



OK
16/4

BT

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Organización y
Digitalización CSA Ltda

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

09-71017

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO "ANTAGONISTAS DE ACTIVINA - ACTRII
Y USOS PARA AUMENTAR LOS NIVELES
DE GLOBULOS ROJOS"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE ACCELERON PHARMA INC

DOMICILIO CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS,
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO HUMBERTO RUBIO CANACHO
COD 4134

22. BOGOTÁ, D.C., 9 DE JULIO /2009



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-071017- -00000-0000

Fecha: 2009-07-09 14:08:28 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 149

PETITORIO

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I

Capítulo II

SOLICITANTE (71) Nombre y Dirección: **ACCELERON PHARMA INC.**
128 Sidney Street,
Cambridge, Massachusetts 02139, Estados Unidos de America
Lugar de Constitución: **Cambridge, Massachusetts, Estados Unidos de America**

REPRESENTANTE (74) Nombre: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO** IDENTIFICACIÓN
O APODERADO Dirección: **Carrera 7 No. 74 - 64, Of. 506** C.C. **17192.062**
Teléfono: **3132408** Fax: **3131647** T.P. **50.007 CSJ**

INVENTOR(ES) (72) Nombre y Dirección: **Matthew L. SHERMAN**
33 Janet Road,
Newton, Massachusetts 02459, Estados Unidos de America

PCT (86)

Solicitud Internacional No. **PCT/US2007/025868** Fecha **18 DE DICIEMBRE DE 2007**
Publicación Internacional No. **WO 2008/076437** Fecha **26 DE JUNIO DE 2008**

TITULO (54) "ANTAGONISTAS DE ACTIVINA-ACTRII Y USOS PARA AUMENTAR LOS NIVELES DE GLÓBULOS ROJOS"

Clasificación Internacional (51) _____

Prioridad	(33) País de origen	(32) Fecha	(31) Número de solicitud
SI ☒ NO	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	18 DE DICIEMBRE DE 2006	60/875,682

Comprobante de pago No. **09-45,368** Fecha: **19 de junio de 2.009**
09-45,369 **19 de junio de 2.009**

Bap

**EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION
DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL**

(21) No. SOLICITUD: (51) INT. CL.:
(22) FECHA DE PRESENTACIÓN: (71) SOLICITANTE: **ACCELERON PHARMA INC.**
(30) PRIORIDAD: **ESTADOUNIDENSE**
(31) No. DE SOLICITUD: **60/875,682** (72) INVENTORES: **Matthew L. SHERMAN**
(32) FECHA DE PRESENTACIÓN: **18 DE DICIEMBRE DE 2006**
(33) PAÍS: **Estados Unidos** (74) APODERADO: **HUMBERTO RUBIO CAMCHO de América**

Solicitud Internacional No. **PCT/US2007/025868** Fecha **18 DE DICIEMBRE DE 2007**
Publicación Internacional No. **WO 2008/076437** Fecha **26 DE JUNIO DE 2008**

FECHA ENTRADA EN FASE NACIONAL:

(54) TITULO: "ANTAGONISTAS DE ACTIVINA-ACTRII Y USOS PARA AUMENTAR LOS NIVELES DE GLÓBULOS ROJOS"

RESUMEN:

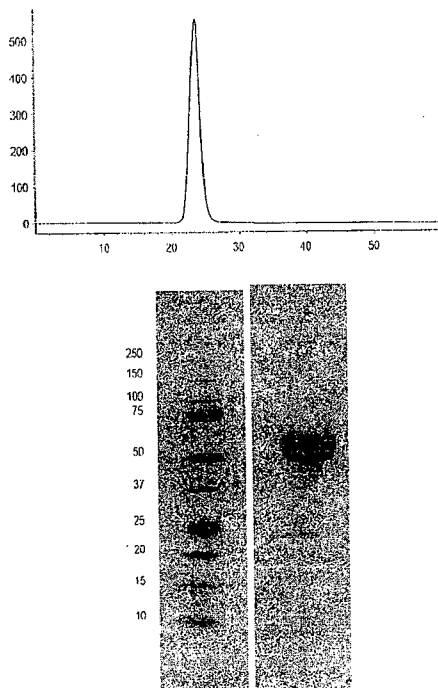
Un método para aumentar los niveles de glóbulos rojos en un paciente humano, comprendiendo el método administrar a un paciente humano que lo necesita una cantidad eficaz de un polipéptido ActRII seleccionado entre el grupo que consiste en:

- a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90% idéntica a SEC ID N°: 2;
- b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90% idéntica a SEC ID N°: 3 y
- c) un polipéptido que comprende al menos 50 aminoácidos consecutivos seleccionados de SEC ID N°: 2.
- d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90% idéntica a SEC ID N°: 16;
- e) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90% idéntica a SEC ID N°: 17 y
- f) un polipéptido que comprende al menos 50 aminoácidos consecutivos seleccionados de SEC ID N°: 16.

ANEXOS

- X Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- X Comprobante de pago de la tasa por excedente de Reivindicaciones.
Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
Poderes, si fuere el caso.
Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
Declaraciones
- X Copia de la publicación PCT y *versión corregida*
- X Copia informe búsqueda internacional.
- X Copia de Opinión escrita
Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
Copia del informe del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional (IPEA). (Incluye modificaciones)
Traducción de los anexos del examen preliminar internacional.
Copia de las modificaciones efectuadas de acuerdo con el Artículo PCT en Fase Nacional.
De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- X Arte final 12 x 12
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- X Otros = *Invitación a corregir la prioridad (Form PCT/RO/110) y respuesta (Form PCT/RO/106) y respuesta*
- Invitación a aportar listado de secuencias y respuesta

(11) Figura característica:



(12)

HUMBERTO RUBIO CAMACHO

FIRMA

C.C. 17'192.062 de Bogotá
T.P. 50.007 Consejo Superior de
La Judicatura

**PARA USO EXCLUSIVO DE
HUMBERTO RUBIO & CIA. LTDA.**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 45,368
FECHA : JUNIO 19 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-071017- -00000-0000

Fecha: 2009-07-09 14:08:28 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 149

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
HUMBERTO RUBIO & CIA ABOG	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	104937221	19/06/2009	5,807,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

**PARA USO EXCLUSIVO DE
HUMBERTO RUBIO & CIA. LTDA.**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 45,369
FECHA : JUNIO 19 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-071017- -00000-0000

Fecha: 2009-07-09 14:08:28 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 149

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
HUMBERTO RUBIO & CIA ABOG	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	104937221	19/06/2009	5,807,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
7	50005-01-01	SOLICITUDES	
		*** REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL	175,000.00
		TOTAL :	\$ 175,000.00

SON: CIENTO SETENTA Y CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
26 June 2008 (26.06.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/076437 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 38/18 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2007/025868

(22) International Filing Date:
19 December 2007 (19.12.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/875,682 18 December 2006 (18.12.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): AC-
CELERON PHARMA INC. [US/US]; 149 Sidney
Street, Cambridge, MA 02139 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): SHERMAN,
Matthew, L. [US/US]; 33 Janet Road, Newton, MA
02459 (US).

(74) Agents: VINCENT, Matthew, P. et al.; Ropes & Gray
Llp, One International Place, Boston, MA 02110 (US).

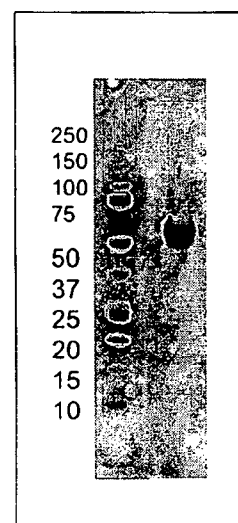
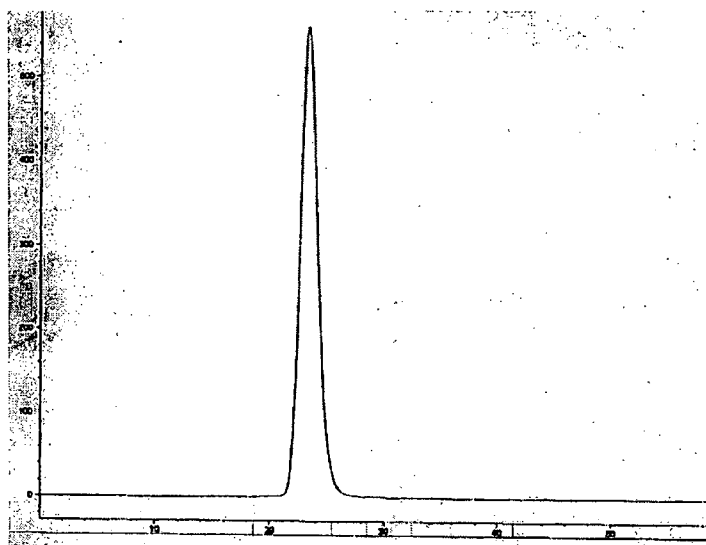
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL,
PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- without international search report and to be republished
upon receipt of that report
- the filing date of the international application is within two
months from the date of expiration of the priority period

(54) Title: ACTIVIN-ACTRII ANTAGONISTS AND USES FOR INCREASING RED BLOOD CELL LEVELS



(57) Abstract: In certain aspects, the present invention provides compositions and methods for increasing red blood cell and/or hemoglobin levels in vertebrates, including rodents and primates, and particularly in humans.

WO 2008/076437 A2

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
26 June 2008 (26.06.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/076437 A3

(51) International Patent Classification:

A61K 38/17 (2006.01) A61P 7/06 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2007/025868

(22) International Filing Date:

19 December 2007 (19.12.2007)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/875,682 18 December 2006 (18.12.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **AC-CELERON PHARMA INC.** [US/US]; 149 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): **SHERMAN, Matthew, L.** [US/US]; 33 Janet Road, Newton, MA 02459 (US).

(74) Agents: **VINCENT, Matthew, P.** et al.; Ropes & Gray LLP, One International Place, Boston, MA 02110 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

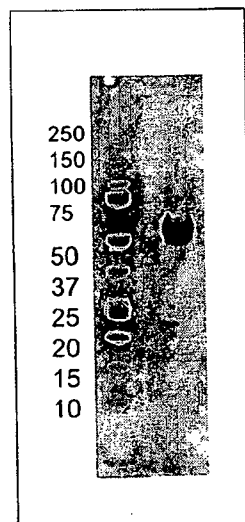
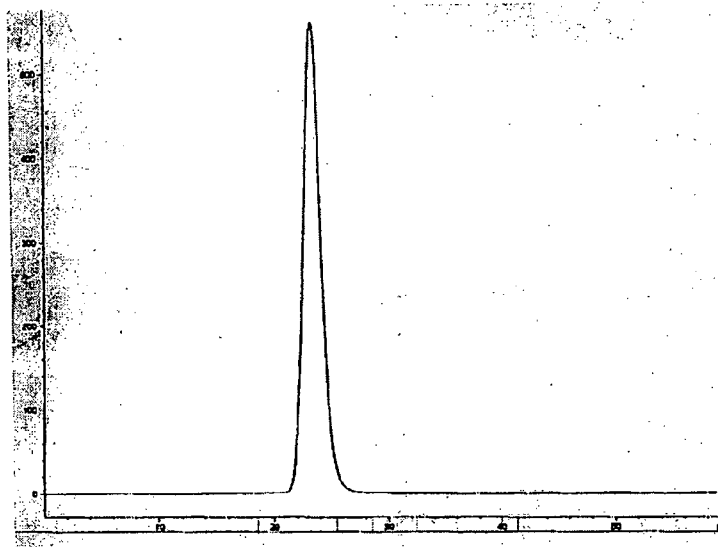
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- the filing date of the international application is within two months from the date of expiration of the priority period

(88) Date of publication of the international search report:
18 September 2008

(54) Title: **ACTIVIN-ACTRII ANTAGONISTS AND USES FOR INCREASING RED BLOOD CELL LEVELS**



(57) Abstract: In certain aspects, the present invention provides compositions and methods for increasing red blood cell and/or hemoglobin levels in vertebrates, including rodents and primates, and particularly in humans.

WO 2008/076437 A3

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
26 June 2008 (26.06.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/076437 A3

(51) International Patent Classification:
A61K 38/17 (2006.01) A61P 7/06 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

Matthew, L. [US/US]; 33 Janet Road, Newton, MA 02459 (US).

(21) International Application Number:

PCT/US2007/025868

(74) Agents: VINCENT, Matthew, P. et al.; Ropes & Gray LLP, One International Place, Boston, MA 02110 (US).

(22) International Filing Date:

18 December 2007. (18.12.2007)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/875,682 (18 December 2006 (18.12.2006) US

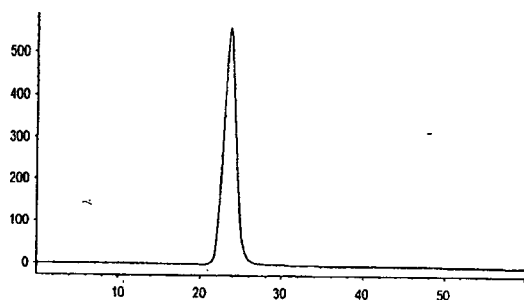
(71) Applicant (for all designated States except US): AC-CELERON PHARMA INC. [US/US]; 149 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

[Continued on next page]

(54) Title: ACTIVIN-ACTRII ANTAGONISTS AND USES FOR INCREASING RED BLOOD CELL LEVELS



(57) Abstract: In certain aspects, the present invention provides compositions and methods for increasing red blood cell and/or hemoglobin levels in vertebrates, including rodents and primates, and particularly in humans.

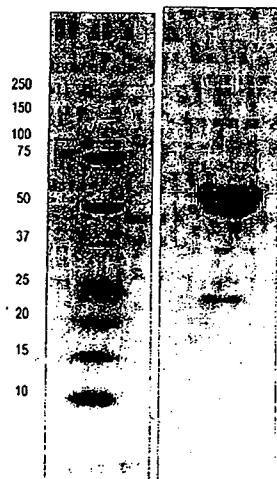


Figure 1

WO 2008/076437 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/025868

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/17 C12N15/62 A61P7/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	WO 2007/062188 A (ACCELERON PHARMA INC [US]; KNOFF JOHN [US]; SEEHRA JASBIR [US]) 31 May 2007 (2007-05-31) the whole document	1-22
Y	WO 2006/012627 A (ACCELERON PHARMA INC [US]; KNOFF JOHN [US]; SEEHRA JASBIR [US]) 2 February 2006 (2006-02-02)	1-22
X	claims 1-59, 86, 87 page 5, line 20 - page 6, line 27	1-6, 14-22
Y	WO 2004/039948 A (WYETH CORP [US]; WOLFMAN NEIL M [US]; BOUXSEIN MARY L [US]) 13 May 2004 (2004-05-13)	1-22
X	the whole document	1-6, 14-22
----- -/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 July 2008

Date of mailing of the international search report

25/07/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan, 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fayos, Cécile

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2007/025868

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HARRISON C A ET AL: "Antagonists of activin signaling: mechanisms and potential biological applications" TRENDS IN ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHING, NEW YORK, NY, US, vol. 16, no. 2, 1 March 2005 (2005-03-01), pages 73-78, XP004768099 ISSN: 1043-2760 the whole document	1-22
Y	WO 2005/009460 A (MEDEXIS S A [GR]; FOTSIS THEODORE [GR]) 3 February 2005 (2005-02-03) page 6, line 19 - line 24	1-22
Y	WELT C K ET AL: "Activin: an endocrine or paracrine agent?" EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY / EUROPEAN FEDERATION OF ENDOCRINE SOCIETIES NOV 1998, vol. 139, no. 5, November 1998 (1998-11), pages 469-471, XP002488144 ISSN: 0804-4643 page 139, left-hand column, last paragraph	1-22
Y	COERVER K A ET AL: "Activin signaling through activin receptor type II causes the cachexia-like symptoms in inhibin-deficient mice." MOLECULAR ENDOCRINOLOGY (BALTIMORE, MD.) MAY 1996, vol. 10, no. 5, May 1996 (1996-05), pages 534-543, XP002488145 ISSN: 0888-8809 the whole document page 540, right-hand column, lines 2-5	1-22
P,X	LI QINGLEI ET AL: "Prevention of cachexia-like syndrome development and reduction of tumor progression in inhibin-deficient mice following administration of a chimeric activin receptor type II-murine Fc protein." MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION SEP 2007, vol. 13, no. 9, September 2007 (2007-09), pages 675-683, XP009102916 ISSN: 1360-9947 the whole document	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2007/025868

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007062188 A	31-05-2007	AU 2006318449 A1	31-05-2007
WO 2006012627 A	02-02-2006	AU 2005266875 A1	02-02-2006
		CA 2574777 A1	02-02-2006
		EP 1771470 A2	11-04-2007
		JP 2008507288 T	13-03-2008
WO 2004039948 A	13-05-2004	AU 2003279817 A1	25-05-2004
		BR 0315645 A	30-08-2005
		CA 2501180 A1	13-05-2004
		EP 1572961 A2	14-09-2005
		JP 2006516886 T	13-07-2006
		MX PA05004224 A	20-09-2005
WO 2005009460 A	03-02-2005	NONE	

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information

For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.

