridan en condiciones
 altamente estrictas con la secuencia de nucleótidos designada en las SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o 31, secuencia
 complementaria de la SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o 31, o fragmentos de las mismas. Como se discutió anteriormente,
 un experto en la materia entenderá fácilmente que las condiciones de restricción apropiadas que promueven la
 hibridación de ADN pueden variar. Por ejemplo, se podría realizar la hibridación a 6.0 x cloruro de sodio/citrato de
 50 sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de un lavado de 2.0 x SSC a 50°C. Por ejemplo, la concentración de
 sal en la etapa de lavado puede seleccionarse desde una baja restricción de aproximadamente 2.0 x SSC a 50°C
 hasta una alta restricción de aproximadamente 0.2 x SSC a 50°C. Además, la temperatura en la etapa de lavado se
 puede aumentar de condiciones de baja restricción a temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, a condiciones
 de alta restricción a aproximadamente 65°C. Tanto la temperatura como la sal pueden variar, o la temperatura o la
 55 concentración de sal pueden mantenerse constantes mientras se cambia la otra variable. En una realización, la
 invención proporciona ácidos nucleicos que hibridan en condiciones de baja restricción de 6 x SSC a temperatura
 ambiente seguido de un lavado a 2 x SSC a temperatura ambiente.

Los ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos como se establece en SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 o
 60 31 debido a la degeneración en el código genético también están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo,
 varios aminoácidos están designados por más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido o
 sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos de histidina) pueden dar lugar a mutaciones "silenciosas" que no
 afectan la secuencia de aminoácidos de la proteína. El polipéptido de trampa de GDF puede estar codificado por una
 secuencia de nucleótidos alternativa. Las secuencias de nucleótidos alternativas se degeneran con respecto a la
 65 secuencia de ácidos nucleicos de la trampa de GDF nativa pero todavía codifican para la misma proteína de fusión.
 La trampa de GDF que tiene la SEQ ID NO: 26 puede estar codificada por una secuencia alternativa de ácido

nucleico que comprende la SEQ ID NO: 30. Sin embargo, se espera que existan polimorfismos de la secuencia de ADN que conduzcan a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas en cuestión entre células de mamíferos. Un experto en la materia apreciará que estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente el 3-5% de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína particular pueden existir entre individuos de una especie dada debido a la variación alélica natural. Cualquiera y todas estas variaciones de nucleótidos y polimorfismos de aminoácidos resultantes están dentro del alcance de esta invención.

Los ácidos nucleicos recombinantes de la invención pueden unirse operativamente a una o más secuencias de nucleótidos reguladores en una construcción de expresión. Las secuencias de nucleótidos reguladoras generalmente serán apropiadas para la célula huésped utilizada para la expresión. Se conocen numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas en la técnica para una variedad de células huésped. Típicamente, dicha una o más secuencias de nucleótidos reguladores pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias promotoras, secuencias líder o de señal, sitios de unión ribosómica, secuencias de inicio y terminación transcripcionales, secuencias de inicio y terminación traducción, y secuencias potenciadoras o activadoras. La invención contempla los promotores constitutivos o inducibles como se conocen en la técnica. Los promotores pueden ser promotores naturales o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Una construcción de expresión puede estar presente en una célula en un episoma, como un plásmido, o la construcción de expresión puede insertarse en un cromosoma. El vector de expresión puede contener un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células huésped transformadas. Los genes marcadores seleccionables son bien conocidos en la técnica y variarán con la célula huésped utilizada.

El ácido nucleico sujeto de la invención puede proporcionarse en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de trampa de GDF y puede unirse operativamente a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras son reconocidas en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido de trampa de GDF. Por consiguiente, el término secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Ejemplos de secuencias reguladoras se describen en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de expresión que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando está unida operativamente a ella puede usarse en estos vectores para expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido de trampa de GDF. Dichas secuencias útiles de control de la expresión incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío de SV40, el promotor tet, el promotor temprano inmediato de adenovirus o citomegalovirus, los promotores RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión está dirigida por la ARN polimerasa T7, el operador principal y las regiones promotoras del fago lambda, las regiones de control para la proteína de cubierta fd, el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de apareamiento de la levadura, el promotor poliedro del sistema de baculovirus y otras secuencias conocidas por controlar la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus, y varias combinaciones de los mismos. Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar y/o el tipo de proteína que se desea expresar. Además, también se debe considerar el número de copias del vector, la capacidad de controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, como los marcadores antibióticos.

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

Algunos vectores de expresión en mamíferos contienen tanto secuencias procariotas para facilitar la propagación del vector en bacterias, como una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan en células eucariotas. Los vectores pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamíferos adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, como pBR322, para facilitar la replicación y la selección de resistencia a fármacos tanto en células procariotas como eucariotas. Alternativamente, los derivados de virus como el virus del papiloma bovino (BPV-1) o el virus de Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) pueden usarse para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Ejemplos de otros sistemas de expresión virales (incluidos los retrovirales) se pueden encontrar más adelante en la descripción de los sistemas de administración de terapia génica. Los diversos métodos empleados en la preparación de los plásmidos y en la transformación de organismos hospedantes son bien conocidos en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como eucariotas, así como para procedimientos recombinantes generales, véase Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., Ed. por Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) Capítulos 16 y 17. En algunos casos, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Ejemplos de dichos sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (como pVL1392, pVL1393 y

pVL941), vectores derivados de pAcUW (como pAcUW1) y vectores derivados de pBlueBac (como el β -gal que contiene pBlueBac III).

5 Preferiblemente, se diseñará un vector para la producción de los polipéptidos de trampa de GDF sujetos en células CHO, tales como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, California), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, California) y Vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wise.). Como será evidente, los constructos de genes en cuestión pueden usarse para provocar la expresión de los polipéptidos de trampa de GDF en células propagadas en cultivo, por ejemplo, para producir proteínas, incluidas proteínas de fusión o proteínas variantes, para purificación.

10 Esta divulgación también se refiere a una célula huésped transfectada con un gen recombinante que incluye una secuencia de codificación (por ejemplo, SEQ ID NO: 4, 5, 25, 27, 30 o 31) para uno o más de los polipéptidos de trampa de GDF sujetos. La célula huésped puede ser cualquier célula procarionta o eucarionta. Por ejemplo, un polipéptido de trampa de GDF de la invención puede expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (por ejemplo, usando un sistema de expresión de baculovirus), levadura o células de mamífero. Los expertos en la materia conocen otras células huésped adecuadas.

15 Por consiguiente, la presente invención se refiere además a métodos para producir los polipéptidos de trampa de GDF sujetos. Por ejemplo, una célula huésped transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido de trampa de GDF puede cultivarse en condiciones apropiadas para permitir que se produzca la expresión del polipéptido de trampa de GDF. El polipéptido de trampa de GDF puede secretarse y aislarse de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido de trampa de GDF. Alternativamente, el polipéptido de trampa de GDF puede retenerse citoplasmáticamente o en una fracción de membrana y las células se pueden recolectar, someter a lisis y aislar la proteína. Un cultivo celular incluye células huésped, medios y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular son bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos de trampa de GDF sujetos
20 pueden aislarse del medio de cultivo celular, células huésped, o ambos, usando técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis y purificación de inmunoadinidad con anticuerpos específicos para epítopos particulares de los polipéptidos de trampa de GDF. Preferiblemente, el polipéptido de trampa de GDF es una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación.

25 Un gen de fusión que codifica una secuencia guía de purificación, tal como una secuencia de sitio de escisión de poli-(His)/enteroquinasa en el extremo N de la porción deseada del polipéptido de trampa de GDF recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada por cromatografía de afinidad utilizando una resina de metal Ni^{2+} . La secuencia guía de la purificación se puede eliminar posteriormente mediante tratamiento con enteroquinasa para proporcionar el polipéptido de trampa de GDF purificado (por ejemplo, véase Hochuli et al., (1987) *J. Chromatography* 411: 177; y Janknecht et al., *PNAS USA* 88: 8972).

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

4. Ensayos de detección

40 Se describe en el presente documento el uso de los polipéptidos de trampa de GDF sujetos (por ejemplo, polipéptidos de ActRIIB de variante soluble) para identificar compuestos (agentes) que son agonistas o antagonistas de los polipéptidos de ActRIIB. Los compuestos identificados a través de este examen pueden analizarse para evaluar su capacidad para modular los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina y/o reticulocitos in vivo o in vitro. Estos compuestos se pueden probar, por ejemplo, en modelos animales.

45 Existen numerosas metodologías para la detección de agentes terapéuticos para aumentar los niveles de glóbulos rojos o hemoglobina dirigidos a la señalización de ActRIIB. Se puede realizar un cribado de alto rendimiento de compuestos para identificar agentes que perturban los efectos mediados por ActRIIB en una línea celular seleccionada. El ensayo se puede llevar a cabo para seleccionar e identificar compuestos que inhiben o reducen específicamente la unión de un polipéptido ActRIIB a su asociado de unión, como un ligando ActRIIB (por ejemplo, activina, Nodal, GDF8, GDF11 o BMP7). Alternativamente, el ensayo puede usarse para identificar compuestos que mejoran la unión de un polipéptido ActRIIB a su asociado de unión tal como un ligando ActRIIB. Los compuestos pueden identificarse por su capacidad de interactuar con un polipéptido ActRIIB.

50

55

60

65

Una variedad de formatos de ensayo será suficiente y, a la luz de la presente divulgación, aquellos no descritos expresamente en el presente documento serán comprendidos por un experto en la materia. Como se describe en este documento, los compuestos de prueba (agentes) descritos en este documento pueden crearse mediante cualquier método químico combinatorio. Alternativamente, los compuestos sujetos pueden ser biomoléculas de origen natural sintetizadas in vivo o in vitro. Los compuestos (agentes) que se analizarán para determinar su capacidad de actuar como moduladores del crecimiento de los tejidos pueden ser producidos, por ejemplo, por bacterias, levaduras, plantas u otros organismos (por ejemplo, productos naturales), producidos químicamente (por ejemplo, moléculas pequeñas, incluidos peptidomiméticos), o producidos de forma recombinante. Los compuestos de prueba contemplados incluyen moléculas orgánicas no peptídicas, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas y moléculas de ácido nucleico. El agente de prueba puede ser una molécula orgánica pequeña que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 2000 Daltons.

Los compuestos de prueba pueden proporcionarse como entidades individuales, discretas, o proporcionarse en bibliotecas de mayor complejidad, tal como las preparadas por química combinatoria. Estas bibliotecas pueden comprender, por ejemplo, alcoholes, haluros de alquilo, aminas, amidas, ésteres, aldehídos, éteres y otras clases de compuestos orgánicos. La presentación de los compuestos de prueba al sistema de prueba puede ser en forma aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en los pasos iniciales de selección. Opcionalmente, los compuestos pueden derivarse opcionalmente con otros compuestos y tener grupos de derivación que faciliten el aislamiento de los compuestos. Ejemplos no limitantes de grupos de derivación incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína fluorescente verde, isótopos, polihistidina, perlas magnéticas, glutatión S transferasa (GST), reticuladores fotoactivables o cualquier combinación de los mismos.

En muchos programas de detección de fármacos que prueban bibliotecas de compuestos y extractos naturales, son deseables ensayos de alto rendimiento para maximizar el número de compuestos estudiados en un período de tiempo dado. Los ensayos que se realizan en sistemas libres de células, como los que pueden derivarse con proteínas purificadas o semipurificadas, con frecuencia se prefieren como cribas "primarias", ya que pueden generarse para permitir un desarrollo rápido y una detección relativamente fácil de una alteración en una diana molecular que está mediada por un compuesto de prueba. Además, los efectos de la toxicidad celular o la biodisponibilidad del compuesto de prueba generalmente se pueden ignorar en el sistema in vitro, y el ensayo se centra principalmente en el efecto del fármaco en la diana molecular como puede manifestarse en una alteración de la afinidad de unión entre un polipéptido ActRIIB y su asociado de unión (por ejemplo, un ligando ActRIIB).

Simplemente para ilustrar, en un ensayo de cribado de ejemplo, el compuesto de interés se pone en contacto con un polipéptido ActRIIB aislado y purificado que normalmente es capaz de unirse a un ligando ActRIIB, según sea apropiado para la intención del ensayo. Luego, a la mezcla del compuesto y el polipéptido ActRIIB se agrega a una composición que contiene un ligando ActRIIB. La detección y cuantificación de los complejos de ligando ActRIIB/ActRIIB proporciona un medio para determinar la eficacia del compuesto para inhibir (o potenciar) la formación de complejos entre el polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. La eficacia del compuesto puede evaluarse generando curvas de respuesta a la dosis a partir de los datos obtenidos utilizando diversas concentraciones del compuesto de prueba. Además, también se puede realizar un ensayo de control para proporcionar una línea de base para la comparación. Por ejemplo, en un ensayo de control, se agrega ligando ActRIIB aislado y purificado a una composición que contiene el polipéptido ActRIIB, y la formación del complejo de ligando ActRIIB/ActRIIB se cuantifica en ausencia del compuesto de prueba. Se entenderá que, en general, el orden en que pueden mezclarse los reactivos puede variarse, y pueden mezclarse simultáneamente. Además, en lugar de proteínas purificadas, se pueden usar extractos y lisados celulares para proporcionar un sistema de ensayo libre de células adecuado.

La formación de complejos entre el polipéptido ActRIIB y su proteína de unión puede detectarse mediante una variedad de técnicas. Por ejemplo, la modulación de la formación de complejos se puede cuantificar usando, por ejemplo, proteínas marcadas de forma detectable, como las radiomarcadas (por ejemplo, ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C o ^3H), marcadas con fluorescencia (por ejemplo, FITC) o el polipéptido ActRIIB o sus proteínas de unión marcado enzimáticamente, por inmunoensayo o por detección cromatográfica.

Aquí se divulga el uso de ensayos de polarización de fluorescencia y ensayos de transferencia de energía de resonancia en fluorescencia (FRET) para medir, directa o indirectamente, el grado de interacción entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. Además, se pueden usar otros modos de detección, tales como los basados en guías de ondas ópticas (Publicación PCT WO 96/26432 y Patente de los Estados Unidos No. 5,677,196), resonancia de plasmón superficial (SPR), sensores de carga superficial y sensores de fuerza superficial.

Además, se describe en el presente documento el uso de un ensayo de trampa de interacción, también conocido como el "ensayo de dos híbridos", para identificar agentes que interrumpen o potencien la interacción entre un polipéptido ActRIIB y su asociado de unión. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,283,317; Zervos et al. (1993) Cell 72: 223-232; Madura et al. (1993) J Biol Chem 268: 12046-12054; Bartel et al. (1993) Biotechniques 14: 920-924; e Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8: 1693-1696). En el presente documento se divulga el uso de dos sistemas híbridos inversos para identificar compuestos (por ejemplo, moléculas pequeñas o péptidos) que disocian las interacciones entre un polipéptido ActRIIB y su proteína de unión. Véanse, por ejemplo, Vidal and

Legrain, (1999) *Nucleic Acids Res* 27: 919-29; Vidal and Legrain, (1999) *Trends Biotechnol* 17: 374-81; y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,525,490; 5,955,280; y 5,965,368.