Amending claims under Art. 19 PCT

Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.

Filing a demand for international preliminary examination

In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/ WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT).

If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).

Filing informal comments

After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.

End of the international phase

At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).

Relevant PCT Rules and more information

Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veuillez noter que les ouvrages de la littérature non-brevets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2007/025868

of activin A and of ActRII in anemia.

The closest prior art differs from the present application in that the treatment of anemia with activin-ActRII is not disclosed.

The technical effect achieved in the present application is shown in the examples, namely that ActRIIa-hFc increases red blood cell levels in human patients, and that ActRIIb-hFc stimulates erythropoiesis in non-human primates.

The objective problem posed in the present application is to provide means for the treatment of anemia.

The solution proposed is the use of certain activin-ActRII antagonists defined in the claims.

On the one hand, in view of any of D5, D6 or D7, it would be obvious for the skilled man to use activin-ActRII antagonists, as provided in D2 or D3 for the treatment of anemia. On the other hand, the present application only provides evidence for the effectiveness of two very specific types of compounds, namely ActRIIa-hFc and ActRIIb-hFc, so that the problem posed is not shown to be solved over the whole scope claimed. Furthermore, it is accepted as undisputed common general knowledge that even small modifications of the protein sequence, especially in the active site of the protein, can cause dramatic differences in biological activity. Therefore, even a polypeptide having 99% identity with the given sequences may not possess the claimed activity, and hence not be suitable for the treatment of anemia.

The subject matter claimed in the present application cannot be considered as being inventive.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2007/025868

For the sake of completeness, and for the purpose of this opinion only, the following comments are made under Item V in view of the relevant prior art cited in the search report.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

- 8- Claims 1-13, 16-22 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv) / 67.1(iv)PCT. The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable, claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or composition for use in first or further medical treatment.
- 9- Reference is made to the following documents:
- D1: WO 2007/062188 A (ACCELERON PHARMA INC [US]; KNOPF JOHN [US]; SEEHRA JASBIR [US]) 31 May 2007 (2007-05-31)
- D2: WO 2006/012627 A (ACCELERON PHARMA INC [US]; KNOPF JOHN [US]; SEEHRA JASBIR [US]) 2 February 2006 (2006-02-02)
- D3: WO 2004/039948 A (WYETH CORP [US]; WOLFMAN NEIL M [US]; BOUXSEIN MARY L [US]) 13 May 2004 (2004-05-13)
- D4: HARRISON C A ET AL: "Antagonists of activin signaling: mechanisms and potential biological applications" TRENDS IN ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHING, NEW YORK, NY, US, vol. 16, no. 2, 1 March 2005 (2005-03-01), pages 73-78, XP004768099 ISSN: 1043-2760
- D5: WO 2005/009460 A (MEDEXIS S A [GR]; FOTSIS THEODORE [GR]) 3 February 2005 (2005-02-03)
- D6: WELT C K ET AL: "Activin: an endocrine or paracrine agent?" EUROPEAN JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY / EUROPEAN FEDERATION OF ENDOCRINE SOCIETIES NOV 1998, vol. 139, no. 5, November 1998 (1998-11), pages 469-471, XP002488144 ISSN: 0804-4643

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2007/025868

- D7: COERVER K A ET AL: "Activin signaling through activin receptor type II causes the cachexia-like symptoms in inhibin-deficient mice." MOLECULAR ENDOCRINOLOGY (BALTIMORE, MD.) MAY 1996, vol. 10, no. 5, May 1996 (1996-05), pages 534-543, XP002488145 ISSN: 0888-8809
- D8: LI QINGLEI ET AL: "Prevention of cachexia-like syndrome development and reduction of tumor progression in inhibin-deficient mice following administration of a chimeric activin receptor type II-murine Fc protein." MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION SEP 2007, vol. 13, no. 9, September 2007 (2007-09), pages 675-683, XP009102916 ISSN: 1360-9947

NOVELTY - Art. 33 (1) and (2) PCT

10- Claims 1-6, 14-22 are not novel.

D2 discloses pharmaceutical compositions comprising the activin-ActRII antagonists of the present application for use in promoting tissue growth and in particular in the treatment of cachexia. Although D2 does not explicitly mention an increase in red blood cell levels, this Authority is of the opinion that neither the therapeutic composition (which is known from D2), nor the physiological effect (increase in red blood cell levels) can confer novelty, as the newly discovered and reported effects are necessarily correlated and inseparably tied to the known therapeutic use disclosed in D2. Hence, notwithstanding the above objections under item III, D2 is considered to anticipate the subject matter of at least claims 1-6, 14-22. The same applies to D3.

None of the available prior art documents appear to explicitly mention the treatment of anemia.

INVENTIVE STEP - Art. 33 (1) and (3) PCT

11- Claims 1-22 lack inventive step

The closest prior art is represented by any of D5, D6 or D7 which mention the implication

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2007/025868

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).

2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

a. type of material:

- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material:

- ☒ on paper
- ☒ in electronic form

c. time of filing/furnishing:

- ☐ contained in the international application as filed.
- ☐ filed together with the international application in electronic form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

4. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2007/025868

Box No. II Priority

1. ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43*bis*.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43*bis*.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2007/025868

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 1-22 all partially

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 1-22 all partially are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

see separate sheet

☒ the claims, or said claims Nos. 1-22 all partially are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

see separate sheet

☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☒ See Supplemental Box for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2007/025868

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	=
	No: Claims	<u>1-6, 14-22</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	=
	No: Claims	<u>1-22</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-22 all partially</u>
	No: Claims	=

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2007/025868

Re Item II

Priority

- 1- The current assessment is based on the assumption that all claims enjoy priority rights from the filing date of the priority document. If it later turns out that is not correct, the documents D1 and D8 cited in the international search report could become relevant.

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

- 2- Note:
Claims 1-13, 16-22 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv) / 67.1(iv)PCT.
- 3- Method of treatment (further medical use) claims 1-6, 15, 16-22 do not meet the requirements of Art. 6 PCT. The therapeutic application is functionally defined by a mechanism of action ("increasing red blood cell levels") which does not allow any practical application in the form of a defined, real treatment of a pathological condition (disease). The objection could be overcome by introducing into these claims the pathological condition (disease) cited in the application, for which the treatment is intended, namely anemia.

At present, claims 1-6, 15-22 neither define a disease, nor a specific group of patients to be treated. Hence, any therapeutic use of the compounds employed in claims 1-6, 15-22 in the prior art anticipates the subject matter of these claims, as it will inevitably result in an increase of red blood cell levels, independently of the therapeutic indication disclosed in that prior art (see item V below).
- 4- Claim 2 does not meet the requirements of Article 6 PCT in that the matter for which protection is sought is not clearly defined. The claim attempts to define the subject-matter (the ActRII polypeptide a-f)) in terms of the result to be achieved ((i) binds to an ActRII ligand with a K_D of at least 10^{-7} M; and ii) inhibits ActRII signalling in a cell"), which

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2007/025868

merely amounts to a statement of the underlying problem, without providing the further technical features necessary for achieving this result. This objection applies mutatis mutandis to claims 3, 6, 10, 11.

- 5- Claim 7 does not meet the requirements of Article 6 PCT in that the matter for which protection is sought is not clearly defined. The claim attempts to define the subject-matter (therapeutic agent to be used) in terms of the result to be achieved ("an activin-ActRII antagonist"), which merely amounts to a statement of the underlying problem, without providing the technical features necessary for achieving this result. Claim 7 lacks therefore clarity, support and disclosure, since the skilled person, after reading the description, would not be able to perform the invention over the whole area claimed without undue burden and without needing inventive skill (Art. 6 and 5 PCT).

Claim 7 encompasses a genus of compounds defined only by their function wherein the relationship between the structural features of the members of the genus and said function have not been defined. In the absence of such a relationship either disclosed in the application as originally filed or which would have been recognised based on information readily available to the skilled man, the skilled person would not know how to make and use compounds that lack any structural definition. It would require undue experimentation (be an undue burden) to randomly screen undefined compounds for the claimed activity.

The same applies to claims 8, 13, 15, which fail to define the antagonist to be used in technical terms.

- 6- Claim 14 does not meet the requirements of Art. 6 PCT in that it does not define the method of identifying an agent that increases red blood cell levels in technical terms, but merely by the result to be achieved: "a) identifying a test agent that binds to a ligand-binding domain of an ActRII polypeptide competitively with an ActRII ligand" without providing the necessary technical steps to do so.
- 7- In view of the above objections, it is not at present possible to formulate a complete opinion regarding the novelty, inventive step and industrial applicability of claims 1-22.

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

PCT

To:

MATTHEW P. VINCENT
ROPES & GRAY LLP
ONE INTERNATIONAL PLACE
BOSTON, MASSACHUSETTS 02110

INVITATION TO CORRECT PRIORITY CLAIM
AND/OR NOTIFICATION OF POSSIBILITY
TO REQUEST RESTORATION OF
THE RIGHT OF PRIORITY

(PCT Rules 4.10, 26bis.1, 26bis.2(a) and (b), 26bis.3)

Date of mailing (day:month/year)		19 Feb 2008
Applicant's or agent's file reference PHPH-022-WO1		REPLY DUE See items 1 and 2
International application No. PCT/US2007/025868	International filing date (day:month/year) 19 Dec 2007	Priority date (day:month/year) 18 Dec 2006
Applicant ACCELERON PHARMA INC.		

1. ☒ The applicant is hereby invited to correct, by a notice submitted to the receiving Office, within the time limit indicated below, defects in the priority claim as indicated in Annex A.

Time limit to respond to this Invitation (Rule 26bis.1(a)):

- within 16 months from the (earliest) priority date; or
- if the (earliest) priority date is changed as a result of the correction or addition of the (earliest) priority claim, within 16 months from that (earliest) priority date so changed,
- whichever expires first, provided that such a notice may, in any event, be submitted until the expiration of four months from the international filing date.

Failure to respond to this Invitation within the prescribed time limit may result in the priority claim concerned to be considered void for the purposes of the procedure under the PCT (Rule 26bis.2(b)).

2. ☒ The international filing date of the international application is later than the date on which the priority period (Rule 2.4) expired but is within two months from that date. The applicant is hereby notified of the possibility of submitting to the receiving Office, within the time limit indicated below, a request to restore the right of priority as indicated in Annex B.

Time limit to request the restoration of the right of priority (Rule 26bis.3(e)):

- within two months from the date on which the priority period expired.

3. ☐ In the case where multiple priorities have been claimed, this notice relates to the following priority claim:

A copy of this Invitation/Notification is being sent to the International Bureau

File No. PHPH-022-WO1
Action Desc: Priority claim correction
Date: 4.19.08
By: LT

Name and mailing address of the receiving Office Mail Stop PCT, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer Catherine Williams <i>a</i> Telephone No. 703-308-9290 EX 106
---	--

Form PCT/RO 110 (April 2007)

ANNEX A TO FORM PCT/RO/110

International application No.

PCT/US2007/025868

This receiving Office has found the following defects in the priority claim(s):

1. Failure to Comply with the Requirements of Rule 4.10

a. ☒ National application

- ☐ Missing indication of the filing date of the earlier application.
- ☒ Filing date indicated for the earlier application does not fall within the period of 12 months preceding the international filing date.*
- ☐ Missing indication of the number of the earlier application.**
- ☐ Missing indication of the country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, or of the Member of the World Trade Organization that is not party to that Convention, in which the earlier national application was filed.
- ☐ The country indicated is neither a party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property nor a Member of the World Trade Organization.

b. ☐ Regional application

- ☐ Missing indication of the filing date of the earlier application.
- ☐ Filing date indicated for the earlier application does not fall within the period of 12 months preceding the international filing date.*
- ☐ Missing indication of the number of the earlier application.**
- ☐ Missing indication of the authority entrusted with the granting of regional patents under the applicable regional patent treaty.
- ☐ The authority indicated as the authority entrusted with the granting of regional patents does not grant regional patents.
- ☐ The priority claim in relation to the ARIPO application does not indicate either at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, or at least one Member of the World Trade Organization, for which the earlier application was filed.

c. ☐ International application

- ☐ Missing indication of the filing date of the earlier application.
- ☐ Filing date indicated for the earlier application does not fall within the period of 12 months preceding the international filing date.*
- ☐ Missing indication of the number of the earlier application.**
- ☐ Missing indication of the receiving Office with which it was filed.

2. Inconsistency with the Corresponding Indications in the Priority Document**

a. ☐ Inconsistency with regard to the filing date of the earlier application:

The request indicates:

The priority document indicates:

b. ☐ Inconsistency with regard to the number of the earlier application:

The request indicates:

The priority document indicates:

c. ☐ Inconsistency with regard to the country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or the Member of the World Trade Organization in which the national application was filed:

The request indicates:

The priority document indicates:

d. ☐ Inconsistency with regard to the authority entrusted with the granting of regional patents under the applicable regional patent treaty:

The request indicates:

The priority document indicates:

e. ☐ Inconsistency with regard to the receiving Office with which the international application was filed:

The request indicates:

The priority document indicates:

* If the international filing date is later than the date on which the priority period expired, but is within two months from that expiration date, the priority claim will not be considered void (Rule 26bis.2(c)(ii)).

** Even if the defect is not corrected in response to this invitation, the priority claim concerned will not be considered void (Rule 26bis.2(c)(i) and (ii)).

ANNEX B TO FORM PCT/RO/110

International application No.

PCT/US2007/025868

NOTIFICATION OF POSSIBILITY TO REQUEST RESTORATION OF THE RIGHT OF PRIORITY
(Rule 26bis.3)

The international filing date of the international application is later than the date on which the priority period (Rule 2.4) expired but is within two months from that date. If the filing date of the earlier application has been indicated correctly and no request for correction of that filing date is submitted under Rule 26bis.1(a), the applicant may submit to the receiving Office, within the time limit indicated below, a request to restore the right of priority.

REQUEST TO RESTORE THE RIGHT OF PRIORITY

The request to restore the right of priority must be filed within two months from the date on which the priority period expired provided that, where the applicant makes a request for early publication under Article 21(2)(b), the request must be submitted before technical preparations for international publication have been completed (Rule 26bis.3(e)).

The request to restore the right of priority must state the reasons for the failure to file the international application within the priority period. This receiving Office will restore the right of priority if it finds that the following criterion or one of the following criteria for restoration is satisfied, namely that the failure to file the international application within the priority period:

☐ occurred in spite of due care required by the circumstances having been taken,

and/or

☒ was unintentional.

☒ This receiving Office may invite the applicant to furnish a declaration or other evidence in support of the statement of reasons (Rule 26bis.3(f)). Preferably, such declaration or other evidence should already be furnished together with the request for restoration of the right of priority.

FEE PAYMENT

☒ The submission of the request to restore the right of priority is subject to the payment of a fee, payable within two months from the date on which the priority period expired, in the amount of:

☐ (amount/currency) for restoration based on the criterion of due care;

or

☒ \$400.00 (amount/currency) for restoration based on the criterion of unintentional.

☐ No fee payment is required.

Docket: PHPH-022-WO1

IN THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE
UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY

In re Application of: Acceleron Pharma Inc.
Int'l Appln. No.: PCT/US2007/025868
Int'l Filing Date: 18 December 2007
For: ACTIVIN-ACTRIIA ANTAGONISTS AND USES FOR INCREASING RED
BLOOD CELL LEVELS

**RESPONSE TO INVITATION TO CORRECT PRIORITY CLAIM
IN THE INTERNATIONAL APPLICATION**

Mail Stop PCT
Authorized Officer: Catherine Williams
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450
Attn.: RO/US

Madam:

In Response to the Invitation to Correct Priority Claim mailed 19 February 2008 (19.02.2008) in connection with the above-referenced international application and pursuant to 37 CFR §1.10(c), Applicant hereby petitions for the correction of the international filing date of the above-identified international application to **18 December 2007 (18.12.2007)**. The presently recorded international filing date is 19 December 2007 (19.12.2007).

Pursuant to 37 CFR §1.10(a), any correspondence received by the US Patent & Trademark Office (USPTO) that was delivered as "Express Mail Post Office to Addressee" by the US Postal Service (USPS) will be considered to be filed with the USPTO on the date of deposit with the USPS. Applicant asserts that the present application was mailed by "Express Mail Post Office to Addressee" mail and deposited with the USPS on 18 December 2007 (18.12.2007). Attached hereto is (1) a copy of the receipt of Express Mail Label No. EV970409162US confirming the correct date of mailing to the RO/US as 18 December 2007 (18.12.2007); and (2) a copy of the Transmittal Letter to the RO/US, dated 18 December 2007 (18.12.2007), for the PCT Request, application and related documents and indicating the Express Mail No. as EV970409162US.

cket: PHPH-022-WO1

Accordingly, Applicant asserts that the criteria for a successful petition under 37 CFR §1.10(c) are met and requests the correction of the international filing date and the issuance of a new, corrected filing receipt (Form PCT/RO/105) indicating **18 December 2007** (18.12.2007) as the international filing date.

Upon correction of the filing date for the above-referenced international application to 18 December 2007 (12.18.2007), the filing date for priority application 60/875,682 (filed 18 December 2006 (18.12.2006)) falls within the period of 12 months preceding the international filing date. Accordingly, the priority period meets the requirements of Rule 2.4 thereby obviating the need to correct the priority claim or request restoration of the right of priority.

It is believed that no fee is due in connection with this paper. In the event any fee variance exists, please charge the fee to our Deposit Account No. 18-1945. A duplicate copy of this letter is enclosed for that purpose.

It is believed that no fee is due in connection with this paper. In the event any fee variance exists, please charge the fee to our Deposit Account No. 18-1945.

Respectfully submitted,


Jennifer K. Holmes, Ph.D., J.D.
Registration No. 46,778

Ropes & Gray LLP
One International Place
Boston, Massachusetts 02110
(617) 951-7933
Dated: 6 March 2008

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the RECEIVING OFFICE

To:
MATTHEW P. VINCENT
ROPES & GRAY LLP
ONE INTERNATIONAL PLACE
BOSTON, MASSACHUSETTS 02110

INVITATION TO CORRECT DEFECTS IN
THE INTERNATIONAL APPLICATION
(PCT Articles 3(4)(i) and 14(1) and Rule 26)

Date of mailing (day month year)	19 Feb 2008
REPLY DUE	within TWO MONTHS from the above date of mailing
International filing date (day month year)	19 Dec 2007
Applicant's or agent's file reference: PHPH-022-WO1	
International application No. PCT/US2007/025868	
Applicant ACCELERON PHARMA INC.	

1. ☒ The applicant is hereby invited, within the time limit indicated above, to correct, in the international application as filed, the defects specified on the attached:
- ☐ Annex A
 - ☐ Annex B1 (text matter of the international application as filed)
 - ☒ Annex C1 (drawings of the international application as filed)

2. ☐ The applicant is hereby invited, within the time limit indicated above, to correct, in the translation of the international application furnished under Rule 12.3 or 12.4, the defects specified on the attached:
- ☐ Annex A
 - ☐ Annex B2 (text matter of the translation of the international application)
 - ☐ Annex C2 (drawings of the translation of the international application)

Additional observations (if necessary):

HOW TO CORRECT THE DEFECTS?

Except where the defect is in the request, any correction must be submitted by filing a replacement sheet embodying the correction and a letter accompanying the replacement sheet, which shall draw attention to the difference between the replaced sheet and the replacement sheet. For a defect in the request, a correction may simply be stated in a letter if it is of such a nature that the correction can be transferred clearly onto the request record copy (Rule 26.4).

ATTENTION

Failure to correct the defects will result in the international application being considered withdrawn by this receiving Office (see Rule 26.5 for further details).

A copy of this invitation and any attachments has been sent to the International Bureau
☒ and the International Searching Authority

Name and mailing address of the receiving Office
Mail Stop PCT, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201
Form PCT/RO/106 (April 2007)

Authorized officer
Catherine Williams

Telephone No. 703-308-9290 EX 106
File No. PHPH-022-WO1

Action Des

Date

by

Correct defect
4/9-08
JMS

ANNEX C1 TO FORM PCT/RO/106

International application No.

PCT/US2007/025868

This receiving Office has found that, with regard to the presentation of the drawings of the international application as filed, the physical requirements are not complied with to the extent that compliance therewith is necessary for:

1. ☒ reasonably uniform international publication (Rules 11 and 26.3(a)(i)) (defects to be specified):

Sheets containing drawings:

- a. ☐ the sheets do not admit of direct reproduction
- b. ☐ the sheets are not free from creases, cracks, folds
- c. ☐ one side of the sheets is not left unused
- d. ☐ the paper of the sheets is not flexible/strong/white/smooth/non-shiny/durable
- e. ☐ the drawings do not commence on a new sheet
- f. ☐ the sheets are not connected as prescribed (Rule 11.4(b))
- g. ☐ the sheets are not A4 size (29.7cm x 21cm)
- h. ☐ the minimum margins on the sheets are not as prescribed (top: 2.5cm; left side: 2.5cm; right side: 1.5cm; bottom: 1cm)
- i. ☐ the file reference number indicated on the sheets does not appear in the left-hand corner of the sheets, within 1.5 cm of the top of the sheets
- j. ☐ the file reference number exceeds the maximum of 12 characters
- k. ☐ the sheets are not free from frames around usable or used surfaces
- l. ☐ the sheets are not numbered in consecutive Arabic numerals (e.g. 1/3, 2/3, 3/3)
- m. ☐ the sheet numbers are not centered at the top or bottom of the sheets
- n. ☐ the sheet numbers are in the margin (see h. above for the size of the margins)
- o. ☐ the sheets contain alterations/overwritings/interlineations/too many erasures
- p. ☒ the sheets contain photocopy marks

Drawings (Rule 11.13):

- a. ☒ do not admit of direct reproduction
- b. ☐ contain unnecessary text matter
- c. ☐ contain words so placed as to prevent translation without interference with lines thereof
- d. ☒ are not executed in durable black color: the lines are not uniformly thick and well-defined
- e. ☐ contain cross-sections not properly hatched
- f. ☐ would not be properly distinguishable in reduced reproduction
- g. ☐ contain scales not represented graphically
- h. ☐ contain numbers, letters and reference lines lacking simplicity and clarity
- i. ☐ contain lines drafted without the aid of drafting instruments
- j. ☐ contain disproportionate elements of a figure not necessary for clarity
- k. ☒ contain numbers and letters of height less than 0.32 cm
- l. ☐ contain letters not conforming to the Latin, and where customary, Greek alphabets
- m. ☐ contain figures on two or more sheets which form a single complete figure but which are not able to be assembled without concealing parts thereof
- n. ☐ contain figures which are not properly arranged and clearly separated
- o. ☐ contain different figures not numbered in consecutive Arabic numerals
- p. ☐ contain different figures not numbered independently of the numbering of the sheets
- q. ☐ are not restricted to reference signs mentioned in the description
- r. ☐ do not contain reference signs that are mentioned in the description
- s. ☐ contain the same feature denoted by different reference signs
- t. ☐ are not arranged in an upright position, clearly separated from one another
- u. ☐ are not presented sideways with the top of the figures at the left side of the sheets

2. ☒ satisfactory reproduction (Rules 11 and 26.3(b)(i))

Further observations (if necessary):

1. (p) Sheet 1/13
2. (a) Figs. 1 & 8 (blurred) 2. (d) Figs. 3a-6b (faded) 2. (k) Figs. 1-6b
New drawings are required

Docket: PHPH-022-W01

IN THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE
UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY

In re Application of: Acceleron Pharma Inc.

Int'l Appln. No.: PCT/US2007/025868

Int'l Filing Date: 18 December 2007

For: ACTIVIN-ACTRII ANTAGONISTS AND USES FOR INCREASING
RED BLOOD CELL LEVELS

**RESPONSE TO INVITATION TO CORRECT DEFECTS
IN THE INTERNATIONAL APPLICATION**

Mail Stop PCT
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450
Attn.: RO/US

Authorized Officer: Catherine Williams

Responsive to the Invitation to Correct Defects dated
19 February 2008, Applicant herewith files substitute
drawings (7 pages, figures 1 through 6 and 8) to replace the
originally filed drawings. Please publish the international
application with the enclosed sheets of drawings.

It is believed that no fee is due in connection with
this paper. In the event any fee variance exists, please
charge the fee to our Deposit Account No. 18-1945. A
duplicate copy of this letter is enclosed for that purpose.

Respectfully submitted,



Jennifer K. Holmes, Ph.D., J.D.
Registration No. 46,778

Ropes & Gray LLP
One International Place
Boston, Massachusetts 02110
(617) 951-7933

Dated: 19 March 2008

1/13

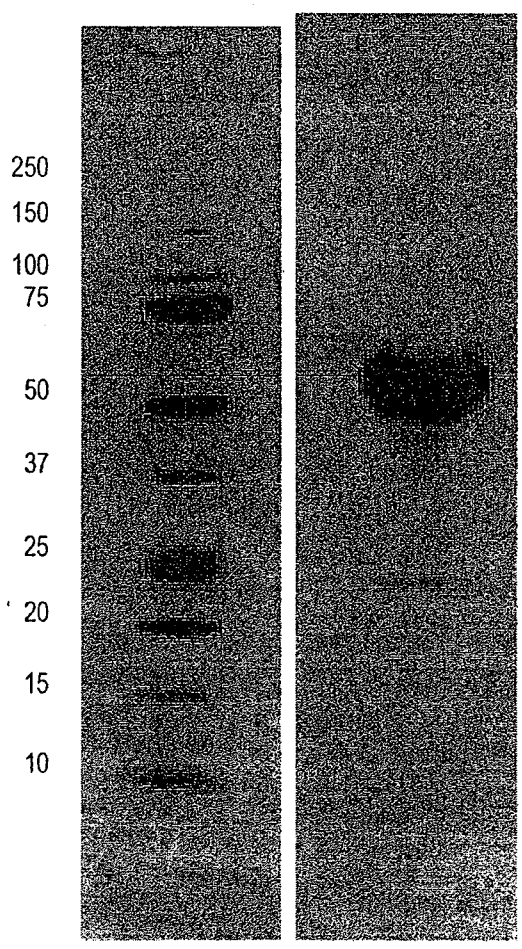
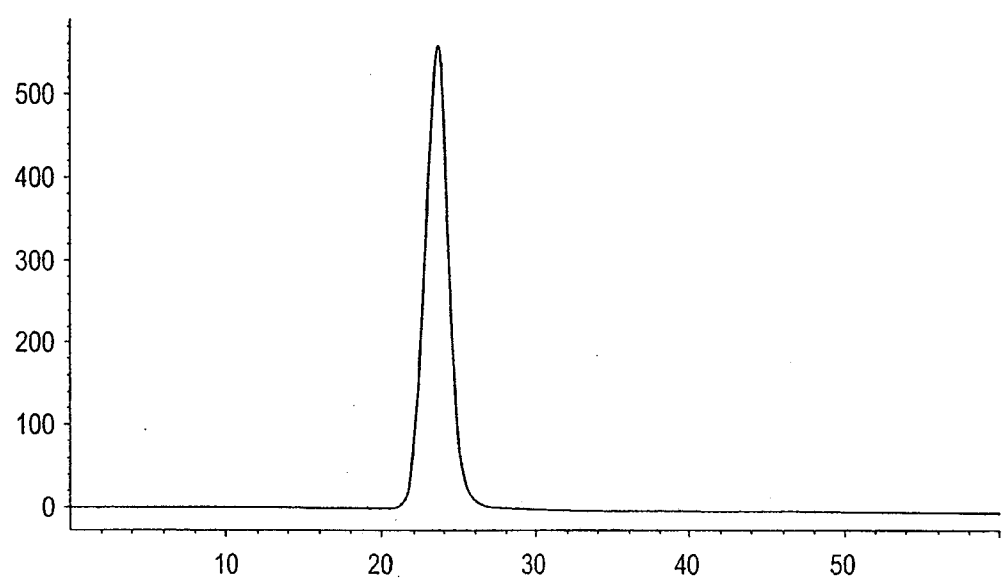


Figure 1

2/13

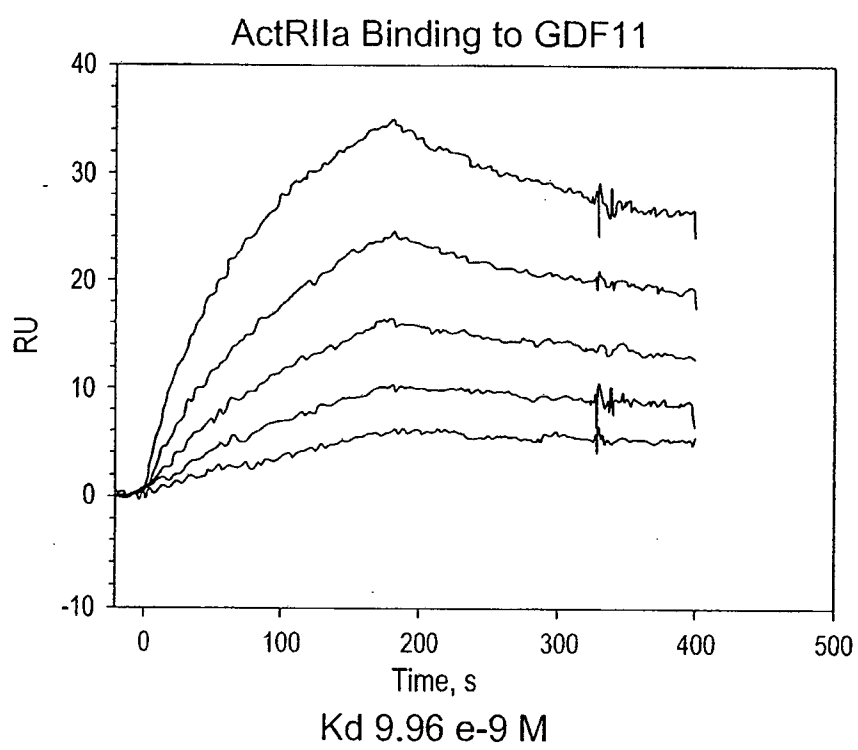
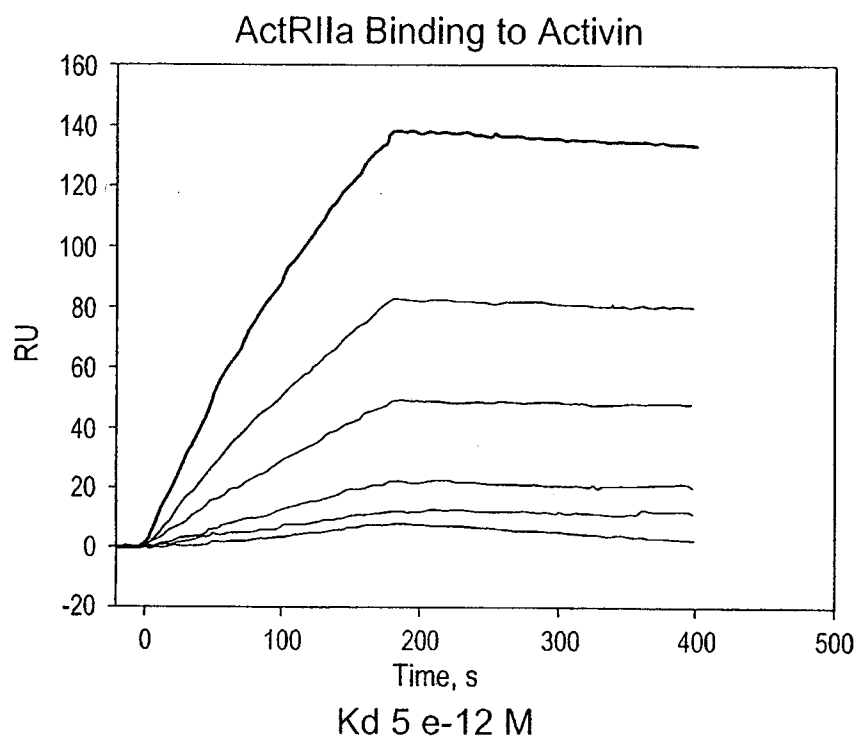