Los compuestos en cuestión pueden identificarse por su capacidad de interactuar con un polipéptido ActRIIB. La interacción entre el compuesto y el polipéptido ActRIIB puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, dicha interacción se puede identificar a nivel de proteína utilizando métodos bioquímicos in vitro, que incluyen fotorreticulación, unión de ligando radiomarcado y cromatografía de afinidad (Jakoby WB et al., 1974, *Methods in Enzymology* 46: 1). En ciertos casos, los compuestos pueden seleccionarse en un ensayo basado en un mecanismo, como un ensayo para detectar compuestos que se unen a un polipéptido ActRIIB. Esto puede incluir un evento de unión en fase sólida o en fase fluida. Alternativamente, el gen que codifica un polipéptido ActRIIB puede transfectarse con un sistema informador (por ejemplo, β -galactosidasa, luciferasa o proteína fluorescente verde) en una célula y seleccionarse contra la biblioteca preferiblemente mediante un examen de alto rendimiento o con miembros individuales de la biblioteca. Se pueden usar otros ensayos de unión basados en mecanismos, por ejemplo, ensayos de unión que detectan cambios en la energía libre. Los ensayos de unión pueden realizarse con la diana fijada a un pozo, perla o chip o capturada por un anticuerpo inmovilizado o resuelta por electroforesis capilar. Los compuestos unidos pueden detectarse usualmente utilizando colorimetría o fluorescencia o resonancia de plasmón superficial.

5. Usos terapéuticos de ejemplo

Los polipéptidos de trampa de GDF de la presente invención pueden usarse para aumentar los niveles de glóbulos rojos en mamíferos tales como roedores y primates, y particularmente pacientes humanos. Aquí se describen métodos para tratar o prevenir la anemia en un individuo que lo necesita mediante la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de trampa de GDF. Estos métodos pueden usarse para tratamientos terapéuticos y profilácticos de mamíferos, y particularmente de humanos.

Como se usa en el presente documento, un agente terapéutico que "previene" un trastorno o afección se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o afección en la muestra tratada en relación con una muestra de control no tratada, o retrasa el inicio o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o afección en relación con la muestra de control no tratada. El término "tratar" como se usa en el presente documento incluye la profilaxis de la afección nombrada o la mejora o eliminación de la afección una vez que se ha establecido. En cualquier caso, la prevención o el tratamiento pueden discernirse en el diagnóstico proporcionado por un médico u otro proveedor de atención médica y el resultado previsto de la administración del agente terapéutico.

Como se muestra en el presente documento, los polipéptidos de trampa de GDF pueden usarse para aumentar los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina o reticulocitos en individuos sanos, y dichos polipéptidos de trampa de GDF pueden usarse en poblaciones de pacientes seleccionadas. Ejemplos de poblaciones de pacientes apropiadas incluyen aquellos con niveles de hemoglobina o glóbulos rojos indeseablemente bajos, como pacientes con anemia, y aquellos que están en riesgo de desarrollar niveles de hemoglobina o glóbulos rojos indeseablemente bajos, como aquellos pacientes que están a punto de sufrir cirugía mayor u otros procedimientos que pueden provocar una pérdida de sangre considerable. Un paciente con niveles adecuados de glóbulos rojos puede ser tratado con un polipéptido de trampa de GDF para aumentar los niveles de glóbulos rojos, y luego se extrae sangre y se almacena para su uso posterior en transfusiones.

Los polipéptidos de trampa de GDF descritos en este documento pueden usarse para aumentar los niveles de glóbulos rojos en pacientes que tienen anemia. Al observar los niveles de hemoglobina en humanos, un nivel inferior a lo normal para la categoría de edad y sexo apropiada puede ser indicativo de anemia, aunque se tienen en cuenta las variaciones individuales. Por ejemplo, un nivel de hemoglobina de 12 g/dl generalmente se considera el límite inferior normal en la población adulta general. Las causas potenciales incluyen pérdida de sangre, déficit nutricional, reacción a la medicación, diversos problemas con la médula ósea y muchas enfermedades. Más particularmente, la anemia se ha asociado con una variedad de trastornos que incluyen, por ejemplo, insuficiencia renal crónica, síndrome mielodisplásico, artritis reumatoide, trasplante de médula ósea. La anemia también puede estar asociada con las siguientes condiciones: tumores sólidos (por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon); tumores del sistema linfático (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica, linfomas no Hodgkin y Hodgkin); tumores del sistema hematopoyético (por ejemplo, leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple); radioterapia; quimioterapia (por ejemplo, regímenes que contienen platino); enfermedades inflamatorias y autoinmunes, que incluyen, entre otras, artritis reumatoide, otras artritis inflamatorias, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedades cutáneas agudas o crónicas (por ejemplo, psoriasis), enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); enfermedad o insuficiencia renal aguda o crónica, incluidas afecciones idiopáticas o congénitas; enfermedad hepática aguda o crónica; sangrado agudo o crónico; situaciones donde la transfusión de glóbulos rojos no es posible debido a alo o autoanticuerpos del paciente y/o por razones religiosas (por ejemplo, algunos Testigos de Jehová); infecciones (por ejemplo, malaria, osteomielitis); hemoglobinopatías, que incluyen, por ejemplo, enfermedad de células falciformes, talasemias; uso o abuso de drogas, por ejemplo, abuso de alcohol; pacientes pediátricos con anemia por cualquier causa para evitar transfusiones; y pacientes de edad avanzada o

pacientes con enfermedad cardiopulmonar subyacente con anemia que no pueden recibir transfusiones debido a preocupaciones sobre la sobrecarga circulatoria.

Los polipéptidos de trampa de GDF serían apropiados para tratar las anemias de la médula ósea hipoproliferativa, que típicamente se asocian con un pequeño cambio en la morfología de los glóbulos rojos (RBC). Las anemias hipoproliferativas incluyen: 1) anemia de enfermedad crónica, 2) anemia de enfermedad renal y 3) anemia asociada con estados hipometabólicos. En cada uno de estos tipos, los niveles de eritropoyetina endógena son inapropiadamente bajos para el grado de anemia observado. Otras anemias hipoproliferativas incluyen: 4) anemia por deficiencia de hierro en etapa temprana y 5) anemia causada por daño a la médula ósea. En estos tipos, los niveles de eritropoyetina endógena están adecuadamente elevados para el grado de anemia observado.

El tipo más común es la anemia de enfermedad crónica, que abarca inflamación, infección, lesión tisular y afecciones como el cáncer, y se distingue tanto por los bajos niveles de eritropoyetina como por una respuesta inadecuada a la eritropoyetina en la médula ósea (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th ed.; McGraw Hill, New York, pp 628-634). Muchos factores pueden contribuir a la anemia relacionada con el cáncer. Algunos están asociados con el proceso de la enfermedad en sí y con la generación de citoquinas inflamatorias como la interleucina-1, el interferón gamma y el factor de necrosis tumoral (Bron et al., 2001, Semin Oncol 28 (Supl 8): 1-6). Entre sus efectos, la inflamación induce el péptido clave regulador de hierro hepcidina, inhibiendo así la exportación de hierro desde los macrófagos y en general limitando la disponibilidad de hierro para la eritropoyesis (Ganz, 2007, J Am Soc Nephrol 18: 394-400). La pérdida de sangre a través de varias rutas también puede contribuir a la anemia relacionada con el cáncer. La prevalencia de anemia debido a la progresión del cáncer varía según el tipo de cáncer, que varía del 5% en el cáncer de próstata hasta el 90% en el mieloma múltiple. La anemia relacionada con el cáncer tiene profundas consecuencias para los pacientes, incluida la fatiga y la reducción de la calidad de vida, la reducción de la eficacia del tratamiento y el aumento de la mortalidad.

La enfermedad renal crónica se asocia con anemia hipoproliferativa que varía en severidad con el grado de insuficiencia renal. Dicha anemia se debe principalmente a la producción inadecuada de eritropoyetina y a la reducción de la supervivencia de los glóbulos rojos. La enfermedad renal crónica generalmente avanza gradualmente durante un período de años o décadas hasta la enfermedad en etapa terminal (Etapa 5), momento en el cual se requiere diálisis o trasplante de riñón para la supervivencia del paciente. La anemia con frecuencia se desarrolla temprano en este proceso y empeora a medida que la enfermedad progresa. Las consecuencias clínicas de la anemia por enfermedad renal están bien documentadas e incluyen el desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda, función cognitiva deteriorada, calidad de vida reducida y función inmune alterada (Levin et al., 1999, Am J Kidney Dis 27: 347-354; Nissenson, 1992, Am J Kidney Dis 20(Supl. 1): 21-24; Revicki et al., 1995, Am J Kidney Dis 25: 548-554; Gafter et al., 1994, Kidney Int 45: 224-231) Como lo demostraron los solicitantes en un modelo de ratón con enfermedad renal crónica (véase el ejemplo más adelante), se puede usar un polipéptido de trampa de GDF para tratar la anemia de la enfermedad renal.

Muchas afecciones que dan como resultado una tasa hipometabólica pueden producir una anemia hipoproliferativa leve a moderada. Entre tales condiciones se encuentran los estados de deficiencia endocrina. Por ejemplo, la anemia puede ocurrir en la enfermedad de Addison, el hipotiroidismo, el hiperparatiroidismo o los hombres castrados o tratados con estrógenos. La anemia leve a moderada también puede ocurrir con una ingesta reducida de proteínas en la dieta, una condición particularmente prevalente en los ancianos. Finalmente, puede desarrollarse anemia en pacientes con enfermedad hepática crónica que surge de casi cualquier causa (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th ed.; McGraw Hill, New York, pp 628-634).

La anemia que resulta de la pérdida aguda de sangre de un volumen suficiente, como por trauma o hemorragia posparto, se conoce como anemia poshemorrágica aguda. La pérdida aguda de sangre inicialmente causa hipovolemia sin anemia, ya que hay un agotamiento proporcional de los glóbulos rojos junto con otros componentes sanguíneos. Sin embargo, la hipovolemia desencadenará rápidamente mecanismos fisiológicos que desplazan el líquido del compartimiento extravascular al vascular, lo que resulta en hemodilución y anemia. Si es crónica, la pérdida de sangre reduce gradualmente las reservas corporales de hierro y eventualmente conduce a una deficiencia de hierro. Como lo demostraron los solicitantes en un modelo de ratón (véase el ejemplo a continuación), se puede usar un polipéptido de trampa de GDF para acelerar la recuperación de la anemia por pérdida aguda de sangre.

La anemia por deficiencia de hierro es la etapa final en una progresión gradual de aumento de la deficiencia de hierro que incluye un balance negativo de hierro y una eritropoyesis deficiente en hierro como etapas intermedias. La deficiencia de hierro puede ser el resultado de una mayor demanda de hierro, una menor ingesta de hierro o una mayor pérdida de hierro, como se ejemplifica en condiciones como el embarazo, una dieta inadecuada, mala absorción intestinal, inflamación aguda o crónica y pérdida aguda de sangre o crónica. Con anemia de leve a moderada de este tipo, la médula ósea permanece hipoproliferativa y la morfología de los glóbulos rojos es en gran parte normal; sin embargo, incluso la anemia leve puede dar lugar a algunos eritrocitos hipocrómicos microcíticos, y la transición a la anemia severa por deficiencia de hierro se acompaña de hiperproliferación de la médula ósea y eritrocitos microcíticos e hipocrómicos cada vez más prevalentes (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th ed.; McGraw Hill, Nueva York, pp 628-634). La terapia adecuada para la anemia por deficiencia de

hierro depende de su causa y gravedad, con preparaciones orales de hierro, formulaciones parenterales de hierro y transfusión de glóbulos rojos como las principales opciones convencionales. Un polipéptido de trampa de GDF podría usarse para tratar anemias por deficiencia de hierro crónica solo o en combinación con enfoques terapéuticos convencionales, particularmente para tratar anemias de origen multifactorial.

Las anemias hipoproliferativas pueden ser el resultado de una disfunción primaria o falla de la médula ósea, en lugar de una disfunción secundaria a inflamación, infección o progresión del cáncer. Ejemplos prominentes serían mielosupresión causada por medicamentos quimioterapéuticos contra el cáncer o radioterapia contra el cáncer. Una amplia revisión de ensayos clínicos encontró que puede ocurrir anemia leve en el 100% de los pacientes después de la quimioterapia, mientras que puede ocurrir anemia más severa en hasta el 80% de dichos pacientes (Groopman et al., 1999, *J Natl Cancer Inst* 91: 1616-1634). Los fármacos mielosupresores incluyen: 1) agentes alquilantes tales como mostazas nitrogenadas (por ejemplo, melfalan) y nitrosoureas (por ejemplo, estreptozocina); 2) antimetabolitos tales como antagonistas del ácido fólico (por ejemplo, metotrexato), análogos de purina (por ejemplo, tioguanina) y análogos de pirimidina (por ejemplo, gemcitabina); 3) antibióticos citotóxicos tales como antraciclina (por ejemplo, doxorubicina); 4) inhibidores de la quinasa (por ejemplo, gefitinib); 5) inhibidores mitóticos tales como taxanos (por ejemplo, paclitaxel) y alcaloides de la vinca (por ejemplo, vinorelbina); 6) anticuerpos monoclonales (por ejemplo, rituximab); y 7) inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, topotecán y etopósido). Como se demostró en un modelo de ratón de anemia inducida por quimioterapia (véase el ejemplo a continuación), un polipéptido de trampa de GDF puede usarse para tratar la anemia causada por agentes quimioterapéuticos y/o radioterapia.

Los polipéptidos de trampa de GDF también serían apropiados para tratar anemias de maduración de eritrocitos desordenada, que se caracterizan en parte por eritrocitos de tamaño insuficiente (microcítico), de gran tamaño (macrocítico), deformados o anormalmente coloreados (hipocrómicos).

Los pacientes pueden ser tratados con un régimen de dosificación destinado a restaurar al paciente a un nivel objetivo de hemoglobina, generalmente entre aproximadamente 10 g/dl y aproximadamente 12.5 g/dl, y típicamente aproximadamente 11.0 g/dl (véase también Jacobs et al. (2000) *Nephrol Dial Transplant* 15, 15-19), aunque los niveles objetivo más bajos pueden causar menos efectos secundarios cardiovasculares. Alternativamente, los niveles de hematocrito (porcentaje del volumen de una muestra de sangre ocupada por las células) se pueden usar como una medida para la condición de los glóbulos rojos. Los niveles de hematocrito para individuos sanos varían de 41 a 51% para hombres adultos y de 35 a 45% para mujeres adultas. Los niveles objetivo de hematocrito generalmente son de alrededor del 30-33%. Además, los niveles de hemoglobina/hematocrito varían de persona a persona. Por lo tanto, de manera óptima, el nivel de hemoglobina/hematocrito objetivo puede individualizarse para cada paciente.