Figure 2

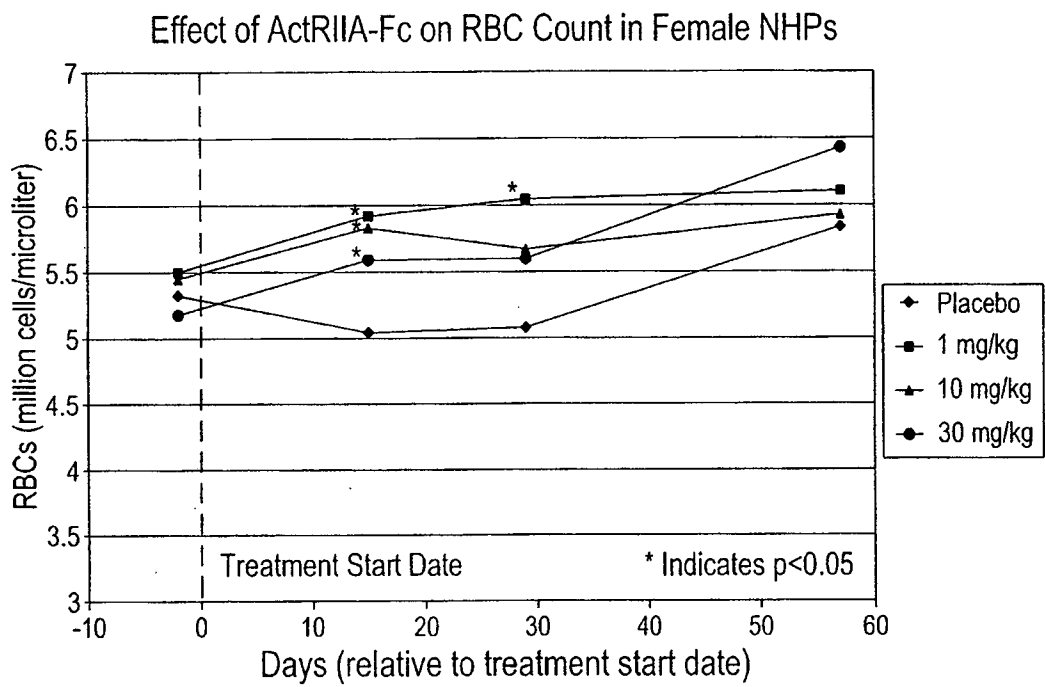


Figure 3A

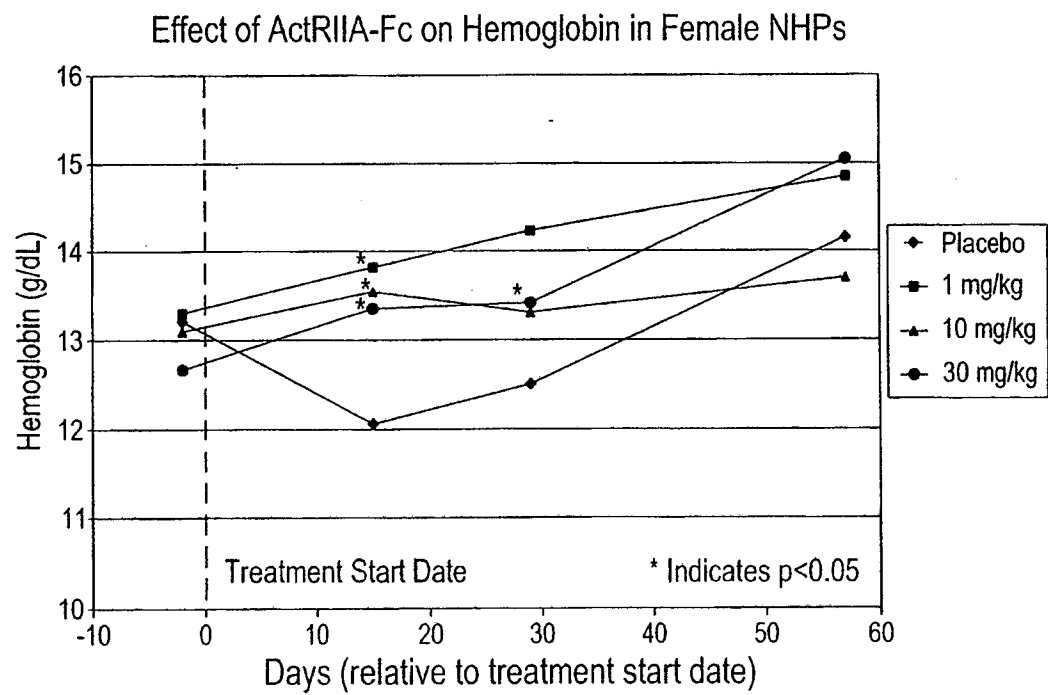


Figure 3B

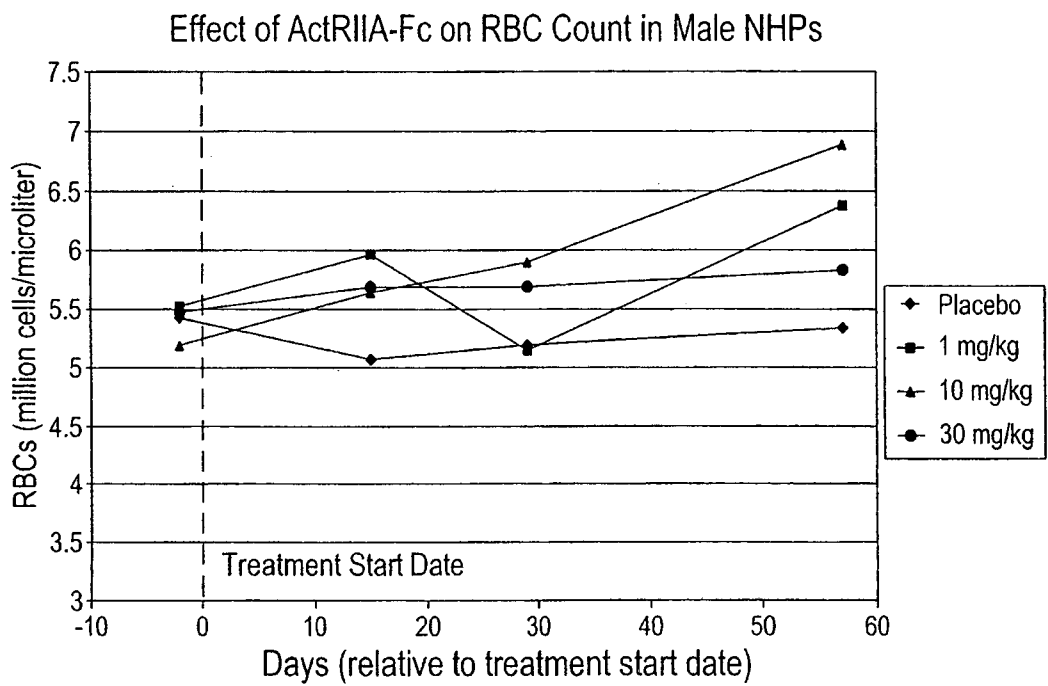


Figure 4A

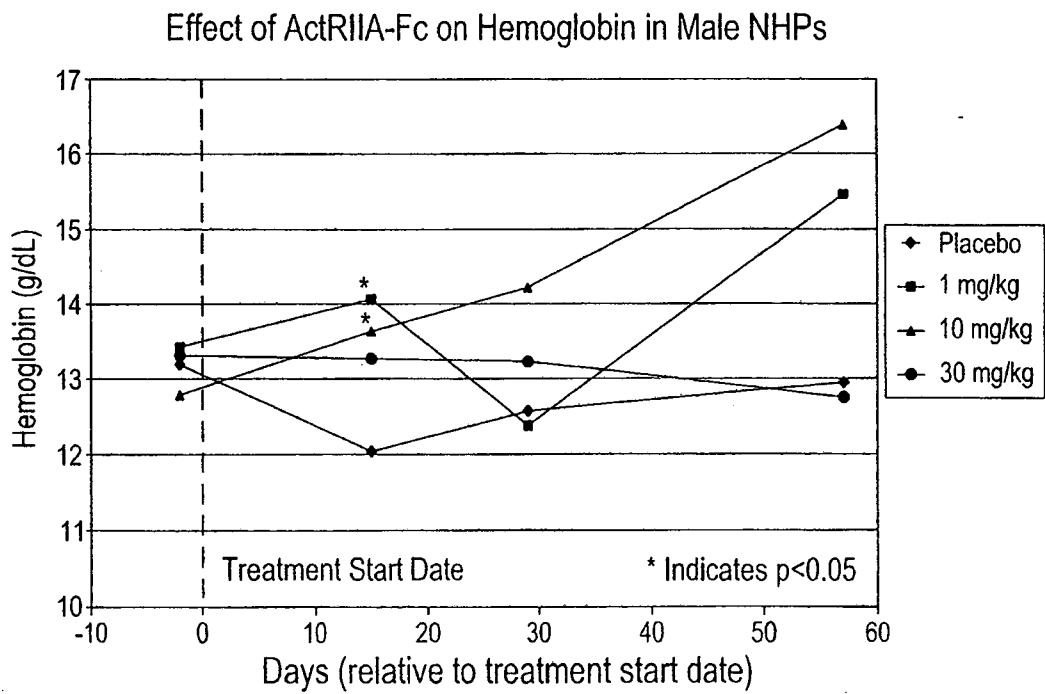


Figure 4B

5/13

Effect of ActRIIA-Fc on Reticulocyte Counts in Female NHPs

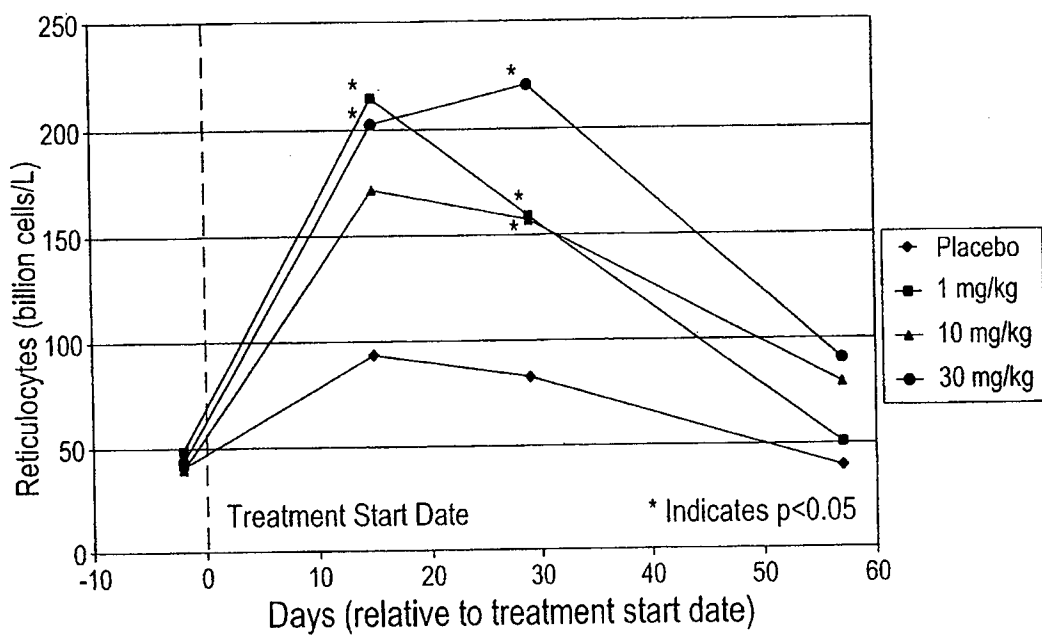


Figure 5A

Effect of ActRIIA-Fc on Reticulocyte Percentage in Female NHPs

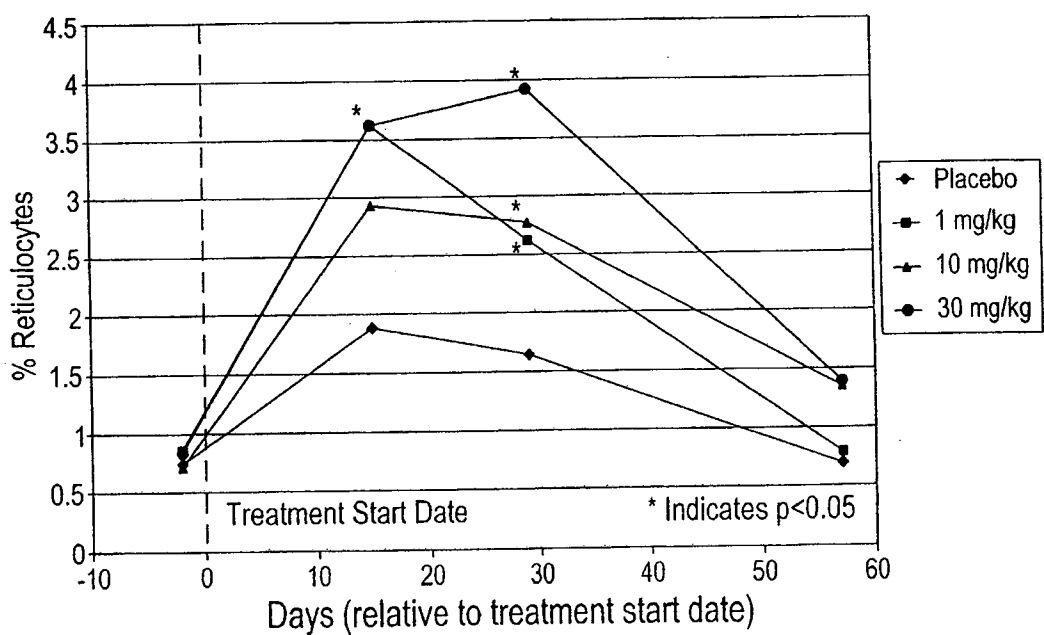


Figure 5B

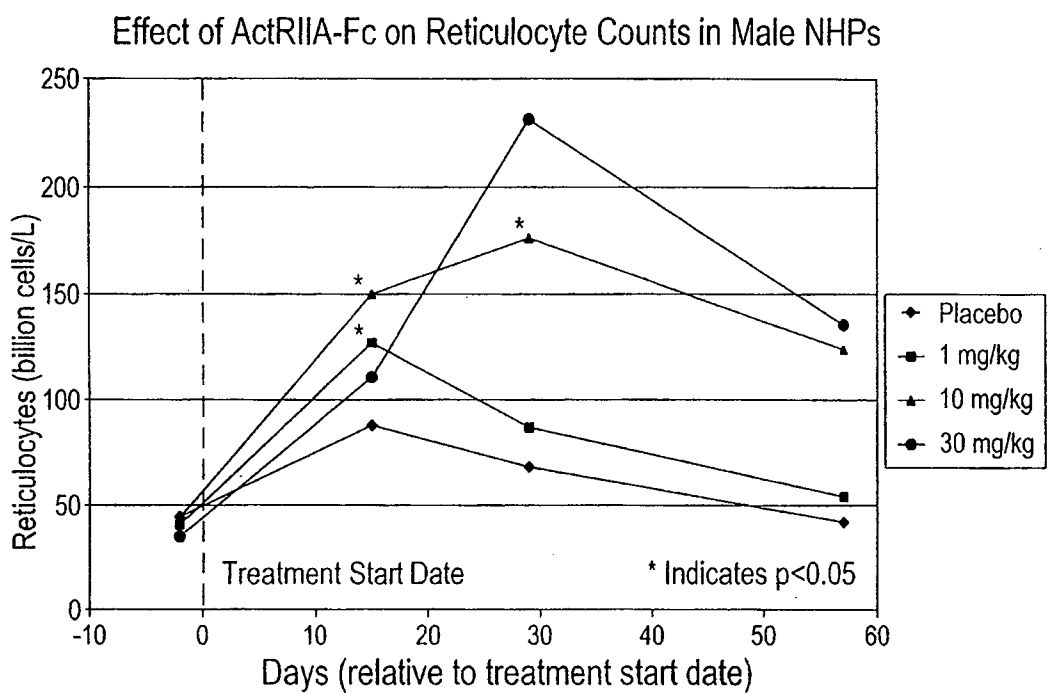


Figure 6A

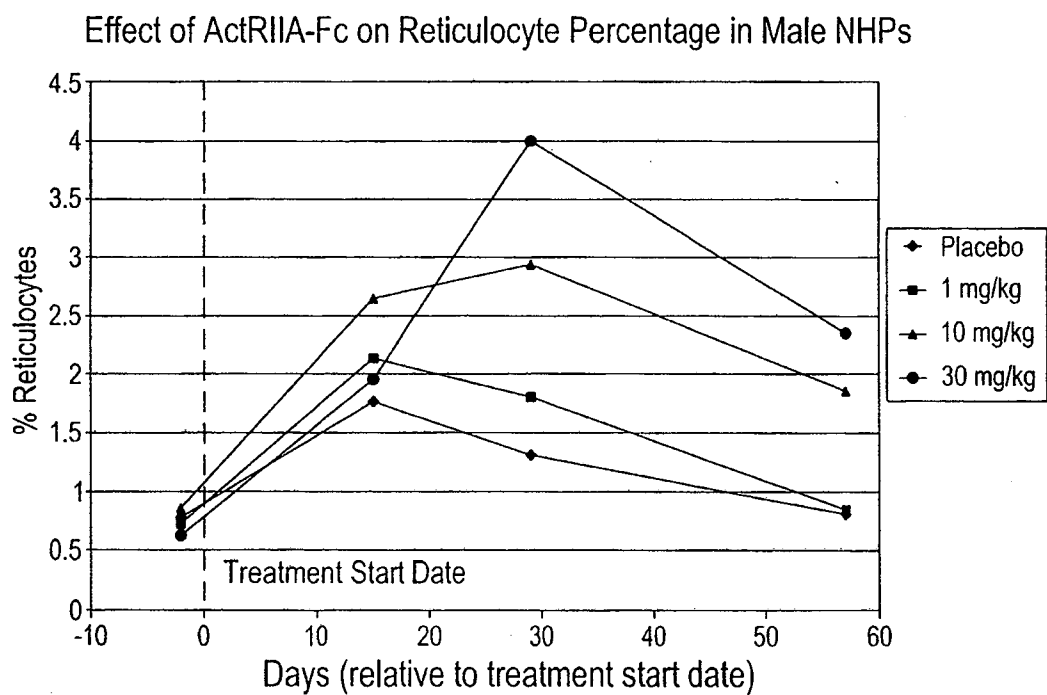


Figure 6B

8/13

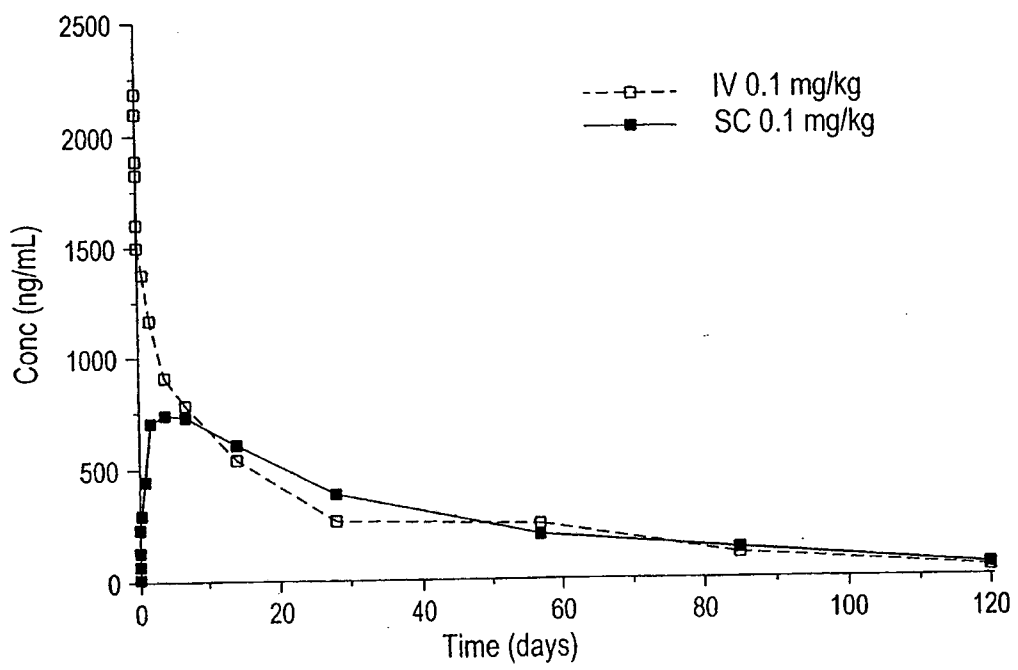


Figure 8

INTERNATIONAL COOPERATION TREATY

Tones & Gray
2008
Intellectual Property Dept.

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To: ROPES & GRAY LLP Attn. Vincent, Matthew P. One International Place Boston, MA 02110 ETATS-UNIS D'AMERIQUE		INVITATION TO FURNISH NUCLEOTIDE AND/OR AMINO ACID SEQUENCE LISTING AND/OR TABLES RELATED THERETO COMPLYING WITH STANDARD AND/OR TECHNICAL REQUIREMENTS (PCT Rule 13ter.1(a) to (d) and Administrative Instructions, Sections 208 and 802 and Annexes C and C-bis)	
		Date of mailing (day/month/year)	28/03/2008
Applicant's or agent's file reference PHPH-022-WO1		REPLY DUE	within 1 months/ ~~days~~ from the above date of mailing
International application No. PCT/US2007/025868		International filing date (day/month/year)	19/12/2007
Applicant ACCELERON PHARMA INC.			

1. The applicant is hereby invited, within the time limit indicated above, to furnish to this Authority:

- ☒ a nucleotide and/or amino acid sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
- ☐ a statement to the effect that the sequence listing on paper, already furnished to this Authority, does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
- ☒ a nucleotide and/or amino acid sequence listing and/or tables related thereto in electronic form complying with the standard and/or technical requirements provided for in Annex C and/or Annex C-bis of the Administrative Instructions, accompanied by a statement that the information recorded in electronic form is identical to the sequence listing and/or tables related thereto on paper.
- ☐ a statement that the information recorded in electronic form (that electronic form having already been furnished to this Authority) is identical to the sequence listing and/or tables related thereto on paper.

2. The applicant is hereby invited, within the time limit indicated above, to pay to this Authority:

- ☒ a late furnishing fee in the amount of EUR 200.00 (currency/amount).

3. Failure to comply with this invitation may result in this Authority only carrying out the international search to the extent that a meaningful search can be carried out without the sequence listing.

4. Further observations (if necessary):

IMPORTANT REMARK: The statements are legally required [See Suppl.No.2 to Official Journal No.11/1998 (page 14, § 37 and 40 and page 64, § III.2)]

File No.: PHPH-022-WO1
 Action Desc: Invitation to furnish seq. listings
 Due Date: 4-23-08
 By: ct vmj

Name and mailing address of the International Searching Authority  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Nina Vercio
--	---------------------------------------

Agent's File Reference: PHPH-022-W01

TO THE EUROPEAN PATENT OFFICE
UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY

Applicant: ACCELERON PHARMA INC.
Int'l Application No.: PCT/US2007/025868
Int'l Filing Date: 18 DECEMBER 2007
Title: ACTIVIN-ACTRII ANTAGONISTS AND USES FOR INCREASING
RED BLOOD CELL LEVELS

RESPONSE TO INVITATION TO FURNISH SEQUENCE LISTING
IN THE INTERNATIONAL APPLICATION

Via DHL WORLDWIDE EXPRESS

European Patent Office
P.B.5818
Patentlaan 2
NL-2288 HV Rijswijk
THE NETHERLANDS

Attn.: Nina Vercio

In response to the Invitation to Furnish Sequence Listing for the above-referenced International Application dated 28 March 2008, enclosed is a written form (16 pages) and computer readable form (1 diskette) of the sequence listing for the above-identified international application. Also enclosed is EPO Form 1010 for payment of a late furnishing fee (R. 13ter.1(c) and R. 13ter.2 PCT) of EUR 200.00 to be charged to deposit account no. 28300349.

The undersigned hereby states that the information on the computer readable form (diskette) and the written form of the Sequence Listing submitted herewith comply with the standard and/or technical requirements provided for in Annex C or Annex C-bis of the Administrative Instructions. The undersigned confirms that the information recorded in the enclosed diskette (computer readable form) is identical to the enclosed written form of the sequence listing related thereto. Also, the written form of the sequence listing and

Agent's File Reference: PHPH-022-W01
PCT/US2007/025868

the computer readable form (diskette) do not go beyond the disclosure in the international application as filed.

It is believed that no additional fee is due in connection with this paper. In the event any fee variance exists, please charge the fee to our Deposit Account No. 28300349.

Respectfully submitted,


Jennifer K. Holmes, Ph.D., J.D.
Agent for Applicant
Registration No. 46,778

Fish & Neave IP Group
Ropes & Gray LLP
One International Place
Boston, Massachusetts 02110-2624
(617) 951-7000

Dated: 24 April 2008

IN THE EUROPEAN PATENT OFFICE
BEFORE THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Atty. Docket No: PHPH-022-W01

In re International Application:

ACCELERON PHARMA INC.

International Application No. PCT/US07/025868

International Filing Date: December 18, 2007

For: ACTIVIN-ACTRII ANTAGONISTS AND USES FOR INCREASING RED
BLOOD CELL LEVELS

European Patent Office
Storage and Retrieval of Amino
Acid and Nucleotide Data
Room POH09
Patentlaan 2
P.B. 5818
NL-2280 HV Rijswijk
The Netherlands

STATEMENT ACCOMPANYING SEQUENCE LISTING

Dear Sir:

The undersigned hereby states that the Sequence Listing
submitted concurrently herewith does not include matter which goes
beyond the content of the application as filed.

Respectfully submitted,

April 16, 2008
Date

/bridget conroy/
Bridget Conroy

HARBOR CONSULTING IP SERVICES, INC.
1500A Lafayette Road, #262
Portsmouth, N.H. 03801
800-318-3021

PHPH22WO.TXT
SEQUENCE LISTING

<110> ACCELERON PHARMA INC.

<120> ACTIVIN-ACTRII ANTAGONISTS AND USES FOR INCREASING RED
BLOOD CELL LEVELS

<130> PHPH-022-W01

<140> PCT/US07/025868

<141> 2007-12-18

<150> 60/875,682

<151> 2006-12-18

<160> 23

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 513

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Ser Ser Gly Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe
20 25 30

Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu
35 40 45

Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp
50 55 60

Lys Asn Ile Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu
65 70 75 80

Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp
85 90 95

Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu
100 105 110

Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn
115 120 125

Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Tyr Tyr Asn Ile Leu Leu Tyr Ser Leu
130 135 140

Val Pro Leu Met Leu Ile Ala Gly Ile Val Ile Cys Ala Phe Trp Val
145 150 155 160

Tyr Arg His His Lys Met Ala Tyr Pro Pro Val Leu Val Pro Thr Gln
165 170 175

Asp Pro Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Leu Gly Leu Lys Pro Leu
180 185 190

Gln Leu Leu Glu Val Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys
195 200 205

Ala Gln Leu Leu Asn Glu Tyr Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Ile Gln
210 215 220

PHPH22W0.TXT

Asp Lys Gln Ser Trp Gln Asn Glu Tyr Glu Val Tyr Ser Leu Pro Gly
 225 230 235 240
 Met Lys His Glu Asn Ile Leu Gln Phe Ile Gly Ala Glu Lys Arg Gly
 245 250 255
 Thr Ser Val Asp Val Asp Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Glu Lys
 260 265 270
 Gly Ser Leu Ser Asp Phe Leu Lys Ala Asn Val Val Ser Trp Asn Glu
 275 280 285
 Leu Cys His Ile Ala Glu Thr Met Ala Arg Gly Leu Ala Tyr Leu His
 290 295 300
 Glu Asp Ile Pro Gly Leu Lys Asp Gly His Lys Pro Ala Ile Ser His
 305 310 315 320
 Arg Asp Ile Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Asn Asn Leu Thr Ala
 325 330 335
 Cys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Leu Lys Phe Glu Ala Gly Lys Ser
 340 345 350
 Ala Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro
 355 360 365
 Glu Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg
 370 375 380
 Ile Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Ala Ser Arg
 385 390 395 400
 Cys Thr Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu
 405 410 415
 Glu Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Asp Met Gln Glu Val Val
 420 425 430
 Val His Lys Lys Lys Arg Pro Val Leu Arg Asp Tyr Trp Gln Lys His
 435 440 445
 Ala Gly Met Ala Met Leu Cys Glu Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His
 450 455 460
 Asp Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Gly Glu Arg Ile Thr
 465 470 475 480
 Gln Met Gln Arg Leu Thr Asn Ile Ile Thr Thr Glu Asp Ile Val Thr
 485 490 495
 Val Val Thr Met Val Thr Asn Val Asp Phe Pro Pro Lys Glu Ser Ser
 500 505 510
 Leu

<210> 2
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn
 1 5 10 15

PHPH22WO.TXT

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

<210> 3
<211> 100
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 3
Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn
1 5 10 15
Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly
20 25 30
Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser
35 40 45
Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn
50 55 60
Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val
65 70 75 80
Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr
85 90 95
Phe Pro Glu Met
100

<210> 4
<211> 1542
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
atgggagctg ctgcaaagtt ggcgtttgcc gtctttctta tctcctgttc ttcaggtgct 60
atacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 120
agaaccaatc aaactggtgt tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 180
tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaaacaagg ttgttggtctg 240
gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta 300
tatttttgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg 360
gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaagc caccctatta caacatcctg 420

PHPH22WO.TXT

ctctattcct	tggtgccact	tatgttaatt	gcggggattg	tcatttgtgc	attttgggtg	480
tacaggcatc	acaagatggc	ctaccctcct	gtacttgttc	caactcaaga	cccaggacca	540
cccccacctt	ctccattact	agggttgaaa	ccactgcagt	tattagaagt	gaaagcaagg	600
ggaagatttg	gttgtgtctg	gaaagcccag	ttgcttaacg	aatatgtggc	tgtcaaaaata	660
tttccaatac	aggacaaaca	gtcatggcaa	aatgaatacg	aagtctacag	tttgcctgga	720
atgaagcatg	agaacatatt	acagttcatt	ggtgcagaaa	aacgaggcac	cagtgttgat	780
gtggatcttt	ggctgatcac	agcatttcatt	gaaaagggtt	cactatcaga	ctttcttaag	840
gctaattgtg	tctcttggaa	tgaactgtgt	catattgcag	aaaccatggc	tagaggattg	900
gcatattttac	atgaggatat	acctggccta	aaagatggcc	acaaacctgc	catatctcac	960
agggacatca	aaagtaaaaa	tgtgctgttg	aaaaacaacc	tgacagcttg	cattgctgac	1020
tttggtgttg	cttataaatt	tgaggctggc	aagtcctgcag	gcgataccca	tggaacagggt	1080
ggtaccggga	ggtacatggc	tccagaggta	ttagagggtg	ctataaaactt	ccaaagggat	1140
gcatttttga	ggatagatat	gtatgccatg	ggattagtcc	tatgggaact	ggcttctcgc	1200
tgtactgctg	cagatggacc	tgtagatgaa	tacatgttgc	catttgagga	ggaaattggc	1260
cagcatccat	ctcttgaaga	catgcaggaa	gttgttgtgc	ataaaaaaaa	gaggcctgtt	1320
ttaagagatt	attggcagaa	acatgctgga	atggcaatgc	tctgtgaaac	cattgaagaa	1380
tgttgggatc	acgacgcaga	agccaggtta	tcagctggat	gtgtagggtg	aagaattacc	1440
cagatgcaga	gactaacaaa	tattattacc	acagaggaca	ttgtaacagt	ggtcacaatg	1500
gtgacaaatg	ttgactttcc	tcccaaagaa	tctagtctat	ga		1542

<210> 5
<211> 345
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
atacttggtgta gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 60
agaaccaatc aaactgggtgt tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 120
tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaacaagg ttgttggctg 180
gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta 240
tatttttgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg 300
gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaagc cacc 345

<210> 6
<211> 225
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>
<221> MOD_RES
<222> (43)
<223> Asp or Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (100)
<223> Lys or Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (212)
<223> His or Ala

<400> 6
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
1 5 10 15

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
20 25 30

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Xaa Val Ser His Glu Asp
Page 4

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

Lys
225

<210> 7
<211> 344
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
construct

<400> 7
Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn
1 5 10 15
Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly
20 25 30
Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser
35 40 45
Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn
50 55 60
Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val
65 70 75 80
Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr
85 90 95

PHPH22WO.TXT

Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro
100 105 110

Lys Pro Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
115 120 125

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
130 135 140

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
145 150 155 160

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
165 170 175

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
180 185 190

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
195 200 205

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
210 215 220

Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
225 230 235 240

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
245 250 255

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
260 265 270

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
275 280 285

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
290 295 300

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
305 310 315 320

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
325 330 335

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340

<210> 8
<211> 21
<212> PRT
<213> Apis mellifera

<400> 8
Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
1 5 10 15

Ser Tyr Ile Tyr Ala
20

<210> 9
<211> 22
<212> PRT
<213> Unknown Organism

PHPH22WO.TXT

<220>

<223> Description of Unknown Organism: Tissue Plasminogen Activator leader sequence

<400> 9

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro
20

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Unknown Organism

<220>

<223> Description of Unknown Organism: Native leader sequence

<400> 10

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

Ser Ser Gly Ala
20

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 11

Ile Leu Gly Arg Ser Thr Gln Glu
1 5

<210> 12

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic construct

<400> 12

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn
1 5 10 15

Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly
20 25 30

Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser
35 40 45

Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn
50 55 60

Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val
65 70 75 80

PHPH22WO.TXT

Tyr Phe Cys Cys Cys₈₅ Glu Gly Asn Met Cys₉₀ Asn Glu Lys Phe Ser₉₅ Tyr
Phe Pro Glu Met₁₀₀ Thr Gly Gly Gly Thr₁₀₅ His Thr Cys Pro₁₁₀ Cys Pro
Ala Pro Glu₁₁₅ Leu Leu Gly Gly Pro₁₂₀ Ser Val Phe Leu Phe₁₂₅ Pro Pro Lys
Pro Lys₁₃₀ Asp Thr Leu Met Ile₁₃₅ Ser Arg Thr Pro Glu₁₄₀ Val Thr Cys Val
Val₁₄₅ Val Asp Val Ser His₁₅₀ Glu Asp Pro Glu Val₁₅₅ Lys Phe Asn Trp Tyr₁₆₀
Val Asp Gly Val Glu₁₆₅ Val His Asn Ala Lys₁₇₀ Thr Lys Pro Arg Glu₁₇₅ Glu
Gln Tyr Asn Ser₁₈₀ Thr Tyr Arg Val Val₁₈₅ Ser Val Leu Thr Val₁₉₀ Leu His
Gln Asp Trp₁₉₅ Leu Asn Gly Lys Glu₂₀₀ Tyr Lys Cys Lys Val₂₀₅ Ser Asn Lys
Ala Leu₂₁₀ Pro Val Pro Ile Glu₂₁₅ Lys Thr Ile Ser Lys₂₂₀ Ala Lys Gly Gln
Pro Arg Glu Pro Gln Val₂₃₀ Tyr Thr Leu Pro Pro₂₃₅ Ser Arg Glu Glu Met₂₄₀
Thr Lys Asn Gln Val₂₄₅ Ser Leu Thr Cys Leu₂₅₀ Val Lys Gly Phe Tyr₂₅₅ Pro
Ser Asp Ile Ala₂₆₀ Val Glu Trp Glu Ser₂₆₅ Asn Gly Gln Pro Glu₂₇₀ Asn Asn
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu₂₈₀ Asp Ser Asp Gly Ser₂₈₅ Phe Phe Leu
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp₂₉₅ Lys Ser Arg Trp Gln₃₀₀ Gln Gly Asn Val
Phe Ser Cys Ser Val Met₃₁₀ His Glu Ala Leu His₃₁₅ Asn His Tyr Thr Gln₃₂₀
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 13
<211> 369
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic construct