El efecto rápido sobre los niveles de glóbulos rojos de los polipéptidos de trampa de GDF descritos en este documento indica que estos agentes actúan por un mecanismo diferente al de Epo. En consecuencia, estos antagonistas pueden ser útiles para aumentar los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina en pacientes que no responden bien a la Epo. Por ejemplo, un polipéptido de trampa de GDF puede ser beneficioso para un paciente en donde la administración de una dosis normal a mayor (>300 UI/kg/semana) de Epo no da como resultado un aumento del nivel de hemoglobina hasta el nivel objetivo. Los pacientes con una respuesta Epo inadecuada se encuentran para todos los tipos de anemia, pero se ha observado un mayor número de personas que no responden, particularmente en pacientes con cánceres y pacientes con enfermedad renal en etapa terminal. Una respuesta inadecuada a Epo puede ser constitutiva (es decir, observada en el primer tratamiento con Epo) o adquirida (por ejemplo, observada en un tratamiento repetido con Epo).

Los polipéptidos de trampa de GDF también se pueden usar para tratar pacientes que son susceptibles a los efectos adversos de Epo. Los principales efectos adversos de Epo son un aumento excesivo de los niveles de hematocrito o hemoglobina y policitemia. Los niveles elevados de hematocrito pueden provocar hipertensión (más particularmente agravamiento de la hipertensión) y trombosis vascular. Otros efectos adversos de Epo que se han informado, algunos de los cuales están relacionados con la hipertensión, son dolores de cabeza, síndrome similar a la gripe, obstrucción de derivaciones, infartos de miocardio y convulsiones cerebrales debido a trombosis, encefalopatía hipertensiva y aplicación de glóbulos rojos (Singibarti, (1994) *J. Clin Investig* 72 (supl 6), S36-S43; Horl et al. (2000) *Nephrol Dial Transplant* 15 (supl 4), 51-56; Delanty et al. (1997) *Neurology* 49, 686-689 ; Bunn (2002) *N Engl J Med* 346 (7), 522-523).

Las trampas de GDF también se pueden usar en combinación con Epo y otros agentes que activan la ruta de la eritropoyetina. En algunos casos, esto puede permitir una menor dosis de cada medicamento en la combinación.

En el presente documento se divulgan métodos para controlar a un paciente que ha sido tratado con, o es un candidato para ser tratado con, un polipéptido de trampa de GDF midiendo uno o más parámetros hematológicos en el paciente. Los parámetros hematológicos se pueden usar para evaluar la dosis adecuada para un paciente que es candidato para ser tratado con un polipéptido de trampa de GDF, para monitorizar los parámetros hematológicos durante el tratamiento con un polipéptido de trampa de GDF, para evaluar si se debe ajustar la dosis durante el tratamiento con un polipéptido de trampa de GDF, y/o para evaluar una dosis de mantenimiento apropiada de un

polipéptido de trampa de GDF. Si uno o más de los parámetros hematológicos están fuera del nivel normal, la dosificación con un polipéptido de trampa de GDF puede reducirse, retrasarse o interrumpirse.

5 Los parámetros hematológicos que pueden medirse de acuerdo con los métodos proporcionados en el presente documento incluyen, por ejemplo, niveles de glóbulos rojos, presión sanguínea, depósitos de hierro y otros agentes encontrados en fluidos corporales que se correlacionan con niveles elevados de glóbulos rojos, usando el arte métodos reconocidos. Tales parámetros pueden determinarse usando una muestra de sangre de un paciente. Los aumentos en los niveles de glóbulos rojos, los niveles de hemoglobina y/o los niveles de hematocrito pueden causar aumentos en la presión arterial.

10 Si uno o más parámetros hematológicos están fuera del rango normal, o en el lado alto de lo normal, en un paciente que es candidato para ser tratado con un polipéptido de trampa de GDF, entonces puede retrasarse el inicio de la administración del polipéptido de trampa de GDF hasta que los parámetros hematológicos hayan vuelto a un nivel normal o aceptable, ya sea de forma natural o mediante intervención terapéutica. Por ejemplo, si un paciente candidato es hipertenso o prehipertenso, entonces el paciente puede ser tratado con un agente reductor de la presión arterial para reducir la presión arterial del paciente. Se puede usar cualquier agente reductor de la presión arterial apropiado para la condición del paciente individual, incluidos, por ejemplo, diuréticos, inhibidores adrenérgicos (incluidos los bloqueadores alfa y betabloqueantes), vasodilatadores, bloqueadores de los canales de calcio, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) o bloqueadores de los receptores de angiotensina II. La presión arterial puede tratarse alternativamente con una dieta y un régimen de ejercicio. De manera similar, si un paciente candidato tiene reservas de hierro que son más bajas de lo normal, o en el lado más bajo de lo normal, entonces el paciente puede ser tratado con un régimen apropiado de dieta y/o suplementos de hierro hasta que las reservas de hierro del paciente hayan vuelto a la normalidad. o nivel aceptable. Para los pacientes que tienen niveles de glóbulos rojos y/o hemoglobina más altos de lo normal, la administración del polipéptido de trampa de GDF puede retrasarse hasta que los niveles hayan regresado a un nivel normal o aceptable.

30 Si uno o más parámetros hematológicos están fuera del rango normal, o en el lado alto de lo normal, en un paciente que es candidato para ser tratado con un polipéptido de trampa de GDF, entonces el inicio de la administración puede no retrasarse. Sin embargo, la cantidad de dosificación o frecuencia de dosificación del polipéptido de trampa de GDF puede establecerse en una cantidad que reduciría el riesgo de un aumento inaceptable en los parámetros hematológicos que surgen tras la administración del polipéptido de trampa de GDF. Alternativamente, se puede desarrollar un régimen terapéutico para el paciente que combine un polipéptido de trampa de GDF con un agente terapéutico que aborde el nivel indeseable del parámetro hematológico. Por ejemplo, si el paciente tiene presión arterial elevada, entonces se puede diseñar un régimen terapéutico que implique la administración de un polipéptido de trampa de GDF y un agente reductor de la presión arterial. Para un paciente que tiene reservas de hierro inferiores a las deseadas, se puede desarrollar un régimen terapéutico de un polipéptido de trampa de GDF y suplementos de hierro.

40 Los parámetros de referencia para uno o más parámetros hematológicos pueden establecerse para un paciente que es candidato para ser tratado con un polipéptido de trampa de GDF y se establece un régimen de dosificación apropiado para ese paciente en función de los valores de referencia. Alternativamente, los parámetros de línea de base establecidos basados en el historial médico de un paciente podrían usarse para informar un régimen de dosificación de polipéptido de trampa de GDF apropiado para un paciente. Por ejemplo, si un paciente sano tiene una lectura de la presión arterial de referencia establecida que está por encima del rango normal definido, puede no ser necesario llevar la presión arterial del paciente al rango que se considera normal para la población general antes del tratamiento con la trampa de GDF polipéptido. Los valores de línea base de un paciente para uno o más parámetros hematológicos antes del tratamiento con un polipéptido de trampa de GDF también se pueden usar como los valores comparativos relevantes para monitorizar cualquier cambio en los parámetros hematológicos durante el tratamiento con el polipéptido de trampa de GDF.

55 Uno o más parámetros hematológicos pueden medirse en pacientes que están siendo tratados con un polipéptido de trampa de GDF. Los parámetros hematológicos pueden usarse para controlar al paciente durante el tratamiento y permitir el ajuste o la finalización de la dosificación con el polipéptido de trampa de GDF o la dosificación adicional con otro agente terapéutico. Por ejemplo, si la administración de un polipéptido de trampa de GDF resulta en un aumento de la presión arterial, el nivel de glóbulos rojos o el nivel de hemoglobina, o una reducción en las reservas de hierro, entonces la dosis del polipéptido de trampa de GDF puede reducirse en cantidad o frecuencia para disminuir los efectos del polipéptido de trampa de GDF en uno o más parámetros hematológicos. Si la administración o un polipéptido de trampa de GDF da como resultado un cambio en uno o más parámetros hematológicos que es adverso para el paciente, entonces la dosificación del polipéptido de trampa de GDF puede finalizar temporalmente, hasta que los parámetros hematológicos vuelvan a un nivel aceptable o permanentemente. De manera similar, si uno o más parámetros hematológicos no se encuentran dentro de un rango aceptable después de reducir la dosis o la frecuencia de administración del polipéptido de trampa de GDF, entonces la dosificación puede finalizar. Como alternativa, o además de reducir o finalizar la dosificación con el polipéptido de trampa de GDF, se puede dosificar al paciente con un agente terapéutico adicional que aborde el nivel indeseable en los parámetros hematológicos, como, por ejemplo, un agente reductor de la presión arterial o un suplemento de hierro. Por ejemplo, si un paciente

que está siendo tratado con un polipéptido de trampa de GDF tiene presión arterial elevada, entonces la dosificación con el polipéptido de trampa de GDF puede continuar al mismo nivel y se agrega un agente reductor de la presión arterial al régimen de tratamiento, dosificando con el polipéptido de trampa de GDF puede reducirse (por ejemplo, en cantidad y/o frecuencia) y se agrega un agente reductor de la presión arterial al régimen de tratamiento, o la dosificación con el polipéptido de trampa de GDF puede finalizar y el paciente puede ser tratado con un agente reductor de la presión arterial.

Los pacientes que están siendo tratados con un polipéptido de trampa de GDF, o pacientes candidatos a ser tratados con un polipéptido de trampa de GDF, pueden ser pacientes que necesitan crecimiento muscular, como pacientes que sufren o corren el riesgo de desarrollar un trastorno neuromuscular o trastorno musculogenerativo. Por ejemplo, los pacientes o pacientes candidatos pueden estar sufriendo, o en riesgo de desarrollar, la enfermedad de Lou Gehrig (ELA), el síndrome de anorexia-caquexia por cáncer, distrofia muscular, atrofia muscular, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva (y desgaste muscular asociado con EPOC), síndrome de desgaste muscular, sarcopenia o caquexia. La distrofia muscular se refiere a un grupo de enfermedades musculares degenerativas caracterizadas por el debilitamiento gradual y el deterioro de los músculos esqueléticos y, a veces, los músculos cardíacos y respiratorios. Las distrofias musculares de ejemplo que pueden tratarse con un régimen que incluye los polipéptidos de trampa de GDF sujeto incluyen: distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker (BMD), distrofia muscular de Emery-Dreifuss (EDMD), distrofia muscular de la cintura y extremidades (LGMD), distrofia muscular facioescapulohumeral (FSH o FSHD) (también conocida como Landouzy-Dejerine), distrofia miotónica (MMD) (también conocida como enfermedad de Steinert), distrofia muscular oculofaríngea (OPMD), distrofia muscular distal (DD), distrofia muscular congénita (CMD)

6. Composiciones farmacéuticas

En un aspecto de la invención, los compuestos (por ejemplo, polipéptidos de trampa de GDF) de la presente invención se formulan con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, un polipéptido de trampa de GDF puede administrarse solo o como un componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Los compuestos en cuestión pueden formularse para administración de cualquier manera conveniente para uso en medicina humana o veterinaria.

El método terapéutico puede incluir administrar la composición sistémicamente o localmente como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica de la invención está, por supuesto, en una forma fisiológicamente aceptable, libre de pirógenos. Los agentes terapéuticamente útiles distintos de los polipéptidos de trampa de GDF que también pueden incluirse opcionalmente en la composición como se describe anteriormente, pueden administrarse simultánea o secuencialmente con los compuestos objeto (por ejemplo, polipéptidos de trampa de GDF) de la divulgación.

Típicamente, los compuestos se administrarán por vía parenteral. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden comprender uno o más polipéptidos de trampa de GDF en combinación con una o más soluciones isotónicas acuosas o no acuosas estériles farmacéuticamente aceptables, dispersiones, suspensiones o emulsiones, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes para usar, que puede contener antioxidantes, reguladores, bacteriostatos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes. Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención 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, como el oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Además, la composición puede encapsularse o inyectarse en una forma para suministro a un sitio de tejido diana (por ejemplo, médula ósea). Las composiciones de la presente invención pueden incluir una matriz capaz de administrar uno o más compuestos terapéuticos (por ejemplo, polipéptidos de trampa de GDF) a un sitio de tejido diana (por ejemplo, médula ósea), proporcionando una estructura para el tejido en desarrollo y óptimamente capaz de ser reabsorbido en el cuerpo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar una liberación lenta de los polipéptidos de trampa de GDF. Dichas matrices pueden estar formadas por materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.

La elección del material de matriz se basa en la biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, apariencia cosmética y propiedades de interfaz. La aplicación particular de las composiciones objeto definirá la formulación apropiada. Las posibles matrices para las composiciones pueden ser sulfato de calcio, fosfato de tricalcio, hidroxapatita, ácido poliláctico y polianhídridos biodegradables y químicamente definidos. Otros materiales potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, como hueso o colágeno dérmico. Las matrices adicionales están compuestas de proteínas puras o componentes de la matriz extracelular. Otras posibles matrices no son biodegradables y están químicamente definidas, como hidroxapatita sinterizada, biocristal, aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden estar compuestas de combinaciones de cualquiera de los tipos de material

mencionados anteriormente, tales como ácido poliláctico e hidroxiapatita o colágeno y fosfato de tricalcio. La biocerámica puede alterarse en composición, como en aluminato fosfato de calcio y el procesamiento para alterar el tamaño de poro, el tamaño de partícula, la forma de partícula y la biodegradabilidad.

5 Las composiciones de la invención pueden administrarse por vía oral, por ejemplo, en forma de cápsulas, obleas, píldoras, tabletas, pastillas (usando una base saborizada, generalmente sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia) y/o como enjuagues bucales y similares, cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada de un agente como ingrediente activo. Un agente también se puede administrar como un bolo, electuario o pasta.

15 En formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, tabletas, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), uno o más compuestos terapéuticos de la presente invención se pueden mezclar con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes: (1) rellenos o extendedores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, 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, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardadores de la solución, tales como parafina; (6) aceleradores de absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, tabletas y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes reguladores.

25 Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina blandas y duras utilizando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

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

40 Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión tales como alcoholes de isosteárido, polioxietileno sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y sus mezclas.

45 Las composiciones de la invención también pueden contener 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, parabeno, clorobutanol, ácido fenólico sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

50 Se entiende que el régimen de dosificación será determinado por el médico tratante considerando diversos factores que modifican la acción de los compuestos objeto de la invención (por ejemplo, polipéptidos de trampa de GDF). Los diversos factores incluyen, entre otros, el recuento de glóbulos rojos del paciente, el nivel de hemoglobina u otras evaluaciones de diagnóstico, el recuento deseado de glóbulos rojos, la edad, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de cualquier enfermedad que pueda ser contribuyendo a un nivel deprimido de glóbulos rojos, tiempo de administración y otros factores clínicos. La adición de otros factores de crecimiento conocidos a la composición final también puede afectar la dosificación. El progreso se puede monitorizar mediante la evaluación periódica de los niveles de hemoglobina y glóbulos rojos, así como las evaluaciones de los niveles de reticulocitos y otros indicadores del proceso hematopoyético.