<400> 13
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr
20 25 30

Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn
Page 8

PHPH22WO.TXT

35 40 45
 Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His
 50 55 60
 Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys
 65 70 75 80
 Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys
 85 90 95
 Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly
 100 105 110
 Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr
 115 120 125
 Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Thr Gly Gly Gly
 130 135 140
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 145 150 155 160
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 165 170 175
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 180 185 190
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 195 200 205
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 210 215 220
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 225 230 235 240
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys
 245 250 255
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 260 265 270
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 275 280 285
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 290 295 300
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 305 310 315 320
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 325 330 335
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 340 345 350
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 355 360 365
 Lys

<210> 14

PHPH22WO.TXT

<211> 1114

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 14

```

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60
tcgcccggcg ccgctatact tggtagatca gaaactcagg agtgtctttt tttaatgcta 120
attgggaaaa agacagaacc aatcaaactg gtgttgaacc gtgttatggt gacaaagata 180
aacggcggca ttgttttgct acctggaaga atatttctgg ttccattgaa tagtgaaaca 240
aggttggttg ctggatgata tcaactgcta tgacaggact gattgtgtag aaaaaaaga 300
cagccctgaa gtatatttct gttgctgtga gggcaatatg tgtaatgaaa agttttctta 360
ttttccggag atggaagtca cacagcccac ttcaaatacca gttacaccta agccaccac 420
cgggtggtgga actcacacat gccacccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc 480
agtcttcctc tttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt 540
cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagtcca actggtacgt 600
ggacggcggt gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac 660
gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta 720
caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agtccccatc gagaaaacca tctccaaagc 780
caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac 840
caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt 900
ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga 960
ctccgacggc tctttcttcc tctatagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca 1020
ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa 1080
gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatgaga attc 1114

```

<210> 15

<211> 512

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

```

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

```

PHPH22WO.TXT
170

165

175

Gly Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu
180 185 190

Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln
195 200 205

Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys
210 215 220

Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys
225 230 235 240

His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn
245 250 255

Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser
260 265 270

Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys
275 280 285

His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp
290 295 300

Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg
305 310 315 320

Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val
325 330 335

Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro
340 345 350

Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu
355 360 365

Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile
370 375 380

Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys
385 390 395 400

Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu
405 410 415

Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val
420 425 430

His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro
435 440 445

Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp
450 455 460

Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu
465 470 475 480

Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu
485 490 495

Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile
500 505 510

PHPH22WO.TXT

<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala
1 5 10 15
Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu
20 25 30
Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala Asn Ser
35 40 45
Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe
50 55 60
Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln
65 70 75 80
Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr
85 90 95
His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro
100 105 110
Thr Ala Pro Thr
115

<210> 17
<211> 101
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 17
Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala
1 5 10 15
Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu
20 25 30
Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala Asn Ser
35 40 45
Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe
50 55 60
Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln
65 70 75 80
Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr
85 90 95
His Leu Pro Glu Ala
100

<210> 18
<211> 1539
<212> DNA
<213> Homo sapiens

PHPH22WO.TXT

<400> 18

atgacggcgc	cctgggtggc	cctcgccctc	ctctggggat	cgctgtggcc	cggtctctggg	60
cgtggggagg	ctgagacacg	ggagtgcata	tactacaacg	ccaactggga	gctggagcgc	120
accaaccaga	gcggcctgga	gcgctgcaaa	ggcagcagc	acaagcggct	gcactgctac	180
gcctcctggg	ccaacagctc	tggcaccatc	gagctcgtga	agaagggctg	ctggctagat	240
gacttcaact	gctacgatag	gcaggagtgt	gtggccactg	aggagaaccc	ccagggtgtac	300
ttctgctgct	gtgaaggcaa	cttctgcaac	gagcgcttca	ctcatttgcc	agaggctggg	360
ggcccgggaag	tcacgtacga	gccacccccg	acagccccc	ccctgctcac	ggtgctggcc	420
tactcactgc	tgcccacatc	gggcctttcc	ctcatcgctc	tgctggcctt	ttggatgtac	480
cggcatcgca	agcccccta	cggatcatgt	gacatccatg	aggaccctgg	gcctccacca	540
ccatccccctc	tgggtgggct	gaagccactg	cagctgctgg	agatcaaggc	tcgggggagc	600
tttggtctgt	tctggaaggc	ccagctcatg	aatgactttg	tagctgtcaa	gatcttccca	660
ctccaggaca	agcagtcgtg	gcagagtga	cgggagatct	tcagcacacc	tggcatgaag	720
cacgagaacc	tgctacagtt	cattgctgcc	gagaagcgag	gctccaacct	cgaagtagag	780
ctgtggctca	tcacggcctt	ccatgacaag	ggctccctca	cggattacct	caagggggaa	840
atcatcacat	ggaacgaact	gtgtcatgta	gcagagacga	tgctcacgag	cctctcatac	900
ctgcatgagg	atgtgccctg	gtgccgtggc	gagggccaca	agccgtctat	tgcccacagg	960
gactttaaaa	gtaagaatgt	attgctgaag	agcgacctca	cagccgtgct	ggctgacttt	1020
ggcttggtctg	ttcgatttga	gccagggaaa	cctccagggg	acaccacagg	acaggtaggc	1080
acgagacggg	acatggctcc	tgaggtgctc	gagggagcca	tcaacttcca	gagagatgcc	1140
ttcctgcgca	ttgacatgta	tgccatgggg	ttggtgctgt	gggagcttgt	gtctcgctgc	1200
aaggctgcag	acggaccctg	ggatgagtac	atgctgccct	ttgaggaaga	gattggccag	1260
cacccttcgt	tggaggagct	gcaggaggtg	gtggtgcaca	agaagatgag	gcccaccatt	1320
aaagatcact	ggttgaaaca	cccgggcctg	gcccagcttt	gtgtgaccat	cgaggagtgc	1380
tgggaccatg	atgcagaggc	tcgcttgctc	gcgggctgtg	tggaggagcg	ggtgtccctg	1440
attcggaggt	cgggtcaacg	cactacctcg	gactgtctcg	tttccctggg	gacctctgtc	1500
accaatgtgg	acctgcccc	taaagagtca	agcatctaa			1539

<210> 19

<211> 348

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

tctgggcgtg	gggaggctga	gacacgggag	tgcattctact	acaacgccaa	ctgggagctg	60
gagcgcacca	accagagcgg	cctggagcgc	tgcgaaggcg	agcaggacaa	gcggctgcac	120
tgctacgcct	cctgggcca	cagctctggc	accatcgagc	tcgtgaagaa	gggctgctgg	180
ctagatgact	tcaactgcta	cgataggcag	gagtggtggt	ccactgagga	gaacccccag	240
gtgtacttct	gctgctgtga	aggcaacttc	tgcaacgagc	gcttcactca	tttgccagag	300
gctggggggc	cggaagtcac	gtacgagcca	cccccgacag	ccccacc		348

<210> 20

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 20

Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala
1 5 10 15

Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu
20 25 30

Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala Asn Ser
35 40 45

Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe
50 55 60

Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln
65 70 75 80

PHPH22WO.TXT

Val Tyr Phe Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr
85 90 95
His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
100 105 110
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
115 120 125
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
130 135 140
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
145 150 155 160
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
165 170 175
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
180 185 190
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
195 200 205
Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
210 215 220
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
225 230 235 240
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
245 250 255
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
260 265 270
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
275 280 285
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
290 295 300
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
305 310 315 320
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 21
<211> 344
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 21
Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala
1 5 10 15

Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu
20 25 30

Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala Asn Ser
Page 14

PHPH22WO.TXT

35 40 45
 Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe
 50 55 60
 Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln
 65 70 75 80
 Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr
 85 90 95
 His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro
 100 105 110
 Thr Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 115 120 125
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 130 135 140
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 145 150 155 160
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 165 170 175
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 180 185 190
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 195 200 205
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 210 215 220
 Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 225 230 235 240
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 245 250 255
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 260 265 270
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 275 280 285
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 290 295 300
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 305 310 315 320
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 325 330 335
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

PHPH22WO.TXT

peptide

<400> 22
Thr Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 23
Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

**ANTAGONISTAS DE ACTIVINA-ACTRII Y USOS PARA AUMENTAR LOS
NIVELES DE GLÓBULOS ROJOS**

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/875.682, presentada el 18 de diciembre de 2006, solicitud que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El glóbulo rojo maduro o eritrocito, es responsable del transporte de oxígeno en los sistemas circulatorios de vertebrados. Los glóbulos rojos portan concentraciones altas de hemoglobina, una proteína que se une al oxígeno en los pulmones a una presión de oxígeno parcial relativamente alta (pO_2) y suministra oxígeno a áreas del organismo con pO_2 relativamente baja.

Los glóbulos rojos maduros se producen a partir de células madre hematopoyéticas pluripotenciales en un proceso denominado eritropoyesis. En individuos postnatales, la eritropoyesis ocurre principalmente en la médula ósea y en la pulpa roja del bazo. La acción coordinada de diversas rutas de señalización controla el equilibrio de la proliferación, diferenciación, supervivencia y muerte celular. En condiciones normales, los glóbulos rojos se producen a una velocidad que mantiene una masa de glóbulos rojos constante en el organismo y la producción puede aumentar o disminuir como respuesta a diversos estímulos, que incluyen tensión de oxígeno aumentada o disminuida o demanda tisular. El proceso de eritropoyesis comienza con la formación de células precursoras comprometidas a linaje y avanza a través de una serie de tipos de células precursoras diferentes. Las etapas finales de la eritropoyesis ocurren cuando los reticulocitos se liberan en el flujo sanguíneo y pierden sus mitocondrias y ribosomas mientras asumen la morfología de glóbulo rojo maduro. Un nivel elevado de reticulocitos o una proporción elevada reticulocito:eritrocito, en la

sangre es indicativa de índices de producción de glóbulos rojos aumentados.

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

Los médicos usan diversas formas de Epo recombinante para aumentar los niveles de glóbulos rojos en una diversidad de situaciones clínicas y, particularmente, para el tratamiento de anemia. La anemia es una afección ampliamente definida caracterizada por niveles inferiores a los normales de hemoglobina o glóbulos rojos en la sangre. En algunos casos, la anemia está causada por un trastorno primario en la producción o supervivencia de glóbulos rojos. Más comúnmente, la anemia es secundaria a enfermedades de otros sistemas (Weatherall & Provan (2000) Lancet 355, 1169-1175). La anemia se puede producir como resultado de una tasa reducida de producción o tasa aumentada de destrucción de glóbulos rojos o por pérdida de glóbulos rojos debida a hemorragia. La anemia se puede producir como resultado de una diversidad de trastornos que incluyen, por ejemplo, fallo renal crónico, síndrome mielodisplásico, artritis reumatoide y trasplante de médula ósea.

El tratamiento con Epo típicamente causa un aumento en la hemoglobina en aproximadamente 1-3 g/dl en seres humanos sanos a lo largo de un periodo 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 eficaz de forma uniforme y muchos individuos son refractarios incluso a dosis elevadas (Hori et al. (2000) Nephrol Dial Transplant 15, 43-50). Más del 50% de pacientes con cáncer tienen una respuesta inadecuada a Epo, aproximadamente el 10% con enfermedad renal en fase final

son hiposensibles (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, que incluyen inflamación, deficiencia de hierro y vitaminas, diálisis inadecuada, toxicidad por aluminio e hiperparatiroidismo pueden pronosticar una respuesta terapéutica mala, hasta ahora los mecanismos moleculares de resistencia a Epo no están claros.

Por tanto, es un objeto de la presente descripción proporcionar composiciones alternativas y métodos para aumentar los niveles de glóbulos rojos en pacientes.

SUMARIO DE LA INVENCION

En parte, la descripción demuestra que los antagonistas de activina, así como antagonistas de ActRIIa y de ActRIIb, se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina. En particular, la descripción demuestra que una forma soluble de ActRIIa actúa como un inhibidor de activina y, cuando se administra *in vivo*, aumenta los niveles de glóbulos rojos en la sangre. Se observó un efecto más suave con una forma soluble de ActRIIb, que se une a activina A con menos afinidad que ActRIIa soluble. Aunque ActRIIa y ActRIIb soluble pueden influir en los niveles de glóbulos rojos a través de un mecanismo diferente al antagonismo a activina, sin embargo, la descripción demuestra que se pueden seleccionar agentes terapéuticos deseables en base a antagonismo a activina o antagonismo a ActRII o ambos. Tales agentes se denominan colectivamente antagonistas de activina-ActRII. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, la descripción proporciona métodos para usar antagonistas de activina-ActRII, que incluyen, por ejemplo, polipéptidos ActRIIa de unión a activina, polipéptidos ActRIIb de unión a activina, anticuerpos anti-activina, anticuerpos anti-ActRIIa, anticuerpos anti-ActRIIb, moléculas pequeñas y aptámeros dirigidos a activina, ActRIIb o ActRIIa y ácidos nucleicos que disminuyen la expresión de activina, ActRIIb o ActRIIa, para aumentar los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina en pacientes y para tratar trastornos asociados con niveles de glóbulos rojos o

hemoglobina bajos en pacientes que lo necesitan. Como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 11/603.485, incorporada como referencia en este documento, los antagonistas de activina-ActRIIa se pueden usar para promover el crecimiento óseo y aumentar la densidad ósea. Como se describe en este documento, los efectos de tales antagonistas sobre los niveles de glóbulos rojos son más rápidos y aparecen a dosis menores que los efectos de tales antagonistas sobre el hueso. Por tanto, en determinadas realizaciones, la descripción proporciona métodos para usar un antagonista de activina-ActRIIa para aumentar los niveles de glóbulos rojos o hemoglobina sin causar un aumento significativo en la densidad ósea. Por ejemplo, un método puede causar un aumento de menos del 3%, el 5%, el 10% o el 15% en la densidad ósea. Este efecto selectivo se puede conseguir usando, por ejemplo, dosis menores de antagonista de activina-ActRIIa, dosis menos frecuentes o usando un antagonista de activina-ActRIIa con una semivida en suero más corta a dosis y frecuencias calculadas para proporcionar una concentración en suero más baja.

En determinados aspectos, la descripción proporciona polipéptidos que comprenden un polipéptido ActRII soluble de unión a activina que se une a la activina. El polipéptido de unión a activina puede ser un polipéptido ActRIIa o un polipéptido ActRIIb. Los polipéptidos ActRII se pueden formular como una preparación farmacéutica que comprende el polipéptido ActRII de unión a activina y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El polipéptido ActRII de unión a activina se puede unir a activina con una K_D inferior a 1 micromolar o inferior a 100, 10 o 1 nanomolar. Opcionalmente, el polipéptido ActRII de unión a activina se une selectivamente a activina frente a GDF11 y/o GDF8 y, opcionalmente, con una K_D que es al menos 10 veces, 20 veces o 50 veces menor con respecto a la activina que con respecto a GDF11 y/o GDF8. Sin desear estar ligado a un mecanismo de acción particular, se espera que este grado de selectividad para la inhibición de activina sobre la inhibición de GDF11/GDF8 explique los efectos en huesos o eritropoyesis sin un efecto consistentemente medible en el músculo. En muchas realizaciones, un polipéptido ActRII se seleccionará para causar menos

del 15%, menos del 10% o menos del 5% de aumento en el músculo a dosis que consigan los efectos deseables en los niveles de glóbulos rojos. La composición puede tener una pureza de al menos el 95%, con respecto a otros componentes polipeptídicos, evaluado mediante cromatografía por exclusión de tamaño y, opcionalmente, la composición tiene una pureza de al menos el 98%. Un polipéptido ActRIIa de unión a activina para uso en una preparación de este tipo puede ser cualquiera de los que se describen en este documento, tales como un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID N°: 2, 3, 7 ó 12 o que tenga una secuencia de aminoácidos que sea al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97% o el 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID N°: 2, 3, 7, 12 ó 13. Un polipéptido ActRIIa de unión a activina puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido ActRIIa natural, tal como uno que comprenda al menos 10, 20 ó 30 aminoácidos de una secuencia seleccionada entre SEC ID N°: 1-3 o una secuencia de SEC ID N°: 2, que carezca de los 10 a 15 aminoácidos del extremo C (la "cola"). Un polipéptido ActRIIb de unión a activina para uso en una preparación de este tipo puede ser cualquiera de los descritos en este documento, tales como un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID N°: 16, 17, 20 ó 21 o que tenga una secuencia de aminoácidos que sea al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97% o el 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID N°: 16, 17, 20 ó 21. Un polipéptido ActRIIb de unión a activina puede incluir un fragmento funcional de un polipéptido ActRIIb natural, tal como uno que comprenda al menos 10, 20 o 30 aminoácidos de SEC ID N°: 15-17 o una secuencia que carezca de los 10 a 15 aminoácidos del extremo C (la "cola"), tal como SEC ID N°: 17.

Un polipéptido ActRII soluble de unión a activina puede incluir una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, en el dominio de unión a ligando) con relación a un polipéptido ActRII de origen natural. Los ejemplos de polipéptidos ActRIIa y ActRIIb alterados se proporcionan en el documento WO 2006/012627, págs. 59-60 y págs. 55-58, respectivamente, que se incorpora como

referencia en este documento. La alteración en la secuencia de aminoácidos puede, por ejemplo, alterar la glicosilación del polipéptido cuando se produce en un mamífero, insecto u otra célula eucariota o alterar la escisión proteolítica del polipéptido con relación al polipéptido ActRII de origen natural.