60 En este documento se divulga la terapia génica para la producción in vivo de polipéptidos de trampa de GDF. Dicha terapia lograría su efecto terapéutico mediante la introducción de las secuencias de polinucleótidos de la trampa de GDF en células o tejidos que tienen los trastornos enumerados anteriormente. El suministro de secuencias de polinucleótidos de trampa de GDF se puede lograr usando un vector de expresión recombinante tal como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. El uso de liposomas dirigidos es el preferido para la administración terapéutica de secuencias de polinucleótidos de trampa de GDF.

Diversos vectores virales que se pueden utilizar para la terapia génica como se enseña en el presente documento incluyen adenovirus, virus del herpes, vaccinia o un virus de ARN tal como un retrovirus. El vector retroviral puede ser un derivado de un retrovirus murino o aviar. Ejemplos de vectores retrovirales en los que se puede insertar un solo gen extraño incluyen, entre otros: el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), el virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), el virus del tumor mamario murino (MuMTV) y el virus del sarcoma de Rous (RSV). Varios vectores retrovirales adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable para que las células transducidas puedan identificarse y generarse. Los vectores retrovirales pueden hacerse específicos para el objetivo uniendo, por ejemplo, un azúcar, un glicolípido o una proteína. La orientación preferida se logra mediante el uso de un anticuerpo. Los expertos en la materia reconocerán que las secuencias de polinucleótidos específicos pueden insertarse en el genoma retroviral o unirse a una envoltura viral para permitir la entrega específica al blanco del vector retroviral que contiene el polinucleótido de trampa de GDF.

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

Otro sistema de suministro dirigido para polinucleótidos de trampa de GDF es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. El sistema coloidal preferido es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificial que son útiles como vehículos de administración in vitro e in vivo. El ARN, el ADN y los viriones intactos pueden encapsularse dentro del interior acuoso y entregarse a las células en una forma biológicamente activa (véase, por ejemplo, Fraley et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Los métodos para la transferencia eficiente de genes usando un vehículo de liposomas son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Mannino, et al., Biotechniques, 6: 682, 1988. La composición del liposoma suele ser una combinación de fosfolípidos, generalmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También se pueden usar otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

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

Ejemplificación

La invención, que ahora se describe de manera general, se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen simplemente con fines ilustrativos de ciertas realizaciones de la presente invención, y no pretenden limitar la invención.

Ejemplo 1. Generación de una trampa de GDF.

Los solicitantes construyeron una trampa de GDF de la siguiente manera. Un polipéptido que tiene un dominio extracelular modificado de ActRIIB con una unión de activina A muy reducida en relación con GDF11 y/o miostatina (como consecuencia de una sustitución de leucina a aspartato en la posición 79 en la SEQ ID NO: 1) se fusionó a un dominio Fc humano o de ratón con un enlazador mínimo (tres aminoácidos de glicina) en el medio. Los constructos se denominan ActRIIB (L79D 20-134)-hFc y ActRIIB (L79D 20-134)-mFc, respectivamente. Las formas alternativas con un glutamato en lugar de un aspartato en la posición 79 se realizaron de manera similar (L79E). Las formas alternativas con una alanina en lugar de una valina en la posición 226 con respecto a la SEQ ID NO: 7, a continuación, también se generaron y se realizaron de manera equivalente en todos los aspectos probados. El aspartato en la posición 79 (en relación con la SEQ ID NO: 1, o la posición 60 en relación con la SEQ ID NO: 7) se resalta en gris a continuación. La valina en la posición 226 con respecto a la SEQ ID NO: 7 también se resalta en gris a continuación.

La trampa de GDF ActRIIB (L79D 20-134)-hFc se muestra a continuación tal como fue purificada de las líneas celulares CHO (SEQ ID NO: 7).

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
GCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPT
APTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

5 La porción derivada de ActRIIB de la trampa de GDF tiene una secuencia de aminoácidos establecida a continuación (SEQ ID NO: 32), y esa porción podría usarse como un monómero o como una proteína de fusión no Fc como un monómero, dímero o complejo de orden mayor.

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIE
LVKKGCVDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYE
PPPTAPT (SEQ ID NO: 32)

10 La proteína de trampa de GDF se expresó en líneas celulares CHO. Se consideraron tres secuencias líderes diferentes:

- (i) Melitina de abeja melífera (HBML): MKFLVNVLFVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 8)
- 15 (ii) Activador de plasminógeno tisular (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 9)
- (iii) Nativo: MTAPWVALALLWGS LCAGS (SEQ ID NO: 10).

La forma seleccionada emplea el líder TPA y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos sin procesar:

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCE
GEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCVDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE
GNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11)

20 Este polipéptido es codificado por la siguiente secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO: 12):

A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA GTCTTCGTTT
 CGCCCGGCGC CTCTGGGCGT GGGGAGGCTG AGACACGGGA GTGCATCTAC TACAACGCCA
 ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACCAGAGCG GCCTGGAGCG CTGCCAAGGC GAGCAGGACA
 AGCGGCTGCA CTGCTACGCC TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA
 AGGGCTGCTG GGACGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG
 AGAACCCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG CGCTTCACTC
 ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC ACCCCCGACA GCCCCCACCG
 GTGGTGGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG
 TCTTCCTCTT CCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
 CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG
 ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT
 ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
 AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG TCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA
 AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA
 AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG

 AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT
 CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TATAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
 GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA
 GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

- 5 La purificación se puede lograr mediante una serie de etapas de cromatografía en columna, que incluyen, por ejemplo, tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía en Q sefarosa, cromatografía de fenilsefarosa, cromatografía de exclusión de tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación podría completarse con filtración viral e intercambio de regulador. En un ejemplo de un esquema de purificación, el medio de cultivo celular se pasa a través de una columna de proteína A, se lava en Tris/NaCl 150 mM (pH 8.0), luego se lava en Tris/NaCl 50 mM (pH 8.0) y se eluye con glicina 0.1 M, pH 3.0. El eluato de pH bajo se mantiene a temperatura ambiente durante 30 minutos como un paso de eliminación viral. El eluato se neutraliza y se pasa sobre una columna de intercambio iónico Q sefarosa y se lava en Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 50 mM, y se eluye en Tris 50 mM pH 8.0, con una concentración de NaCl entre 150 mM y 300 mM. El eluato se cambia luego a Tris 50 mM pH 8.0, sulfato de amonio 1.1 M y se pasa sobre una columna de fenilsefarosa, se lava y se eluye en Tris 50 mM pH 8.0 con sulfato de amonio entre 150 y 300 mM. El eluato se dializa y se filtra para su uso.

Trampas de GDF adicionales (proteínas de fusión ActRIIB-Fc modificadas para reducir la relación de unión a activina A con respecto a miostatina o GDF11) se describen en

- 20 PCT/US2008/001506 y WO 2006/012627.

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

- 25 Se usó un ensayo de gen informador A-204 para evaluar los efectos de las proteínas ActRIIB-Fc y las trampas de GDF sobre la señalización por GDF-11 y Activina A. Línea celular: Rabdomiosarcoma humano (derivado de músculo). Vector informador: pGL3(CAGA)12 (Descrito en Dennler et al, 1998, EMBO 17: 3091-3100). El motivo CAGA12 está presente en los genes sensibles a TGF-Beta (gen PAI-1), por lo que este vector es de uso general para los factores de señalización a través de Smad2 y 3.

- 30 Día 1: Dividir las células A-204 en una placa de 48 pozos.

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

- 35 Día 3: Agregar factores (diluidos en medio + 0.1% BSA). Los inhibidores deben preincubarse con factores durante 1 hora antes de agregarlos a las células. 6 horas más tarde, las células se enjuagan con PBS y las células se someten a lisis.

- 40 Esto es seguido por un ensayo de luciferasa. En ausencia de inhibidores, la Activina A mostró una estimulación 10 veces mayor de la expresión del gen informador y una ED50 ~ 2 ng/ml. GDF-11: estimulación 16 veces, ED50: ~ 1.5 ng/ml.

ActRIIB (20-134) es un potente inhibidor de la actividad activina, GDF-8 y GDF-11 en este ensayo. Las variantes también se probaron en este ensayo.

Ejemplo 3. Inhibición de GDF-11 por truncamientos N-terminal y C-terminal

5 Se generaron variantes de ActRIIB (20-134)-hFc con truncamientos en el extremo N-terminal y/o C-terminal y se probó su actividad como inhibidores de GDF-11 y activina. Las actividades se muestran a continuación (medidas en medios condicionados):

10 Truncamientos ActRIIB-hFc C-terminal:

	IC50 (ng/mL)	
	GDF-11	Activina
ActRIIB(20-134)-hFc	45	22
ActRIIB(20-132)-hFc	87	32
ActRIIB(20-131)-hFc	120	44
ActRIIB(20-128)-hFc	130	158

15 Como se puede ver, los truncamientos de tres (terminando con ... PPT), seis (terminando con ... YEP) o más aminoácidos en el C-terminal causan una disminución triple o mayor en la actividad de la molécula. El truncamiento de los 15 aminoácidos finales de la porción ActRIIB causa una mayor pérdida de actividad (véase el documento WO2006/012627).

20 Se hicieron truncamientos amino terminales en el fondo de una proteína ActRIIB(20-131)-hFc. Las actividades se muestran a continuación (medidas en medios condicionados):

Truncamientos de ActRIIB-hFc N-terminal:

	IC50 (ng/mL)	
	GDF-11	Activina
ActRIIB(20-131)-hFc (GRG...)	183	201
ActRIIB(21-131)-hFc (RGE...)	121	325
ActRIIB(22-131)-hFc (GEA...)	71	100
ActRIIB(23-131)-hFc (EAE...)	60	43
ActRIIB(24-131)-hFc (AET...)	69	105

25 De acuerdo con lo anterior, los truncamientos de dos, tres o cuatro aminoácidos del extremo N conducen a la producción de una proteína más activa que las versiones con un dominio extracelular de longitud completa. Experimentos adicionales muestran que un truncamiento de cinco aminoácidos, ActRIIB (25-131)-hFc tiene una actividad equivalente a la forma no truncada, y las eliminaciones adicionales en el extremo N continúan degradando la actividad de la proteína. Por lo tanto, los constructos óptimos tendrán un terminal C que termina entre el aminoácido 133-134 de la SEQ ID NO: 1 y un terminal N que comienza en los aminoácidos 22-24 de la SEQ ID NO: 1. Un terminal N correspondiente a los aminoácidos 21 o 25 dará una actividad similar al constructo ActRIIB (20-134)-hFc. Estos truncamientos también se pueden usar en el contexto de trampas de GDF, como una variante L79D o L79E.

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

La actividad de las proteínas ActRIIB-Fc y las trampas de GDF se probó en un ensayo basado en células, como se describió anteriormente. Los resultados se resumen en la tabla a continuación. Algunas variantes se probaron en diferentes constructos de truncamiento C-terminal. Como se discutió anteriormente, los truncamientos de cinco o quince aminoácidos causaron una reducción en la actividad. Las trampas de GDF (variantes L79D y L79E) mostraron una pérdida sustancial de la unión de activina mientras conservaban una inhibición casi salvaje de GDF-11.

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

Variaciones ActRIIB-Fc	Porción de ActRIIB (corresponde a los aminoácidos de SEQ ID NO: 1)	Actividad de inhibición de GDF11	Actividad de inhibición de activina
R64	20-134	+++ (aprox. 10^{-8} M K_i)	+++ (aprox. 10^{-8} M K_i)
A64	20-134	+ (aprox. 10^{-6} M K_i)	+ (aprox. 10^{-6} M K_i)
R64	20-129	+++	+++
R64 K74A	20-134	++++	++++
R64 A24N	20-134	+++	+++
R64 A24N	20-119	++	++
R64A24NK74A	20-119	+	+
R64L79P	20-134	+	+
R64L79PK74A	20-134	+	+
R64L79D	20-134	+++	+
R64 L79E	20-134	+++	+
R64K	20-134	+++	+++
R64K	20-129	+++	+++
R64 P129S P130A	20-134	+++	+++
R64N	20-134	+	+

+ Actividad pobre (aproximadamente 1×10^{-6} K_i)
 ++ Actividad moderada (aproximadamente 1×10^{-7} K_i)
 +++ Actividad buena (tipo salvaje) (aproximadamente 1×10^{-8} K_i)
 ++++ Mayor que la actividad de tipo salvaje

5 Se han evaluado varias variantes para la vida media en suero en ratas. ActRIIB (20-134)-Fc tiene una vida media en suero de aproximadamente 70 horas. ActRIIB (A24N 20-134)-Fc tiene una vida media en suero de aproximadamente 100-150 horas. La variante A24N tiene actividad en el ensayo basado en células (arriba) y en los ensayos in vivo (abajo) que son equivalentes a la molécula de tipo salvaje. Junto con la vida media más larga, esto significa que con el tiempo una variante A24N dará un mayor efecto por unidad de proteína que la molécula de tipo salvaje. La variante A24N, y cualquiera de las otras variantes probadas anteriormente, se pueden combinar con las moléculas de trampa de GDF, como las variantes L79D o L79E.

10 Ejemplo 5. Unión de GDF-11 y activina A

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

15 Las variantes de ActRIIB-Fc o la proteína de tipo salvaje se capturaron en el sistema usando un anticuerpo anti-hFc. Se inyectaron ligandos y se hicieron fluir sobre las proteínas receptoras capturadas. Los resultados se resumen en las tablas a continuación.

Variantes IIB con especificidad de unión a ligando

Proteína	GDF11		
	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	1.34e-6	1.13e-4	8.42e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	1.21e-6	6.35e-5	5.19e-11
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	6.7e-5	4.39e-4	6.55e-10
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3.8e-5	2.74e-4	7.16e-10
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6.77e-5	2.41e-5	3.56e-11

(continuación)

Proteína	GDF8		
	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	3.69e-5	3.45e-5	9.35e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc			
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	3.85e-5	8.3e-4	2.15e-9
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3.74e-5	9e-4	2.41e-9
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	2.25e-5	4.71e-5	2.1e-10
ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	9.74e-4	2.09e-4	2.15e-9
ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	1.08e-5	1.8e-4	1.67e-9
ActRIIB(K74A 20-134)-hFc	2.8e-5	2.03e-5	7.18e-11
Proteína	Activina A		
	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB(20-134)-hFc	5.94e6	1.59e-4	2.68e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	3.34e6	3.46e-4	1.04e-10
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc			Unión baja
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc			Unión baja
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6.82e6	3.25e-4	4.76e-11
ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	7.46e6	6.28e-4	8.41e-11
ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	5.02e6	4.17e-4	8.31e-11

5 Estos datos confirman los datos del ensayo basado en células, lo que demuestra que la variante A24N retiene la actividad de unión al ligando que es similar a la de la molécula ActRIIB (20-134)-hFc, y que la molécula L79D o L79E retiene miostatina y unión a GDF11, pero muestra unión marcadamente disminuida (no cuantificable) a Activina A.

10 Se han generado y probado otras variantes, como se informa en WO2006/012627, véase, por ejemplo, págs. 59-60, usando ligandos acoplados al dispositivo y receptor de flujo sobre los ligandos acoplados. En particular, K74Y, K74F, K74I (y presumiblemente otras sustituciones hidrófobas en K74, como K74L) y D80I, causan una disminución en la proporción de unión de Activina A a GDF11, en relación con la molécula K74 de tipo salvaje. A continuación, se reproduce una tabla de datos con respecto a estas variantes:

Variantes solubles de ActRIIB-Fc que se unen a GDF11 y Activina A (ensayo BiaCore)

ActRIIB	ActA	GDF11
WT (64A)	KD=1.8e-7M (+)	KD= 2.6e-7M (+)
WT (64R)	na	KD= 8.6e-8M (+++)
+15 cola	KD ~2.6 e-8M (+++)	KD= 1.9e-8M (++++)
E37A	*	*
R40A	-	-
D54A	-	*
K55A	++	*

(continuación)

ActRIIB	ActA	GDF11
R56A	*	*
K74A	KD=4.35e-9 M	KD=5.3e-9M
K74Y	*	-
K74F	*	-
K74I	*	-
W78A	*	*
L79A	+	*
D80K	*	*
D80R	*	*
D80A	*	*
D80F	*	*
D80G	*	*
D80M	*	*
D80N	*	*
D80I	*	-
F82A	++	-
* Sin unión observada - unión <1/5 WT - unión ~1/2 enlace WT + WT ++ <2x unión incrementada +++ ~5x unión incrementada ++++ ~10x unión incrementada +++++ ~ 40x unión incrementada		

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

- 5 Se administró ActRIIB (20-134)-hFc (IgG1) una vez por semana durante 1 mes a monos cynomolgus macho y hembra mediante inyección subcutánea. Cuarenta y ocho monos cynomolgus (24/sexo) fueron asignados a uno de los cuatro grupos de tratamiento (6 animales/sexo/grupo) y se les administraron inyecciones subcutáneas de vehículo o ActRIIB-hFc a 3, 10 o 30 mg/kg una vez por semana durante 4 semanas (total de 5 dosis). Los parámetros evaluados incluyeron patología clínica general (hematología, química clínica, coagulación y análisis de orina). ActRIIB-hFc causó valores medios de reticulocitos absolutos elevados estadísticamente significativos para el día 15 en animales tratados. Para el día 36, ActRIIB-hFc causó varios cambios hematológicos, que incluyeron valores medios de distribución de glóbulos rojos y reticulocitos absolutos elevados y una concentración de hemoglobina corpuscular media más baja. Todos los grupos tratados y ambos sexos fueron afectados. Estos efectos son consistentes con un efecto positivo de ActRIIB-hFc en la liberación de reticulocitos inmaduros de la médula ósea. Este efecto se revirtió después de eliminar el fármaco de los animales tratados (en el día de estudio 56). En consecuencia, se concluye que ActRIIB-hFc estimula la eritropoyesis.

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

- 20 En este estudio, se analizaron los efectos de la administración in vivo de ActRIIB (20-134)-mFc sobre la frecuencia de los progenitores hematopoyéticos en la médula ósea y el bazo. Un grupo de ratones C57BL/6 se inyectó con PBS como control y un segundo grupo de ratones administró dos dosis de ActRIIB-mFc a 10 mg/kg y ambos grupos se sacrificaron después de 8 días. Se usó sangre periférica para realizar recuentos sanguíneos completos y se usaron fémures y bazos para realizar ensayos clonogénicos in vitro para evaluar el contenido de células progenitoras linfoides, eritroides y mieloides en cada órgano. En el breve período de tiempo de este estudio, no se observaron cambios significativos en los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina o glóbulos blancos en ratones tratados. En los fémures no hubo diferencia en los números de células nucleadas o el contenido progenitor entre los grupos control y

tratado. En los bazos, el grupo tratado con compuesto experimentó un aumento estadísticamente significativo en el número de colonias de progenitores eritroides maduros (UFC-E) por placa, frecuencia y número total de progenitores por bazo. Además, se observó un aumento en el número de mieloides (CFU-GM), eritroides inmaduros (BFU-E) y el número total de progenitores por bazo.

5

Animales:

Se utilizaron 16 ratones hembra C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad en el estudio. Ocho ratones fueron inyectados por vía subcutánea con el compuesto de prueba ActRIIB-mFc en los días 1 y 3 a una dosis de 10 mg/kg y ocho ratones fueron inyectados por vía subcutánea con control de vehículo, solución salina regulada con fosfato (PBS), a un volumen de 100 μ L por ratón. Todos los ratones fueron sacrificados 8 días después de la primera inyección de acuerdo con las Animal Care Guidelines relevantes. Se recolectaron muestras de sangre periférica (PB) de animales individuales mediante punción cardíaca y se usaron para recuentos sanguíneos completos y diferenciales (CBC/Diff). Se recolectaron fémures y bazos de cada ratón.

10

15

Pruebas realizadas:

Recuentos CBC/Diff

20

Se recolectó PB de cada ratón mediante punción cardíaca y se colocó en los tubos Microtainer apropiados. Las muestras se enviaron a CLV para su análisis en un contador CellDyn 3500.

Ensayos clonogénicos

25

Los progenitores clonogénicos de los linajes mieloides, eritroides y linfoides se evaluaron usando los sistemas de medios basados en metilcelulosa in vitro descritos a continuación.

Progenitores eritroides maduros:

30

Los progenitores clonogénicos de los linajes eritroides maduros (CFU-E) se cultivaron en MethoCultTM 3334, un medio basado en metilcelulosa que contiene eritropoyetina humana (rh) recombinante (3 U/mL).

Progenitores Linfoides:

35

Los progenitores clonogénicos del linaje linfoide (CFU-pre-B) se cultivaron en MethoCult[®] 3630, un medio basado en metilcelulosa que contiene rh Interleucina-7 (10 ng/mL).

Progenitores eritroides mieloides e inmaduros:

40

Los progenitores clonogénicos de los linajes de granulocitos-monocitos (CFU-GM), eritroides (BFU-E) y multipotenciales (CFU-GEMM) se cultivaron en MethoCultTM 3434, un medio basado en metilcelulosa que contiene factor de células madre murino (rm) recombinante (50 ng/ml), rh Interleucina 6 (10 ng/mL), rm Interleucina 3 (10 ng/mL) y rh eritropoyetina (3 U/mL).

45

Métodos:

Los fémures y bazos de ratón se procesaron mediante protocolos estándar. En resumen, se obtuvo médula ósea enjuagando la cavidad femoral con medio Dulbecco modificado de Iscove que contenía suero bovino fetal al 2% (IMDM 2% FBS) usando una aguja de calibre 21 y una jeringa de 1 cc. Las células de bazo se obtuvieron triturando bazos a través de un filtro de 70 μ m y enjuagando el filtro con IMDM 2% de FBS. Los recuentos de células nucleadas en ácido acético glacial al 3% se realizaron sobre las suspensiones de células individuales usando una cámara de recuento de Neubauer para poder calcular el total de células por órgano. Para eliminar los glóbulos rojos contaminantes, las células del bazo total se diluyeron con 3 veces el volumen de regulador de lisis de cloruro de amonio y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Las células se lavaron y se volvieron a suspender en IMDM FBS al 2% y se realizó un segundo recuento celular para determinar la concentración celular de las células después de la lisis.

50

55

Se hicieron preparaciones madre de células y se añadieron a cada formulación de medios basados en metilcelulosa para obtener las concentraciones óptimas de recubrimiento para cada tejido en cada formulación de medios. Las células de la médula ósea se colocaron en placas a 1×10^5 células por placa en MethoCultTM 3334 para evaluar los progenitores eritroides maduros, 2×10^5 células por placa en MethoCultTM 3630 para evaluar los progenitores linfoides y 3×10^4 células por placa en MethoCultTM 3434 para evaluar los progenitores eritroides y mieloides inmaduros. Las células de bazo se colocaron en placas a 4×10^5 células por placa en MethoCultTM 3334 para evaluar los progenitores eritroides maduros, 4×10^5 células por placa en MethoCultTM 3630 para evaluar los progenitores linfoides y 2×10^5 células por placa en MethoCultTM 3434 para evaluar los progenitores eritroides y mieloides inmaduros. Los cultivos en placas por triplicado se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ hasta que el personal

60

65

capacitado realizó la enumeración y evaluación de colonias. Los progenitores eritroides maduros se cultivaron durante 2 días, los progenitores linfoides se cultivaron durante 7 días y los progenitores eritroides y mieloides maduros se cultivaron durante 12 días.

5 Análisis:

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

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

Células sembradas por placa

CFC medio puntuado por placa

15

El CFC total por fémur o bazo se calculó de la siguiente manera:

CFC total puntuado x recuento de células nucleadas por fémur o bazo (después de la lisis de glóbulos rojos)

20 Número de células nucleadas cultivadas

Se realizaron pruebas t estándar para evaluar si había diferencias en el número medio de células o progenitores hematopoyéticos entre los ratones de control PBS y los ratones tratados con compuesto. Debido a la subjetividad potencial de la enumeración de colonias, un valor p menor que 0.01 se considera significativo. Los valores medios (+/- SD) para cada grupo se muestran en las tablas a continuación.

25

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)	9.53 +/- 1.44	10.5 +/- 1.1	160.9 +/- 13.3	0.552 +/- 0.057
ActRIIB-mFc (n=8)	9.77 +/- 1.19	10.8 +/- 0.3	162.1 +/- 4.1	0.567 +/- 0.019

Tabla: CFC de fémur y bazo

Grupo de tratamiento	CFC total por fémur	CFC total por bazo	CFU-E total por fémur	CFU-E total por bazo
PBS (n=8)	88 +/- 10	54 +/- 14	156 +/- 27	131 +/- 71
ActRIIB-mFc (n=8)	85 +/- 9	79 +/- 6*	164 +/- 23	436 +/- 86*

* el análisis preliminar indica p<0.05

30

El tratamiento de ratones con ActRIIB (20-134)-mFc, en el breve período de tiempo de este estudio, no dio lugar a aumentos significativos en el contenido de hemoglobina o glóbulos rojos. Sin embargo, el efecto sobre el contenido de células progenitoras fue notable. En los fémures no hubo diferencia en los números de células nucleadas o el contenido progenitor entre los grupos control y tratado. En los bazos, el grupo tratado con compuesto experimentó un aumento estadísticamente significativo en el 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, frecuencia y número total de progenitores por bazo. Además, se observó un aumento en el número de mieloides (CFU-GM), eritroides inmaduros (BFU-E) y el número total de progenitores por bazo. Por consiguiente, se espera que, durante un curso de tiempo más largo, el tratamiento con ActRIIB (20-134)-mFc pueda dar como resultado un contenido elevado de glóbulos rojos y hemoglobina.

35

40

Ejemplo 8: Una trampa de GDF aumenta los niveles de glóbulos rojos in vivo

45

Se asignaron ratones machos C57BL/6NTac de doce semanas de edad a uno de los dos grupos de tratamiento (N=10). Los ratones fueron dosificados con cualquier vehículo o con un polipéptido ActRIIB variante ("Trampa de GDF") [ActRIIB (L79D 20-134)-hFc] por inyección subcutánea (SC) a 10 mg/kg dos veces por semana durante 4 semanas. Al finalizar el estudio, se recolectó sangre completa por punción cardíaca en tubos que contenían EDTA y se analizó la distribución celular usando un analizador de hematología HM2 (Abaxis, Inc).

50 Designación de grupo

--	--	--	--	--	--

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

El tratamiento con la trampa de GDF no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre el número de glóbulos blancos (WBC) en comparación con los controles del vehículo. Los números de glóbulos rojos (RBC) aumentaron en el grupo tratado en relación con los controles (véase tabla a continuación). Tanto el contenido de hemoglobina (HGB) como el hematocrito (HCT) también aumentaron debido a los glóbulos rojos adicionales. El ancho promedio de los glóbulos rojos (RDWc) fue mayor en los animales tratados, lo que indica un aumento en el conjunto de glóbulos rojos inmaduros. Por lo tanto, el tratamiento con la trampa de GDF conduce a aumentos en los glóbulos rojos, sin efectos distinguibles en las poblaciones de glóbulos blancos.

10 Resultados de hematología

	RBC $10^{12}/L$	HGB (g/dL)	HCT (%)	RDWc (%)
PBS	10.7 ± 0.1	14.8 ± 0.6	44.8 ± 0.4	17.0 ± 0.1
Trampa de GDF	$12.4 \pm 0.4^{**}$	$17.0 \pm 0.7^*$	$48.8 \pm 1.8^*$	$18.4 \pm 0.2^{**}$
*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$				

Ejemplo 9: Una trampa de GDF es superior a ActRIIB-Fc para aumentar los niveles de glóbulos rojos in vivo.

15 Se asignaron aleatoriamente ratones C57BL/6NTac machos de diecinueve semanas a uno de tres grupos. Los ratones se dosificaron con vehículo (solución salina regulada con Tris 10 mM, TBS), ActRIIB(20-134)-mFc de tipo salvaje o trampa de GDF ActRIIB(L79D 20-134)-hFc mediante inyección subcutánea dos veces por semana durante tres semanas. Se recolectó sangre de sangrado en las mejillas en la línea base y después de tres semanas de dosificación y se analizó la distribución celular usando un analizador de hematología (HM2, Abaxis, Inc.).

20 El tratamiento con ActRIIB-Fc o la trampa de GDF no tuvo un efecto significativo sobre los números de glóbulos blancos (WBC) en comparación con los controles del vehículo. El recuento de glóbulos rojos (RBC), el hematocrito (HCT) y los niveles de hemoglobina fueron todos elevados en ratones tratados con trampa de GDF en comparación con los controles o el constructo de tipo salvaje (véase tabla a continuación). Por lo tanto, en una comparación directa, la trampa de GDF promueve aumentos en los glóbulos rojos en un grado significativamente mayor que una proteína ActRIIB-Fc de tipo salvaje. De hecho, en este experimento, la proteína ActRIIB-Fc de tipo salvaje no causó un aumento estadísticamente significativo en los glóbulos rojos, lo que sugiere que se necesitaría una dosis más larga o más alta para revelar este efecto.

30 Resultados hematológicos después de tres semanas de dosificación

	RBC ($10^{12}/ml$)	HCT %	HGB g/dL
TBS	11.06 ± 0.46	46.78 ± 1.9	15.7 ± 0.7
ActRIIB-mFc	11.64 ± 0.09	49.03 ± 0.3	16.5 ± 1.5
GDF Trap	$13.19 \pm 0.2^{**}$	$53.04 \pm 0.8^{**}$	$18.4 \pm 0.3^{**}$
**= $p < 0.01$			

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

35 Como se describe en el Ejemplo 1, se generó una trampa de GDF denominada ActRIIB(L79D 20-134)-hFc por fusión N-terminal de TPA guía con el dominio extracelular de ActRIIB (residuos 20-134 en la SEQ ID NO: 1) que contiene una sustitución de leucina a aspartato (en el residuo 79 en SEQ ID NO: 1) y fusión C-terminal del dominio Fc humano con un conector mínimo (tres residuos de glicina) (Figura 3). Una secuencia de nucleótidos correspondiente a esta proteína de fusión se muestra en la Figura 4.