- 5 Un polipéptido ActRII de unión a activina puede ser una proteína de fusión que tenga, como un dominio, un polipéptido ActRII, (por ejemplo, una parte de unión a ligando de un ActRIIa o ActRIIb) y uno o más dominios adicionales que proporcionen una propiedad deseada, tal como farmacocinética mejorada, purificación más fácil, dirección a tejidos particulares, etc. Por ejemplo, un dominio
- 10 de una proteína de fusión puede mejorar una o más de estabilidad *in vivo*, semivida *in vivo*, captación/administración, localización o distribución tisular, formación de complejos proteicos, multimerización de la proteína de fusión y/o purificación. Una proteína de fusión ActRII de unión a activina puede incluir un dominio Fc de inmunoglobulina (de tipo silvestre o mutante) o una albúmina sérica
- 15 u otra parte de polipéptido que proporcione propiedades deseables tales como farmacocinética mejorada, solubilidad mejorada o estabilidad mejorada. En una realización preferida, una fusión ActRII-Fc comprende un enlazador relativamente no estructurado colocado entre el dominio Fc y el dominio de ActRII extracelular. Este enlazador no estructurado puede corresponder a la región no estructurada de
- 20 aproximadamente 15 aminoácidos en el extremo C terminal del dominio extracelular de ActRII (la "cola") o puede ser una secuencia artificial de 1, 2, 3, 4 ó 5 aminoácidos o una longitud de entre 5 y 15, 20, 30, 50 o más aminoácidos que estén relativamente libres de estructura secundaria o una mezcla de ambos. Un enlazador puede ser rico en residuos de glicina y prolina y puede, por ejemplo,
- 25 contener una secuencia única de treonina/serina y glicinas o secuencias de repetición de treonina/serina y glicinas (por ejemplo, singletes o repeticiones de TG4 (SEC ID N°: 22) o SG4 (SEC ID N°: 23). Una proteína de fusión puede incluir una sub-secuencia de purificación, tal como una etiqueta de epítipo, una etiqueta FLAG, una secuencia de polihistidina y una fusión de GST. Opcionalmente, un
- 30 polipéptido ActRII soluble incluye 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 a un resto lipídico y un aminoácido conjugado a un agente derivatizante orgánico. Una preparación farmacéutica también puede incluir uno o
5 más compuestos adicionales tales como un compuesto que se usa para tratar un trastorno óseo. Preferiblemente, una preparación farmacéutica está sustancialmente libre de pirógenos. En general, es preferible que una proteína ActRII se exprese en una línea celular de mamífero que medie adecuadamente la glicosilación natural de la proteína ActRII de forma de disminuir la probabilidad de
10 una respuesta inmune desfavorable en un paciente. Se han usado líneas celulares de humano y CHO satisfactoriamente y se espera que otros sistemas de expresión de mamíferos comunes sean útiles.

Como se describe en este documento, las proteínas ActRIIa denominadas ActRIIa-Fc (una forma con un enlazador mínimo entre la parte de ActRIIa y la
15 parte de Fc) tienen propiedades deseables, que incluyen unión selectiva a activina frente a GDF8 y/o GDF11, afinidad alta de unión a ligando y semivida en suero mayor de dos semanas en modelos animales. En determinadas realizaciones la invención proporciona polipéptidos ActRII-Fc y preparaciones farmacéuticas que comprenden tales polipéptidos y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 En determinados aspectos, la descripción proporciona ácidos nucleicos que codifican un polipéptido ActRII de unión activina soluble, tal como un polipéptido ActRIIa o ActRIIb. Un polinucleótido aislado puede comprender una secuencia codificante para un polipéptido ActRII de unión a activina soluble, tal como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede incluir una
25 secuencia codificante para un dominio extracelular (por ejemplo, dominio de unión a ligando) de un ActRII y una secuencia que codificaría parte o todo el dominio transmembrana y/o el dominio citoplasmático de un ActRII, pero un codón de parada colocado entre el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático o colocado entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana o dominio
30 citoplasmático. Por ejemplo, un polinucleótido aislado puede comprender una

secuencia polinucleotídica de ActRIIa de longitud completa tal como SEC ID N°: 4
 ó 5 o una secuencia polinucleotídica de ActRIIb de longitud completa tal como
 SEC ID N°: 18 o una versión parcialmente truncada de ActRIIa o ActRIIb,
 comprendiendo además dicho polinucleótido aislado un codón de terminación de
 5 transcripción al menos seiscientos nucleótidos antes del extremo 3' o, de otra
 manera, colocado de forma que la traducción del polinucleótido dé origen a un
 dominio extracelular fusionado opcionalmente a una parte truncada de un ActRII
 de longitud completa. Una secuencia de ácido nucleico preferida para ActRIIa es
 SEC ID N°: 14. Los ácidos nucleicos descritos en este documento pueden estar
 10 unidos operativamente a un promotor para expresión y la descripción proporciona
 células transformadas con tales polinucleótidos recombinantes. Preferiblemente, la
 célula es una célula de mamífero tal como una célula CHO.

En determinados aspectos, la descripción proporciona métodos para
 preparar un polipéptido ActRII de unión a activina soluble. Un método de este tipo
 15 puede incluir expresar cualquiera de los ácidos nucleicos (por ejemplo, SEC ID N°:
 4, 5, 14, 18 ó 19) descritos en este documento en una célula adecuada, tal como
 una célula de ovario de hámster Chino (CHO). Un método de este tipo puede
 comprender: a) cultivar una célula en condiciones adecuadas para la expresión del
 polipéptido ActRII soluble, donde dicha célula se transforma con una construcción
 20 de expresión de ActRII soluble y b) recuperar el polipéptido ActRII soluble
 expresado de esa forma. Los polipéptidos ActRII solubles se pueden recuperar
 como fracciones en bruto, parcialmente purificadas o altamente purificadas. La
 purificación se puede conseguir mediante una serie de etapas de purificación, que
 incluyen, por ejemplo, una, dos o tres o más de las siguientes, en cualquier orden:
 25 cromatografía de proteína A, cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo,
 Q sefarosa), cromatografía de interacción hidrófoba (por ejemplo, fenilsefarosa),
 cromatografía por exclusión de tamaño y cromatografía de intercambio catiónico.

En determinados aspectos, un antagonista de activina-ActRII descrito en
 este documento, tal como un polipéptido ActRIIa de unión a activina soluble o un
 30 polipéptido ActRIIb de unión a activina soluble, se puede usar en un método para

promover la producción de glóbulos rojos o aumentar los niveles de glóbulos rojos en un sujeto. En determinadas realizaciones, la descripción proporciona métodos para tratar un trastorno asociado con recuentos de glóbulos rojos bajos o niveles de hemoglobina bajos (por ejemplo, una anemia) o para promover producción de glóbulos rojos, en pacientes que lo necesitan. Un método puede comprender administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de antagonista de activina-ActRII. En determinados aspectos, la descripción proporciona usos de antagonistas de activina-ActRII para preparar un medicamento para el tratamiento de un trastorno o afección como se describe en este documento.

En determinados aspectos, la descripción proporciona un método para identificar un agente que estimule la producción de glóbulos rojos. El método comprende: a) identificar un agente de ensayo que se una a activina o un dominio de unión a ligando o un polipéptido ActRII; y b) evaluar el efecto del agente sobre los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina y/o niveles de precursores de glóbulos rojos (por ejemplo, niveles de reticulocitos).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra la purificación de ActRIIa-hFc expresado en células CHO. La proteína se purifica como un pico bien definido único visualizado mediante una columna de exclusión molecular (panel izquierdo) y SDS-PAGE teñido con Coomassie (panel derecho) (carril izquierdo: patrones de peso molecular; carril derecho: ActRIIa-hFc).

La Figura 2 muestra la unión de ActRIIa-hFc a activina y GDF-11, medido mediante ensayo Biacore™.

La Figura 3 muestra los efectos de ActRIIa-hFc sobre los recuentos de glóbulos rojos en hembras de primates no humanos. Hembras de monos *cynomolgus* (cuatro grupos de cinco monos cada uno) se trataron con placebo o 1 mg/ kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg de ActRIIa-hFc el día 0, día 7, día 14 y día 21. La Figura 3A muestra recuentos de glóbulos rojos (RBC). La Figura 3B muestra niveles de hemoglobina. La significancia estadística es relativa a la línea basal de

cada grupo de tratamiento. Al día 57, dos monos permanecieron en cada grupo.

La Figura 4 muestra los efectos de ActRIIa-hFc sobre el recuento de glóbulos rojos en primates no humanos macho. Monos *cynomolgus* macho (cuatro grupos de cinco monos cada uno) se trataron con placebo o 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg de ActRIIa-hFc el día 0, día 7, día 14 y día 21. La Figura 4A muestra los recuentos de glóbulos rojos (RBC). La Figura 4B muestra los niveles de hemoglobina. La significancia estadística es relativa a la línea basal de cada grupo de tratamiento. Al día 57, dos monos permanecieron en cada grupo.

La Figura 5 muestra los efectos de ActRIIa-hFc sobre los recuentos de reticulocitos en primates no humanos hembra. Monos *cynomolgus* (cuatro grupos de cinco monos cada uno) se trataron con placebo o 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg de ActRIIa-hFc el día 0, día 7, día 14 y día 21. La Figura 5A muestra los recuentos de reticulocitos absolutos. La Figura 5B muestra el porcentaje de reticulocitos relativo a RBC. La significancia estadística es relativa a la línea basal de cada grupo. Al día 57, dos monos permanecieron en cada grupo.

La Figura 6 muestra los efectos de ActRIIa-hFc sobre los recuentos de reticulocitos en primates no humanos macho. Monos *cynomolgus* (cuatro grupos de cinco monos cada uno) se trataron con placebo o 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg de ActRIIa-hFc el día 0, día 7, día 14 y día 21. La Figura 6A muestra los recuentos de reticulocitos absolutos. La Figura 6B muestra el porcentaje de reticulocitos relativo a RBC. La significancia estadística es relativa a la línea basal de cada grupo. En el día 57, dos monos permanecieron en cada grupo.

La Figura 7 muestra los resultados del ensayo clínico humano descrito en el Ejemplo 5, donde el área bajo la curva (AUC) y dosis administrada de ActRIIa-hFc tienen una correlación lineal, independientemente de si ActRIIa-hFc se administró por vía intravenosa (IV) o por vía subcutánea (SC).

La Figura 8 muestra una comparación de niveles en suero de ActRIIa-hFc en pacientes a los que se administró IV o SC.

La Figura 9 muestra los niveles de fosfatasa alcalina en hueso (BAP) en respuesta a diferentes niveles de dosis de ActRIIa-hFc. BAP es un marcador para

crecimiento óseo anabólico.

La Figura 10 representa el cambio mediano a partir de la línea basal de los niveles de hematocrito del ensayo clínico humano descrito en el Ejemplo 5. Se administró ActRIIa-hFc por vía intravenosa (IV) en la dosis indicada.

5 La Figura 11 representa el cambio mediano a partir de la línea basal de los niveles de hemoglobina del ensayo clínico humano descrito en el Ejemplo 5. Se administró ActRIIa-hFc por vía intravenosa (IV) en la dosis indicada.

10 La Figura 12 representa el cambio mediano a partir de la línea basal del recuento de RBC (glóbulos rojos) del ensayo clínico humano descrito en el Ejemplo 5. Se administró ActRIIa-hFc por vía intravenosa (IV) en la dosis indicada.

La Figura 13 representa el cambio mediano a partir de la línea basal del recuento de reticulocitos del ensayo clínico humano descrito en el Ejemplo 5. Se administró ActRIIa-hFc por vía intravenosa (IV) en la dosis indicada.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

1. Visión de conjunto

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) contiene una diversidad de factores de crecimiento que comparten elementos de secuencia y motivos estructurales comunes. Se conoce que estas proteínas ejercen efectos biológicos sobre una amplia variedad de tipos celulares tanto en vertebrados como invertebrados. Los miembros de la superfamilia realizan importantes funciones durante el desarrollo embrionario en formación de patrón y especificación de tejido y pueden influir a una diversidad de procesos de diferenciación, que incluyen adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, cardiogénesis, hematopoyesis, neurogénesis y diferenciación celular epitelial. La familia se divide en dos grandes ramas: las ramas BMP/GDF y TGF-beta/Activina/BMP10, cuyos miembros tienen efectos diversos y con frecuencia complementarios. Manipulando la actividad de un miembro de la familia de TGF-beta, con frecuencia es posible provocar cambios fisiológicos significativos en un

20

25

30

organismo. Por ejemplo, las razas de ganado Piamontesa y Belgian Blue portan una mutación de pérdida de función en el gen de GDF8 (también denominado miostatina) que provoca un aumento marcado en la masa muscular. Grobet et al., Nat Genet. 1997, 17(1): 71-4. Además, en seres humanos, los alelos inactivos de GDF8 están asociados con masa muscular aumentada y, se dice que, fuerza excepcional. Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350: 2682-8.

Las activinas son factores de crecimiento polipeptídicos diméricos que pertenecen a la superfamilia de TGF-beta. Existen tres formas de activina principales (A, B y AB) que son 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 de TGF-beta, las activinas son factores únicos y multifuncionales que pueden estimular la producción de hormonas en células ováricas y placentarias, apoyar la supervivencia de células neuronales, influir en el progreso del ciclo celular positivamente o negativamente dependiendo del tipo celular e inducir diferenciación mesodérmica al menos en embriones de anfibios (DePaolo et al., 1991, Proc Biol. Soc. Ep Med. 198: 500-512; Dyson et al., 1997, Curr Biol. 7: 81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55: 953-963). Además, el factor de diferenciación eritroide (EDF) aislado a partir de las células leucémicas monocíticas humanas estimuladas se observó que 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 está antagonizada por su heterodímero relacionado, inhibina. Por ejemplo, durante la liberación de la hormona estimulante de folículo (FSH) a partir de la pituitaria, la activina promueve la secreción y síntesis de FSH, mientras que la inhibina evita la secreción y síntesis de FSH. Otras proteínas que pueden regular la bioactividad de activina y/o unirse a activina incluyen folistatina (FS), proteína relacionada con folistatina (FSRP) y macroglobulina- α_2 .

Las señales de TGF- β están mediadas por complejos heteroméricos de

receptores serina/treonina quinasa de tipo I y tipo II, que fosforilan y activan cadena abajo las proteínas Smad tras la estimulación de ligando (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1: 169-178). Estos receptores de tipo I y tipo II son proteínas transmembrana, compuestas de un dominio extracelular de unión a
 5 ligando con región rica en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con especificidad pronosticada serina/treonina. Los receptores de tipo I son esenciales para la señalización y los receptores de tipo II se requieren para unir ligandos y para la expresión de receptores de tipo I. Los receptores de activina de tipo I y II forman un complejo estable después de la unión a ligando,
 10 que da como resultado la fosforilación de receptores de tipo I mediante receptores de tipo II.

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

Como se ha demostrado en este documento, un polipéptido soluble ActRIIa (sActRIIa), que muestra preferencia sustancial para unirse a activina A en lugar de otros miembros de la familia TGF-beta, tales como GDF8 o GDF11, es eficaz para
 25 aumentar los niveles de glóbulos rojos *in vivo*. Sin desear estar ligado a ningún mecanismo particular, se espera que el efecto de sActRIIa esté causado principalmente por un efecto antagonista de activina, dada la unión a activina muy fuerte (constante de disociación picomolar) mostrada por la construcción de sActRIIa particular usada en estos estudios. Independientemente del mecanismo,
 30 es evidente a partir de esta descripción que los antagonistas de ActRIIa-activina

aumentan los niveles de glóbulos rojos en roedores, monos y seres humanos. Se debe indicar que la hematopoyesis es un proceso complejo, regulado por una diversidad de factores, que incluyen eritropoyetina, G-CSF y homeostasis del hierro. Las expresiones "aumenta los niveles de glóbulos rojos" y "promueve la
5 formación de glóbulos rojos" se refieren a mediciones clínicamente observables, tales como hematocrito, recuentos de glóbulos rojos y mediciones de hemoglobina y tienen por objeto ser neutras con respecto al mecanismo mediante el cual ocurren tales cambios.

Como también se ha demostrado en este documento, un polipéptido
10 ActRIIb soluble (sActRIIb) es eficaz para aumentar los niveles de reticulocitos *in vivo*, un efecto que, a lo largo de un período de tiempo más largo se espera que provoque niveles de hematocrito aumentados.