40 Se generó una trampa de GDF con dominio extracelular ActRIIB truncado, denominado ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, por fusión N-terminal de TPA guía con dominio extracelular truncado (residuos 25-131 en SEQ ID NO: 1) que contiene una sustitución de leucina a aspartato (en el residuo 79 en SEQ ID NO: 1) y fusión C-terminal del dominio Fc humano con un conector mínimo (tres residuos de glicina) (Figura 5). Una secuencia de nucleótidos correspondiente a esta proteína de fusión se muestra en la Figura 6.

45

Ejemplo 11. Unión de ligando selectivo por trampa de GDF con dominio extracelular ActRIIB doblemente truncado

La afinidad de las trampas de GDF y otras proteínas ActRIIB-hFc por varios ligandos se evaluó in vitro con un instrumento Biacore™. Los resultados se resumen en la tabla a continuación. Los valores de Kd se obtuvieron por ajuste de afinidad en estado estacionario debido a la asociación y disociación muy rápidas del complejo, lo que impidió la determinación precisa de K_{activación} y K_{desactivación}.

Selectividad de ligando de variantes de ActRIIB-hFc:

Constructo de fusión	Activina A (Kd e-11)	Activina B (Kd e-11)	GDF11 (Kd e-11)
ActRIIB(L79 20-134)-hFc	1.6	1.2	3.6
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	1350.0	78.8	12.3
ActRIIB(L79 25-13 1)-hFc	1.8	1.2	3.1
ActRIIB(L79D 25-13 1)-hFc	2290.0	62.1	7.4

La trampa de GDF con un dominio extracelular truncado, ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, igualó o superó la selectividad del ligando mostrada por la variante más larga, ActRIIB(L79D 20-134)-hFc, con pérdida pronunciada de unión a activina A y activina B y la retención casi completa de la unión a GDF11 en comparación con sus equivalentes ActRIIB-hFc que carecen de la sustitución L79D. Nótese que el truncamiento solo (sin sustitución de L79D) no alteró la selectividad entre los ligandos que se muestran aquí [compárese ActRIIB(L79 25-131)-hFc con ActRIIB(L79 20-134)-hFc].

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

Para generar ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, el dominio extracelular ActRIIB humano con una sustitución de aspartato en la posición 79 nativa (SEQ ID NO: 1) y con truncamientos N-terminal y C-terminal (residuos 25-131 en SEQ ID NO: 1) se fusionó en N-terminal con una secuencia guía de TPA en lugar de la guía ActRIIB nativa y en C-terminal con un dominio Fc humano a través de un conector mínimo (tres residuos de glicina) (Figura 5). Una secuencia de nucleótidos que codifica esta proteína de fusión se muestra en la Figura 6 (SEQ ID NO: 27), y una secuencia de nucleótidos alternativa que codifica exactamente la misma proteína de fusión se muestra en la Figura 9 (SEQ ID NO: 30). Esta proteína se expresó y purificó utilizando la metodología descrita en el Ejemplo 1.

Ejemplo 13. La trampa de GDF con un dominio extracelular de ActRIIB truncado aumenta la proliferación de progenitores eritroides en ratones

Se evaluó ActRIIB(L79D 25-131)-hFc para determinar su efecto sobre la proliferación de progenitores eritroides. Se trataron ratones C57BL/6 machos (8 semanas de edad) con ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, sc; n = 6) o vehículo (TBS; n = 6) en los días 1 y 4, luego fueron sacrificados el día 8 para la recolección de bazos, tibias, fémures y sangre. Las células del bazo y la médula ósea se aislaron, se diluyeron en medio Dulbecco modificado de Iscove que contenía suero bovino fetal al 5%, se suspendieron en medio especializado a base de metilcelulosa y se cultivaron durante 2 o 12 días para evaluar los niveles de progenitores clonogénicos en la unidad eritroide que forma colonias (CFU-E) y se explotaron formando etapas unidad-eritroide (BFU-E), respectivamente. El medio basado en metilcelulosa para la determinación de BFU-E (MethoCult M3434, Stem Cell Technologies) incluyó factor de células madre murinas recombinantes, interleucina-3 e interleucina-6, que no estaban presentes en el medio de metilcelulosa para la determinación de CFU-E (MethoCult M3334, Stem Cell Technologies), a la vez que ambos medios contenían eritropoyetina, entre otros componentes. Tanto para BFU-E como para CFU-E, se determinó el número de colonias en placas de cultivo duplicadas derivadas de cada muestra de tejido, y el análisis estadístico de los resultados se basó en el número de ratones por grupo de tratamiento.

Los cultivos derivados de bazo de ratones tratados con ActRIIB(L79D 25-131)-hFc tenían el doble de colonias de CFU-E que los cultivos correspondientes de ratones de control (P<0.05), mientras que el número de colonias de BFU-E no difirió significativamente con el tratamiento in vivo. El número de colonias CFU-E o BFU-E de cultivos de médula ósea tampoco difirió significativamente con el tratamiento. Como se esperaba, el aumento en el número de colonias de CFU-E en cultivos derivados del bazo estuvo acompañado por cambios altamente significativos (P <0.001) en el nivel de glóbulos rojos (aumento del 11.6%), concentración de hemoglobina (aumento del 12%) y nivel de hematocrito (11.6 % de aumento) en la eutanasia en ratones tratados con ActRIIB(L79D 25-131)-hFc en comparación con los controles. Estos resultados indican que la administración in vivo de una trampa de GDF con dominio extracelular ActRIIB truncado puede estimular la proliferación de progenitores eritroides como parte de su efecto general para aumentar los niveles de glóbulos rojos.

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

Los solicitantes investigaron el efecto de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc sobre los parámetros eritropoyéticos en un modelo de ratón de anemia inducida por quimioterapia basada en paclitaxel, que inhibe la división celular al bloquear la polimerización de los microtúbulos. Se asignaron ratones machos C57BL/6 (8 semanas de edad) a uno de cuatro tratamientos:

- 1) paclitaxel (25 mg/kg, i.p.)
- 2) ActRIIB (L79D 25-13 1)-hFc (10 mg/kg, i.p.)
- 3) paclitaxel + ActRIIB (L79D 25-131)-hFc
- 4) vehículo (TBS).

El paclitaxel se administró el día 0, mientras que ActRIIB(L79D 25-13 1)-hFc o el vehículo se administraron los días 0 y 3. Se recolectaron muestras de sangre para análisis de CBC de cohortes separadas los días 1, 3 y 5, y los resultados para los grupos de tratamiento 1-3 (arriba) se expresaron como porcentaje de diferencia del vehículo en un punto de tiempo dado. El desgaste debido a la toxicidad del paclitaxel fue un problema en la cohorte de solo paclitaxel el día 3 (donde n = 1); de lo contrario, n = 3-5 por tratamiento por punto de tiempo. En comparación con el vehículo, el paclitaxel solo disminuyó la concentración de hemoglobina en casi un 13% en el día 5, mientras que la adición de ActRIIB(L79D 25-131)-hFc evitó esta disminución inducida por el paclitaxel (Figura 11). Se observaron efectos similares para los niveles de hematocrito y eritrocitos. En ausencia de paclitaxel, ActRIIB(L79D 25-131)-hFc aumentó la concentración de hemoglobina en un 10 % en comparación con el vehículo en los días 3 y 5 (Figura 11). Por lo tanto, una trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB truncado puede aumentar los niveles de glóbulos rojos lo suficiente como para compensar la anemia inducida por quimioterapia.

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

Los solicitantes investigaron el efecto de ActRIIB(L79D 25-13 1)-hFc sobre la anemia en un modelo nefrectomizado de ratón de enfermedad renal crónica. Los ratones machos C57BL/6 (11 semanas de edad) se sometieron a una operación de imitación o una nefrectomía unilateral para reducir la capacidad de producción de eritropoyetina. A los ratones se les permitió una semana para la recuperación posquirúrgica y luego se trataron dos veces por semana con ActRIIB (L79D 25-13 1)-hFc (10 mg/kg, ip; n = 15 por condición) o vehículo (TBS; n = 15 por condición) por un total de 4 semanas. Se recolectaron muestras de sangre antes del inicio de la dosificación y después de 4 semanas de tratamiento. Mientras que los ratones nefrectomizados tratados con vehículo mostraron una disminución significativa en el número de glóbulos rojos durante el período de tratamiento de 4 semanas, el tratamiento con ActRIIB(L79D 25-13 1)-hFc no solo previno la disminución sino que aumentó los niveles de glóbulos rojos en un 17% (P <0.001) por encima del valor inicial (Figura 12), a pesar de la capacidad renal reducida para la producción de eritropoyetina. En ratones nefrectomizados, ActRIIB(L79D 25-13 1)-hFc también generó aumentos significativos desde el valor de línea base en la concentración de hemoglobina y el nivel de hematocrito y, en particular, estimuló cada uno de estos parámetros eritropoyéticos en aproximadamente el mismo grado en condiciones nefrectomizadas que en condiciones de operación de imitación. (Figura 13). Por lo tanto, una trampa de GDF con dominio extracelular ActRIIB truncado puede aumentar los niveles de glóbulos rojos lo suficiente como para revertir la anemia en un modelo de enfermedad renal crónica.

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

Los solicitantes investigaron el efecto de ActRIIB(L79D 25-131)-hFc sobre los parámetros eritropoyéticos en un modelo de rata de anemia inducida por pérdida aguda de sangre (anemia poshemorrágica aguda). Las ratas macho Sprague-Dawley (aproximadamente 300 g) recibieron un catéter yugular crónico en el proveedor (Harlan). El día -1, se retiró el 20% del volumen sanguíneo total de cada rata durante un período de 5 minutos a través del catéter bajo anestesia con isoflurano. El volumen de sangre extraída se basó en un valor para el volumen total de sangre calculado de acuerdo con la siguiente relación derivada por Lee y sus asociados de trabajo (J Nucl Med 25: 72-76, 1985) para ratas con un peso corporal superior a 120 g:

$$\text{Volumen total de sangre (ml)} = 0.062 \times \text{peso corporal (g)} + 0.0012$$

Se reemplazó un volumen igual de solución salina regulada con fosfato a través del catéter en el momento de la extracción de sangre. Las ratas se trataron con ActRIIB(L79D 25-13 1)-hFc (10 mg/kg, sc; n = 5) o vehículo (TBS; n = 5) en los días 0 y 3. Se extrajeron muestras de sangre para el análisis de CBC a través de catéter en los días -1 (línea de base), 0, 2, 4 y 6.

Las ratas de control respondieron a una pérdida de sangre del 20% con una caída de casi el 15% en los niveles de glóbulos rojos para el día 0. Estos niveles permanecieron significativamente más bajos que la línea de base en los días 2 y 4, y no se habían recuperado completamente para el día 6 (Figura 14). Aunque las ratas tratadas con ActRIIB(L79D 25-13 1)-hFc mostraron una caída casi idéntica en los niveles de glóbulos rojos después de una pérdida de sangre del 20%, estas ratas luego mostraron una recuperación completa en dichos niveles para el día 2, seguida de una mayor elevación en los días 4 y 6, lo que representa una mejora muy significativa sobre los niveles de control en los puntos de tiempo correspondientes (Figura 14). Se obtuvieron resultados similares para la concentración de hemoglobina. Estos hallazgos demuestran que una trampa de GDF con dominio extracelular de ActRIIB truncado puede producir una recuperación más rápida de los niveles de glóbulos rojos de la anemia causada por hemorragia aguda.

Ejemplo 17. La trampa de GDF con el dominio extracelular ActRIIB truncado aumenta los niveles de glóbulos rojos en primates no humanos

Se evaluaron dos trampas de GDF, ActRIIB(L79D 20-134)-hFc y ActRIIB(L79D 25-13 1)-hFc, por su capacidad para estimular la producción de glóbulos rojos en el mono cynomolgus. Los monos fueron tratados por vía subcutánea con trampa de GDF (10 mg/kg; n = 4 machos/4 hembras), o vehículo (n = 2 machos/2 hembras) en los días 1 y 8. Se recolectaron muestras de sangre en los días 1 (línea de base de pretratamiento), 3, 8, 15, 29 y 44, y se analizaron los niveles de glóbulos rojos (Figura 15), hematocrito (Figura 16), niveles de hemoglobina (Figura 17) y niveles de reticulocitos (Figura 18). Los monos tratados con vehículo exhibieron niveles disminuidos de glóbulos rojos, hematocrito y hemoglobina en todos los puntos de tiempo posteriores al tratamiento, un efecto esperado del muestreo repetido de sangre. En contraste, el tratamiento con ActRIIB(L79D 20-134)-hFc o ActRIIB(L79D 25-13 1)-hFc aumentó estos parámetros en el primer punto de tiempo posterior al tratamiento (Día 3) y los mantuvo a niveles sustancialmente elevados durante el tiempo del estudio (Figuras 15-17). Es importante destacar que los niveles de reticulocitos en monos tratados con ActRIIB(L79D 20-134)-Fc o ActRIIB(L79D 25-13 1)-hFc aumentaron sustancialmente en los días 8, 15 y 29 en comparación con el vehículo (Figura 18). Este resultado demuestra que el tratamiento con trampa de GDF aumentó la producción de precursores de glóbulos rojos, lo que resultó en niveles elevados de glóbulos rojos.

Tomados en conjunto, estos datos demuestran que las trampas truncadas de GDF, así como las variantes de longitud completa, pueden usarse como antagonistas selectivos de GDF11 y ligandos potencialmente relacionados para aumentar la formación de glóbulos rojos in vivo.

Ejemplo 18. Trampa de GDF derivada de ActRIIB5

Otros han informado una forma alternativa y soluble de ActRIIB (designada ActRIIB5), en la que el exón 4, incluido el dominio transmembrana de ActRIIB, ha sido reemplazado por una secuencia C-terminal diferente (WO2007/053775).

La secuencia de ActRIIB5 humano nativo sin su líder es la siguiente:

```
GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWLDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGSALWLCLEGPAHE
```

(SEQ ID NO: 36)

Se puede realizar una sustitución de leucina a aspartato, u otras sustituciones ácidas, en la posición nativa 79 (subrayada y resaltada) como se describe para construir la variante ActRIIB5 (L79D), que tiene la siguiente secuencia:

```
GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGSALWLCLEGPAHE
```

(SEQ ID NO: 37)

Esta variante puede conectarse al Fc humano con un enlazador TGGG para generar una proteína de fusión ActRIIB5 (L79D)-hFc humana con la siguiente secuencia:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGS GALWLCLEGPAHETGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 38)

Este constructo puede expresarse en células CHO.

- 5 Si bien se han discutido realizaciones específicas del objeto, la especificación anterior es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variaciones que caen dentro del alcance de las reivindicaciones se harán evidentes para los expertos en la materia tras la revisión de esta especificación y las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28.
- 5 2. El polipéptido aislado de la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO: 28.
3. El polipéptido aislado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28.
- 10 4. Un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido definido en la reivindicación 1, 2 o 3.
5. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 4, en donde el ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 30 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 27.
- 15 6. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde el ácido nucleico está operativamente unido a una o más secuencias reguladoras.
7. Un vector que comprende el ácido nucleico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6.
- 20 8. Una célula cultivada que comprende el vector de la reivindicación 7.
9. La célula cultivada de la reivindicación 8, en la que la célula es una célula de mamífero.
- 25 10. La célula cultivada de la reivindicación 9, en la que la célula de mamífero es una célula CHO.
11. Un método para producir el polipéptido definido en la reivindicación 1, 2 o 3, que comprende:
- 30 a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido, y
- b) recuperar el polipéptido así expresado,
- en donde la célula:
- 35 i) es la célula de cualquiera de las reivindicaciones 8-10,
- ii) comprende un vector, en donde el vector comprende un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 30, o
- 40 iii) comprende un vector, en donde el vector comprende un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 27.
12. El método de la reivindicación 11, en donde la célula es una célula de mamífero.
- 45 13. El método de la reivindicación 12, en donde la célula de mamífero es una célula CHO.
14. Una composición que comprende el polipéptido definido en la reivindicación 1, 2 o 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

ActRIIa	ILGRSETQEC	LFENANWEKD	RTNQTGVEPC	YGDKDKRRHC	FATWKNISGS
ActRIIb	GRGEAETREC	IYYNANWELE	RTNQSGLERC	EGEQDKRLHC	YASWRNSSGT
	IEIVKQGCWL	DDINCYDRTD	CVEKKSPEV	YFCCCEGPMC	NEKFSYFPEM
	IELVKKGCWL	DDFNCYDRQE	CVATEENPQV	YFCCCEGNFC	NERFTHLPEA
	EVTQPTSNPV	TPKPPT			
	GGPEVTYEPP	PTAPT			

FIGURA 1

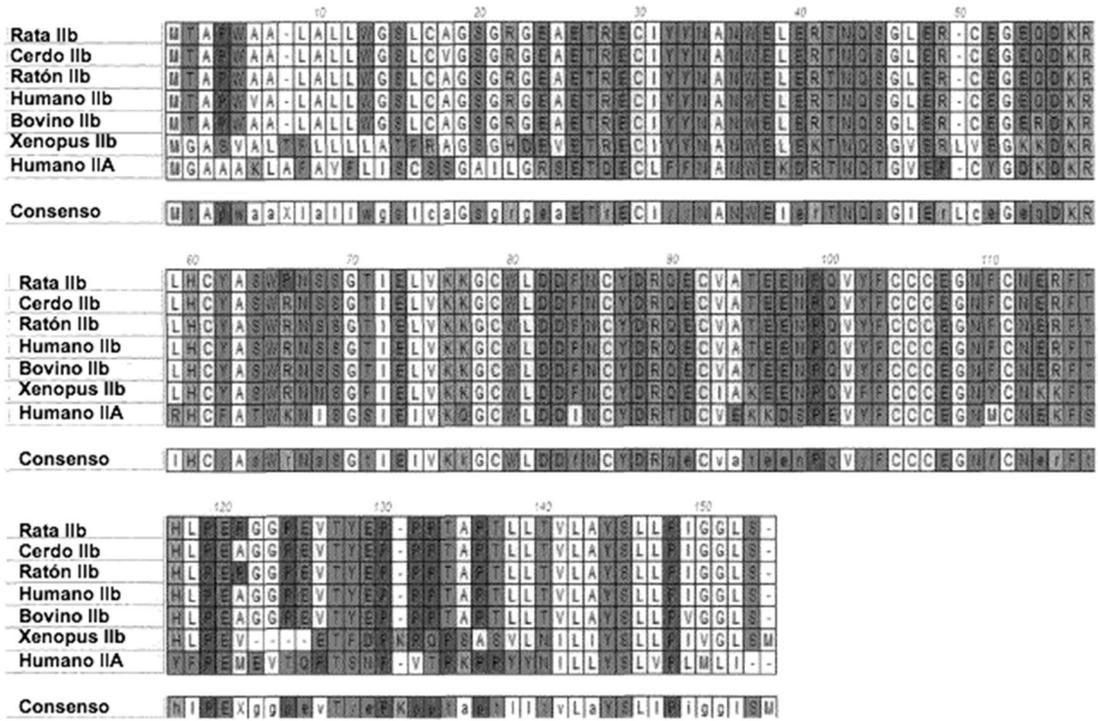


FIGURA 2

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

FIGURA 3

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG
 TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGAGACCCGC ACCCCTCCGA CTCTGTGCC

101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC
 TCACGTAGAT GATGTTGCGG TTGACCCTCG ACCTCGCGTG GTTGGTCTCG

151 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC
 CCGGACCTCG CGACGCTTCC GTCGTCCTG TTCGCCGACG TGACGATGCG

201 CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT
 GAGGACCGCG TTGTCGAGAC CGTGGTAGCT CGAGCACTTC TTCCCGACGA

251 GGGATGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG
 CCCTACTACT GAAGTTGACG ATGCTATCCG TCCTCACACA CCGGTGACTC

301 GAGAACCCCC AGGTGTA CTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA
 CTCTTGGGGG TCCACATGAA GACGACGACA CTTCCGTTGA AGACGTTGCT

351 GCGCTTCACT CATTGTCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC
 CGCGAAGTGA GTAAACGGTC TCCGACCCCC GGCCTTCAG TGCATGCTCG

401 CACCCCGAC AGCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
 GTGGGGGCTG TCGGGGGTGG CCACCACCTT GAGTGTGTAC GGGTGGCAGC

451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAA
 GGTGCGGGAC TTGAGGACCC CCCTGGCAGT CAGAAGGAGA AGGGGGGTTT

501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
 TGGGTTCCTG TGGGAGTACT AGAGGGCCTG GGGACTCCAG TGTACGCACC

551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
 ACCACCTGCA CTCGGTGCTT CTGGGACTCC AGTTCAAGTT GACCATGCAC

601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
 CTGCCGCACC TCCACGTATT ACGGTTCTGT TTCGGCGCCC TCCTCGTCAT

651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT
 GTTGTGCTGC ATGGCACACC AGTCGCAGGA GTGGCAGGAC GTGGTCCCTGA

701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
 CCGACTTACC GTTCCTCATG TTCACGTTCC AGAGGTTGTT TCGGGAGGGT

751 GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
 CGGGGGTAGC TCTTTTGTA GAGGTTTCGG TTTCCCGTCC GGGCTCTGG

FIGURA 4

```

801  ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
      TGTCCACATG TGGGACGGGG GTAGGGCCCT CCTCTACTGG TTCTTGGTCC

851  TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
      AGTCGGACTG GACGGACCAG TTTCCGAAGA TAGGGTCGCT GTAGCGGCAC

901  GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
      CTCACCCTCT CGTTACCCGT CGGCCTCTTG TTGATGTTCT GGTGCGGAGG

951  CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
      GCACGACCTG AGGCTGCCGA GGAAGAAGGA GATATCGTTC GAGTGGCACC

1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGAACGTCT TTCATGCTC CGTGATGCAT
      TGTTCGTCGC CACCGTCGTC CCCTTGCGA AGAGTACGAG GCACTACGTA

1051 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCCCCGGG
      CTCCGAGACG TGTTGGTGAT GTGCGTCTTC TCGGAGAGGG ACAGGGGCCC

1101 TAAATGA (SEQ ID NO:25)
      ATTTACT (SEQ ID NO:33)

```

FIGURA 4 CONTINUACIÓN

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

FIGURA 5

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA
TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGACTCTG TGCCCTCACG TAGATGATGT

 101 ACGCCAACTG GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC
TGCGGTTGAC CCTCGACCTC GCGTGGTTGG TCTCGCCGGA CCTCGCGACG

 151 GAAGGCGAGC AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGCGCAACAG
CTTCCGCTCG TCCTGTTCGC CGACGTGACG ATGCGGAGGA CCGCGTTGTC

 201 CTCTGGCACC ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGGAC GATGACTTCA
GAGACCGTGG TAGCTCGAGC ACTTCTTCCC GACGACCCTG CTACTGAAGT

 251 ACTGCTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCAGGTG
TGACGATGCT ATCCGTCCCTC ACACACCGGT GACTCCTCTT GGGGTTCCAC

 301 TACTTCTGCT GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATTT
ATGAAGACGA CGACACTTCC GTTGAAGACG TTGCTCGCGA AGTGAGTAAA

 351 GCCAGAGGCT GGGGGCCCCG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGGTG
CGGTCTCCGA CCCCCGGGCC TTCAGTGCAT GCTCGGTGGG GGCTGTCCAC

 401 GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA
CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

 451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

 501 CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

 551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

FIGURA 6

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
 TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
 GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
 CGTTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCADC
 TTTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
 GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTIONGACG GACCAGTTTC

851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
 CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901 GAGAACAACACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
 CTCTTGTTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951 CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
 GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT

1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
 TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 27)
 GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCATTT ACT (SEQ ID NO: 34)

FIGURA 6 CONTINUACIÓN

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

FIGURA 7

1 ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
51 KGCWDDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
101 TYEPPPT (SEQ ID NO: 29)

FIGURA 8

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCCGAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA
TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGCGCTTTG GCGCCTTACA TAAATAATGT

 101 ATGCTAATTG GGA^{E T R E C I Y Y}ACTCGAA CGGACGAACC AATCCGGGCT CGAACGGTGT
TACGATTAAC CCTTGAGCTT GCCTGCTTGG TTAGGCCCGA GCTTGCCACA

 151 GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTCGT GGAGGAACTC
CTCCCCCTTG TCCTATTTGC GGAGGTAACG ATACGCAGCA CCTCCTTGAG

 201 CTCCGGGACG ATTGAACTGG TCAAGAAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTTCA
GAGGCCCTGC TAACTTGACC AGTTCTTTCC CACGACCCTG CTGCTAAAGT

 251 ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTGCGGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC
TAACAATACT GGCGGTCCTT ACACAGCGCT GGCTTCTCTT AGGCGTCCAG

 301 TATTTCTGTT GTTGCGAGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT
ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTTAAAGACA TTACTTGCCA AATGGGTGGA

 351 CCCCGAAGCC GCGGGGCCG AGGTGACCTA TGAACCCCG CCCACCGGTG
GGGGCTTCGG CCGCCCGGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGGC GGTGGGCCAC

 401 GTGGA^{P E A G G P E V T Y E P P P T}ACTCA CACATGCCCA CCGTGCC^PCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA
CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCC^PCCCT

 451 CCGTCA^PGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCTGTGGG AGTACTAGAG

 501 CCG^PGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

 551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

 601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
TTCTGTTTTG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

 651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

FIGURA 9

701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
CGTTCCAGAG GTTGTTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCATC
TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC

851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901 GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
CTCTTGTTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951 CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT

1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 30)
GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 35)

FIGURA 9 CONTINUACIÓN

GAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA ATGCTAATTG GGA^{ACTCGAA} CGGACGAACC
AATCCGGGCT CGAACGGTGT GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTCGT
GGAGGAACTC CTCCGGGACG ATTGAACTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTCA
ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTCGCGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC TATTTCTGTT
GTTGCGAGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT CCCCGAAGCC GGC^{GGGCCG}
AGGTGACCTA TGAACCCCG CCCACC (SEQ ID NO: 31)

FIGURA 10

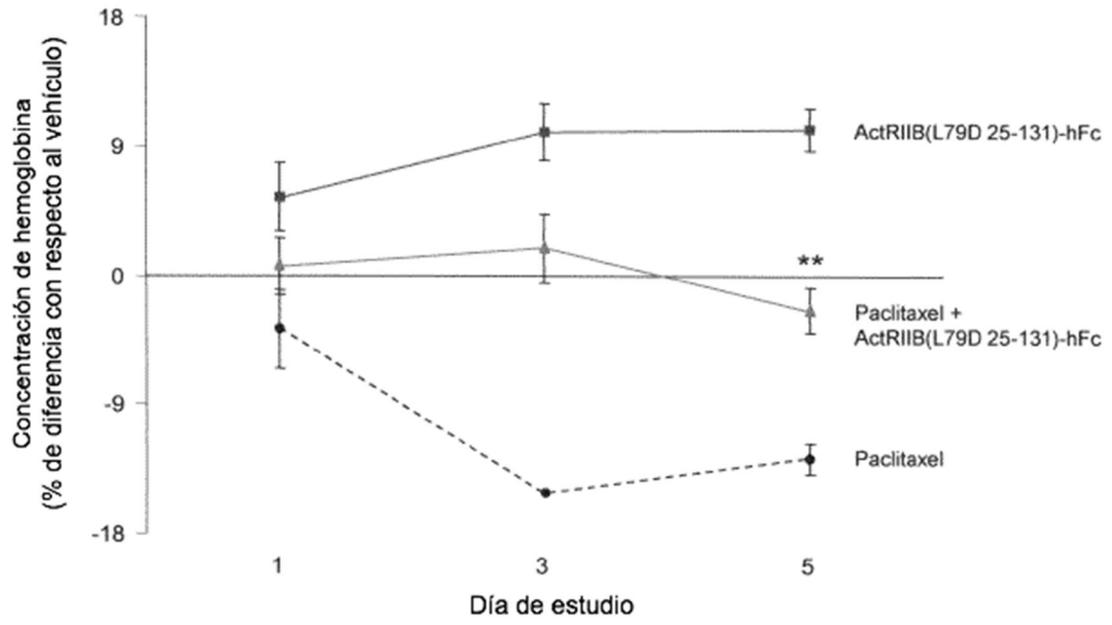


FIGURA 11

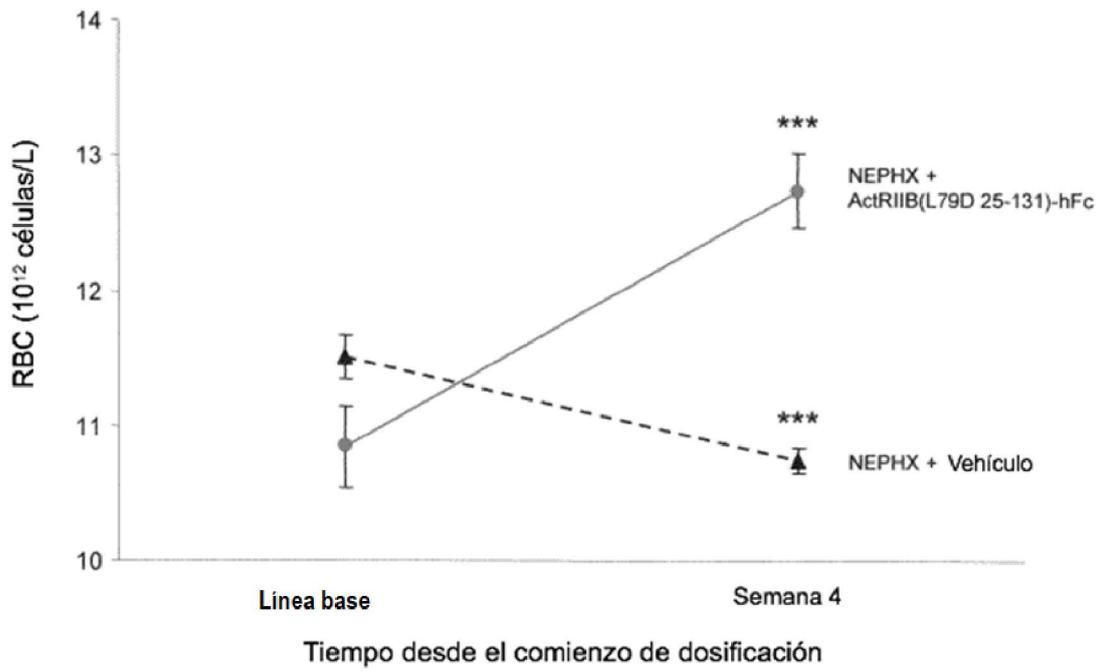


FIGURA 12

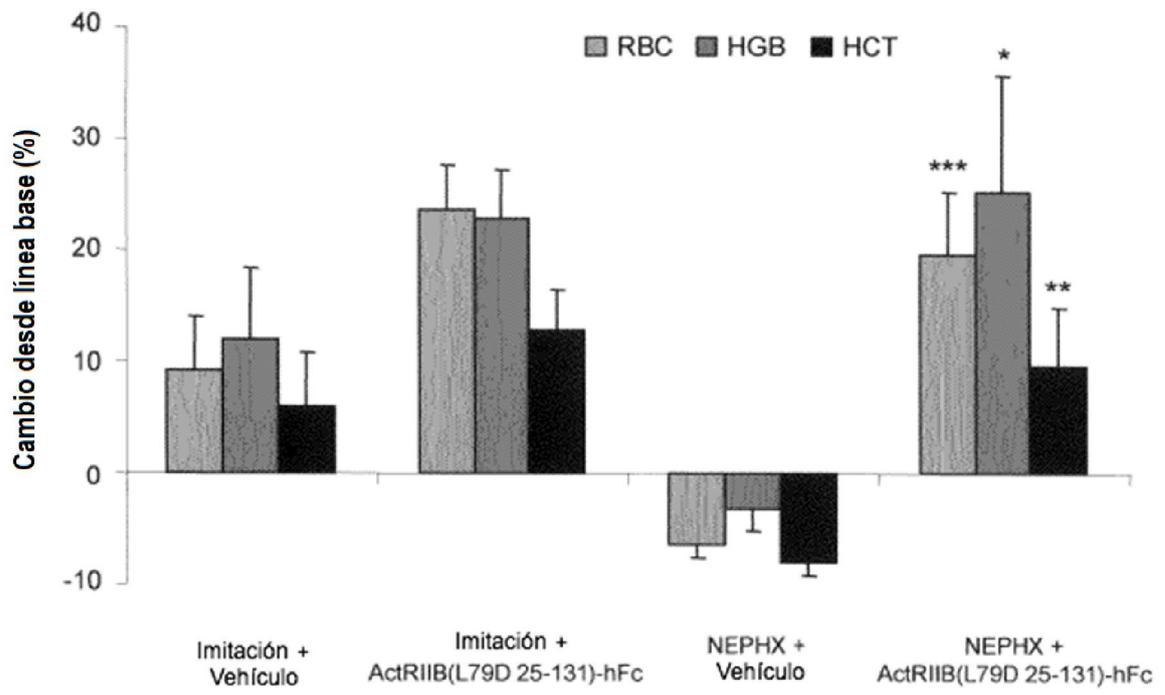


FIGURA 13

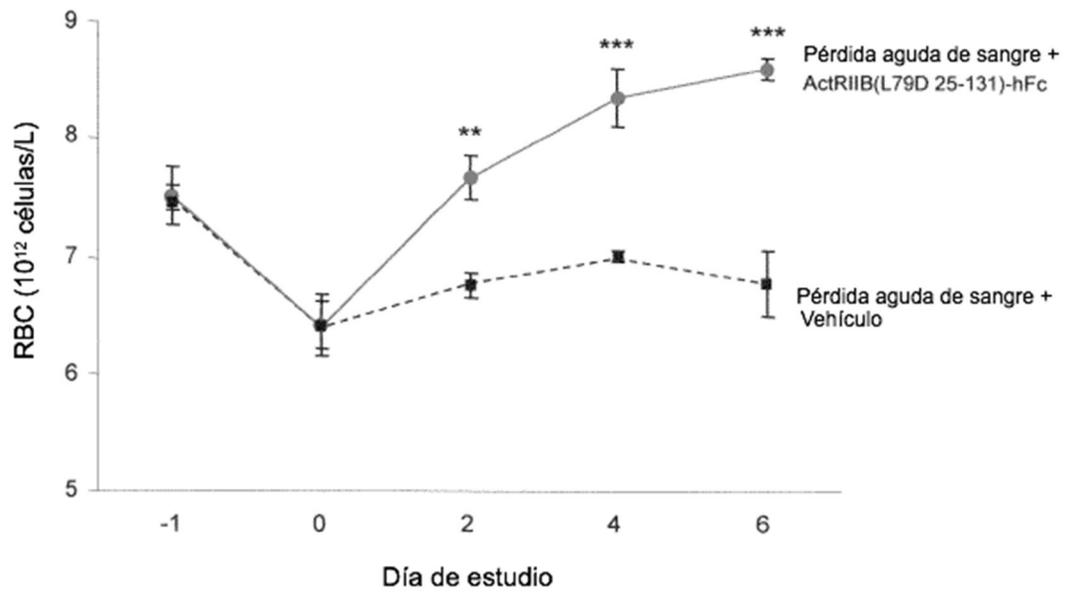


FIGURA 14

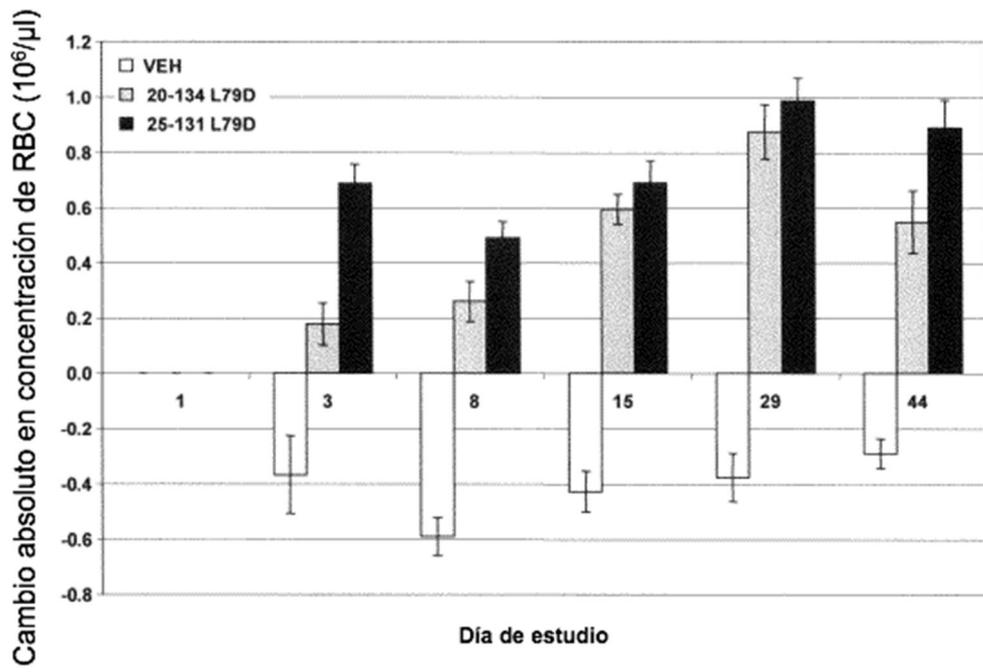


FIGURA 15

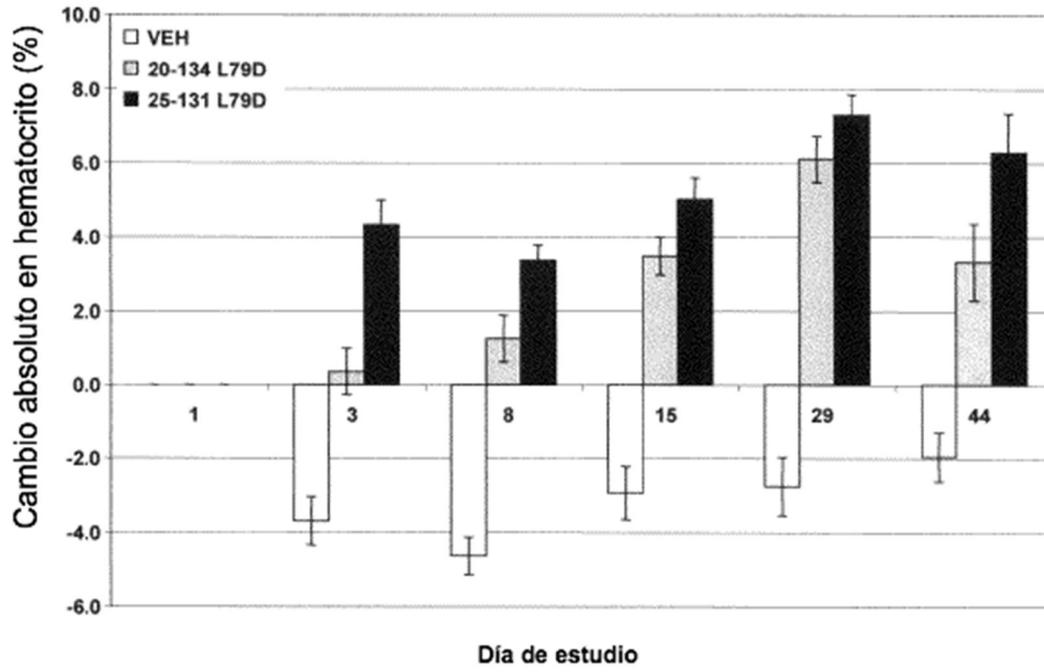


FIGURA 16

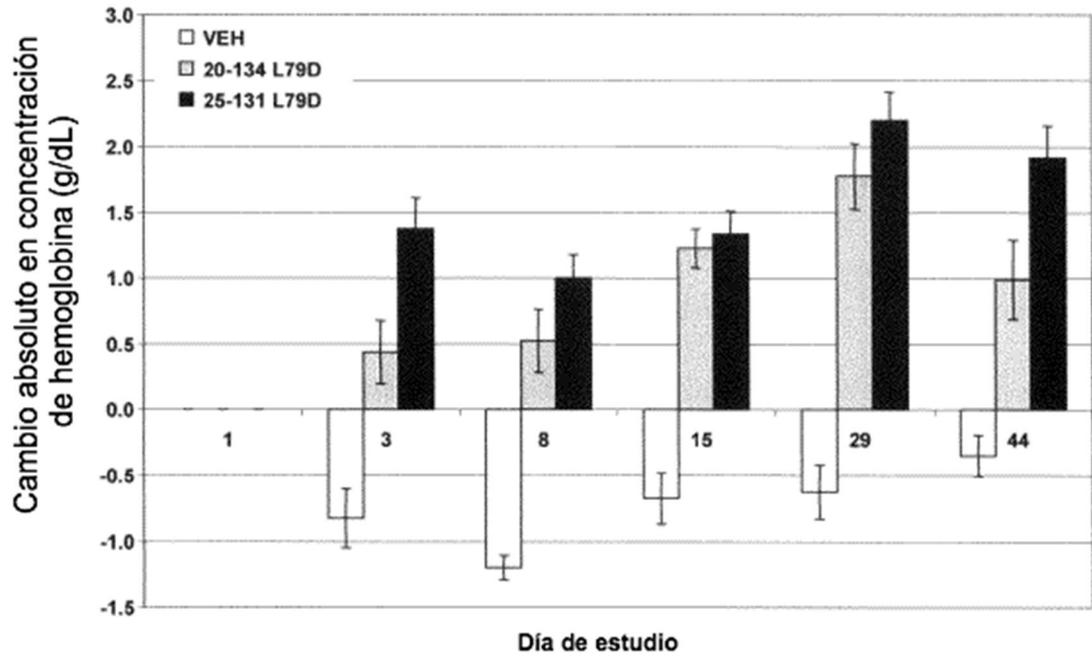


FIGURA 17

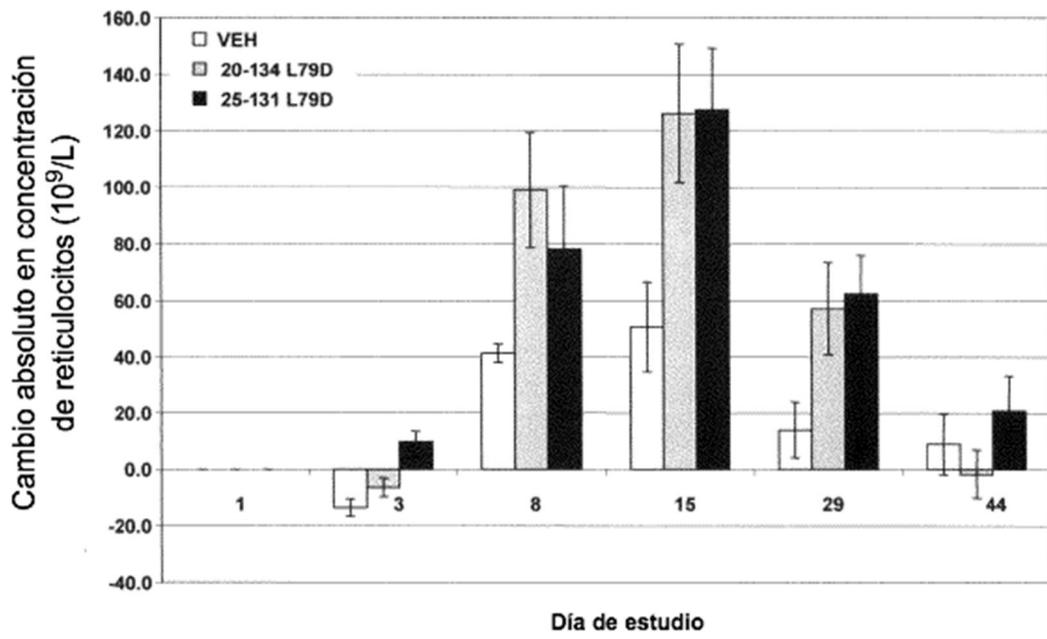


FIGURA 18