Los datos presentados en este documento con respecto a primates no humanos son reproducibles también en ratones, ratas y seres humanos y, por lo
15 tanto, esta descripción proporciona métodos para usar polipéptidos ActRII y otros antagonistas de activina-ActRII para promover la producción de glóbulos rojos y aumentar los niveles de glóbulos rojos en mamíferos que varían de roedores a seres humanos. Los antagonistas de activina-ActRII incluyen, por ejemplo, polipéptidos ActRIIa solubles de unión a activina, polipéptidos ActRIIb solubles de
20 unión a activina, anticuerpos que se unen a activina (particularmente, las subunidades A o B de activina, también denominadas β_A o β_B) y alteran la unión de ActRIIa y/o ActRIIb, anticuerpos que se unen a ActRIIa y alteran la unión a activina, anticuerpos que se unen a ActRIIb y alteran la unión a activina, proteínas de no anticuerpo seleccionadas para unión a activina, ActRIIb o ActRIIa (véase,
25 por ejemplo, los documentos WO/2002/088171, WO/2006/055689 y WO/2002/032925 para ejemplos de tales proteínas y métodos para el diseño y selección de las mismas), péptidos aleatorizados seleccionados para unión a activina, ActRIIb o ActRIIa, con frecuencia fijados a un dominio Fc. Dos proteínas diferentes (u otros restos) con actividad de unión a activina, ActRIIb o ActRIIa,
30 especialmente agentes de unión a activina que bloquean los sitios de unión de tipo

I (por ejemplo, un receptor de activina de tipo I soluble) y de tipo II (por ejemplo, un receptor de activina de tipo II soluble), respectivamente, se pueden unir entre sí para crear una molécula de unión bifuncional. Los aptámeros de ácidos nucleicos, moléculas pequeñas y otros agentes que inhiben el eje de señalización activina-ActRII están incluidos como antagonistas de activina-ActRII. Diversas proteínas tienen actividad antagonista de activina-ActRII, que incluyen inhibina (es decir, subunidad alfa de inhibina), aunque la inhibina no antagoniza universalmente a la activina en todos los tejidos, folistatina (por ejemplo, folistatina-288 y folistatina-315), FSRP, activina C, macroglobulina alfa(2) y una activina A mutante M108A (cambio de metionina a alanina en la posición 108). En general, las formas alternativas de activina, particularmente aquellas con alteraciones en el dominio de unión de receptor tipo I se pueden unir a receptores de tipo II y no llegan a formar un complejo ternario activo, actuando de ese modo como antagonistas. Adicionalmente, ácidos nucleicos, tales como moléculas antisentido, RNAsi o ribozimas que inhiben la activina A, B, C o E o, particularmente, la expresión de ActRIIa o ActRIIb, se pueden usar como antagonistas de activina-ActRII. El antagonista de activina-ActRII que se tiene que usar puede mostrar selectividad para inhibir la señalización mediada por activina frente a otros miembros de la familia de TGF-beta y, particularmente, con respecto a GDF8 y GDF11.

Las expresiones usadas en esta memoria descriptiva en general tienen sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico en el que se usa cada expresión. Determinadas expresiones se tratan más adelante o en otros lugares en la memoria descriptiva, para proporcionar guía adicional para el practicante al describir las composiciones y métodos de la invención y cómo prepararlas y usarlas. El alcance o significado de cualquier uso de una expresión será evidente a partir del contexto específico en el que se use la expresión.

“Alrededor” y “aproximadamente” generalmente se referirán a un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las mediciones. Típicamente, los grados ilustrativos de error están dentro del 20 por

ciento (%), preferiblemente dentro del 10% y más preferiblemente dentro del 5% de un valor o intervalo de valores dado.

Alternativamente y particularmente en sistemas biológicos, las expresiones “alrededor” y “aproximadamente” pueden referirse a valores que estén 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, significando que las expresiones “alrededor” o “aproximadamente” se pueden inferir cuando no se indiquen expresamente.

10 Los métodos de la invención pueden incluir etapas de comparación de secuencias entre sí, que incluyen secuencias de tipo silvestre con una o más mutantes (variantes de secuencia). Tales comparaciones típicamente comprenden alineaciones de secuencia de polímeros, por ejemplo, usando programas de alineación de secuencia y/o algoritmos que son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, BLAST, FASTA y MEGALIGN, para nombrar algunos). El especialista puede apreciar fácilmente que, en tales alineaciones, cuando una mutación contiene una inserción o supresión de residuos, la alineación de secuencia introducirá un “hueco” (típicamente representado por un guión o “A”) en la secuencia de polímero que no contiene el residuo insertado o suprimido.

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

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

30

Sin embargo, en uso común y en la presente solicitud, el término "homólogo", cuando se modifica con un adverbio tal como "altamente", se puede referir a similitud de secuencia y puede o no relacionarse con un origen evolutivo común.

5 2. Polipéptidos ActRII

En determinados aspectos, la presente invención se refiere a polipéptidos ActRII. Como se usa en este documento, el término "ActRII" se refiere a la familia de receptores de activina de tipo II. Esta familia incluye tanto el receptor de activina de tipo IIa como el receptor de activina de tipo IIb.

10 En determinados aspectos, la presente invención se refiere a polipéptidos ActRIIa. Como se usa en este documento, el término "ActRIIa" se refiere a una familia de proteínas receptoras de activina de tipo IIa (ActRIIa) de cualquier especie y variante obtenida a partir de tales proteínas ActRIIa por mutagénesis u otra modificación. La referencia a ActRIIa en este documento se entiende que es
15 una referencia a una cualquiera de las formas identificadas actualmente. Los miembros de la familia ActRIIa generalmente son proteínas transmembrana, compuestas de un dominio extracelular de unión a ligando con una región rica en cisteína, un dominio de transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad serina/treonina quinasa pronosticada.

20 La expresión "polipéptido ActRIIa" incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de origen natural de un miembro de la familia de ActRIIa así como cualquier variante del mismo (que incluye mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil. Véase, por ejemplo, el documento WO/2006/012627. Por ejemplo, los polipéptidos ActRIIa incluyen
25 polipéptidos obtenidos a partir de la secuencia de cualquier ActRIIa conocido que tiene una secuencia al menos aproximadamente el 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido ActRIIa y, opcionalmente, una identidad de al menos el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 99% o mayor. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIa de la invención se puede unir a e inhibir la función de una proteína ActRIIa y/o activina.
30 Un polipéptido ActRIIa se puede seleccionar por su actividad para promover la

formación de glóbulos rojos *in vivo*. Los ejemplos de polipéptidos ActRlla incluyen polipéptido precursor de ActRlla humano (SEC ID N°: 1) y polipéptidos ActRlla humanos solubles (por ejemplo, SEC ID N°: 2, 3, 7 y 12).

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

MGAAAKLAFVFLISCSSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEP
CYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSP
EVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVT**PKPPYYNILLYS**LVPL
 MLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLVPTQDPGPPPPSPLLGLKPLQLLE
 VKARGRFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKHEN
 ILQFIGAEKRGTSDVDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVVSWNELCHIAE
 TMARGLAYLHEDIPLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFG
 ALKFEAGKSAGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQORDAFLRIDMYAMGL
 VLWELASRCTAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEDMQEVVVHKKRPVL
 RDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMQRLTNIIT
 5 TEDIIVTVMVTNVDFPPKESL (SEC ID N°: 1)

El péptido de señal está subrayado; el dominio extracelular está en negritas y los sitios de glicosilación potencial enlazados a N tienen subrayado doble.

10 La secuencia polipeptídica procesada de ActRlla humano soluble (extracelular) es la siguiente:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISG
 SIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSP**EVYFCCCEGNMCNEKFSYFP**
EMEVTQPTSNPVTPKPP (SEC ID N°: 2)

La "cola" del extremo C del dominio extracelular está subrayada. La secuencia con la "cola" suprimida (una secuencia $\Delta 15$) es la siguiente:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISG
 SIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSP**EVYFCCCEGNMCNEKFSYFP**
 EM (SEC ID N°: 3)

15 La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína precursora de ActRlla humana es la siguiente (nucleótidos 164-1705 de entrada de Genbank NM_001616):

ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGGCGTCTTTCTTATCTCCTGTT
CTTCAGGTGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTCTT
TAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCG
TGTTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGA
ATATTTCTGGTTCCATTGAAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGA
TATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCT
GAAGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTT
CTTATTTTCCAGAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTAC
ACCTAAGCCACCCTATTACAACATCCTGCTCTATTCCCTGGTGCCACTT
ATGTTAATTGCGGGGATTGTCAATTTGTGCATTTTGGGTGTACAGGCATC
ACAAGATGGCCTACCCCTCCTGTACTTGTCCAACCTCAAGACCCAGGACC
ACCCCCACCTTCTCCATTACTAGGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAA
GTGAAAGCAAGGGGAAGATTTGGTTGTGTCTGGAAAGCCCAGTTGCTTA
ACGAATATGTGGCTGTCAAATATTTCCAATACAGGACAAACAGTCATG
GCAAAATGAATACGAAGTCTACAGTTTGCCTGGAATGAAGCATGAGAAC
ATATTACAGTTCATTGGTGCAGAAAAACGAGGCACCAGTGTGATGTGG
ATCTTTGGCTGATCACAGCATTTTCATGAAAAGGGTTCATATCAGACTT
TCTTAAGGCTAATGTGGTCTCTTGAATGAACTGTGTCATATTGCAGAA
ACCATGGCTAGAGGATTGGCATATTTACATGAGGATATACCTGGCCTAA
AAGATGGCCACAAACCTGCCATATCTCACAGGGACATCAAAAGTAAAAA
TGTGCTGTTGAAAAACAACCTGACAGCTTGCAATTGCTGACTTTGGGTTG
GCCTTAAATTTGAGGCTGGCAAGTCTGCAGGCGATACCCATGGACAGG
TTGGTACCCGGAGGTACATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTGCTATAAA
CTTCCAAAGGGATGCATTTTTGAGGATAGATATGTATGCCATGGGATTA
GTCCTATGGGAACCTGGCTTCTCGCTGTACTGCTGCAGATGGACCTGTAG
ATGAATACATGTTGCCATTTGAGGAGGAAATTGGCCAGCATCCATCTCT
TGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGTGCATAAAAAAAGAGGCCTGTTTTA
AGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGAATGGCAATGCTCTGTGAAACCA
TTGAAGAATGTTGGGATCACGACGCAGAAGCCAGGTTATCAGCTGGATG
TGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCAGAGACTAACAAATATTATTACC
ACAGAGGACATTGTAACAGTGGTCACAATGGTGACAAATGTTGACTTTC
CTCCCAAAGAATCTAGTCTATGA (SEC ID N°: 4)

La secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido soluble ActRIIa humano (extracelular) es la siguiente:

ATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATT
GGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCGTGTATGGTGA
CAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGT
TCCATTGAAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCT
ATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTT
TTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCA
GAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCAC
CC (SEC ID N°: 5)

5 En determinados aspectos, la presente invención se refiere a polipéptidos ActRIIb. Como se usa en este documento, el término “ActRIIb” se refiere a una familia de proteínas receptoras de activina de tipo IIb (ActRIIb) de cualquier especie y variante obtenidas a partir de tales proteínas ActRIIb por mutagénesis u otra modificación. En este documento se entiende que la referencia a ActRIIb es
10 una referencia a una cualquiera de las formas actualmente identificadas. Los miembros de la familia ActRIIb generalmente son 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 pronosticada.

15 La expresión “polipéptido ActRIIb” incluye polipéptidos que comprenden cualquier polipéptido de origen natural de un miembro de la familia de ActRIIb así como cualquier variante del mismo (que incluye mutantes, fragmentos, fusiones y formas peptidomiméticas) que conservan una actividad útil. Véase, por ejemplo, el documento WO/2006/012627. Por ejemplo, los polipéptidos ActRIIb incluyen
20 polipéptidos obtenidos a partir de la secuencia de cualquier ActRIIb conocido que tenga una secuencia al menos aproximadamente el 80% idéntica a la secuencia de un polipéptido ActRIIb y, opcionalmente, una identidad de al menos el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 99% o mayor. Por ejemplo, un polipéptido ActRIIb de la

invención se puede unir a e inhibir la función de una proteína ActRIIb y/o activina. Un polipéptido ActRIIb se puede seleccionar por su actividad para promover la formación de glóbulos rojos *in vivo*. Los ejemplos de polipéptidos ActRIIb incluyen polipéptido precursor de ActRIIb humano (SEC ID N°: 15) y polipéptidos ActRIIb humanos solubles (por ejemplo, SEC ID N°: 16, 17, 20 y 21).

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

MTAPWVALALLWGSLWPG**SGRGEAETRECIYYNANWELERTN**QSGLERC
EGEQDKRLHCYASWAN**SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ**
VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSL**LP****IG**
 GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPPSPLVGLKPLQLEIK
 ARGFRGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLL
 QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGKNIITWNECHVAETM
 SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLA
 VRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLV
 LWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEEIGQHPSEELQEVVVHKKMRPTIK
 DHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS
 DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEC ID N°: 15)

10 El péptido de señal está subrayado; el dominio extracelular está en negritas y los sitios de glicosilación enlazados a N potenciales están en recuadros.

La secuencia polipeptídica procesada de ActRIIb soluble humano (extracelular) es la siguiente:

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLH**CYASWANSS**
GTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHL
PEAGGPEVTYEPPTAPT (SEC ID N°: 16)

15

La "cola" del extremo C del dominio extracelular está subrayada. La secuencia con la "cola" suprimida (una secuencia Δ 15) es la siguiente:

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSS
GTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHL
PEA (SEC ID N°: 17)

La secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína precursora de ActRIIb humana es la siguiente: (nucleótidos 5-1543 de entrada de Genbank NM_001106).

ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGGC
CCGGCTCTGGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAA
CGCCAACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGC
GAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCCTCCTGGGCCAACA
GCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTT
CAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAG
GTGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTC
ATTTGCCAGAGGCTGGGGGCCCCGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGAC
AGCCCCCACCCTGCTCACGGTGTCTGGCCTACTCACTGCTGCCCATCGGG
GGCCTTTCCCTCATCGTCTCTGCTGGCCTTTTGGATGTACCGGCATCGCA
AGCCCCCCTACGGTCATGTGGACATCCATGAGGACCCTGGGCCTCCACC
ACCATCCCCCTCTGGTGGGCCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAAG
GCTCGGGGGCGCTTTGGCTGTGTCTGGAAGGCCAGCTCATGAATGACT
TTGTAGCTGTCAAGATCTTCCCACTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAG
TGAACGGGAGATCTTCAGCACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCTGCTA
CAGTTCATTGCTGCCGAGAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAGCTGT
GGCTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCCTCACGGATTACCTCAA
GGGGAACATCATCACATGGAACGAACGTGTGTCATGTAGCAGAGACGATG
TCACGAGGCCTCTCATACCTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGGCGTGGCG
AGGGCCACAAGCCGTCTATTGCCCACAGGGACTTTAAAAGTAAGAATGT
ATTGCTGAAGAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCTGACTTTGGCTTGGCT
GTTGATTTGAGCCAGGGAAACCTCCAGGGGACACCCACGGACAGGTAG
GCACGAGACGGTACATGGCTCCTGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTT
CCAGAGAGATGCCCTTCCTGCGCATTGACATGTATGCCATGGGGTTGGTG
CTGTGGGAGCTTGTGTCTCGCTGCAAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATG
AGTACATGCTGCCCTTTGAGGAAGAGATTGGCCAGCACCCCTTCGTTGGA
GGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTGCACAAGAAGATGAGGCCCCACCATTA
GATCACTGGTTGAAACACCCGGGCCTGGCCCAGCTTTGTGTGACCATCG
AGGAGTGCTGGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTGTCCGCGGGCTGTGT
GGAGGAGCGGGTGTCCCTGATTGCGAGGTGGTCAACGGCACTACCTCG
GACTGTCTCGTTTCCCTGGTGACCTCTGTACCAATGTGGACCTGCCCC
CTAAAGAGTCAAGCATCTAA (SEC ID N°: 18)

La secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido soluble ActRIIa humano (extracelular) es la siguiente:

TCTGGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCA
ACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGG
CGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACAGCTCT
GGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACT
GCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTA
CTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTTG
CCAGAGGCTGGGGGCCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCGACAGCCC
CCACC (SEC ID N°: 19)

5

En una realización específica, la invención se refiere a polipéptidos ActRII solubles. Como se describe en este documento, la expresión “polipéptido ActRII soluble” se refiere en general a polipéptidos que comprenden un dominio extracelular de una proteína ActRIIa o ActRIIb. La expresión “polipéptido ActRII soluble”, como se usa en este documento, incluye cualquier dominio extracelular de origen natural de una proteína ActRIIa o ActRIIb así como cualquier variante de las mismas (que incluyen mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas). Un polipéptido ActRII de unión a activina es uno que conserva la capacidad de unirse a activina, que incluye, por ejemplo, activina AA, AB, BB o formas que incluyen una subunidad C o E. Opcionalmente, un polipéptido ActRII de unión a activina se unirá a activina AA con una constante de disociación de 1 nM o menos. El dominio extracelular de una proteína ActRII se une a activina y generalmente es soluble y, por tanto, se puede denominar un polipéptido ActRII de unión a activina soluble. Los ejemplos de polipéptidos ActRIIa de unión a activina solubles incluyen los polipéptidos solubles ilustrados en la SEC ID N°: 2, 3, 7, 12 y 13. La SEC ID N°: 7 se denomina ActRIIa-hFc y se describe adicionalmente en los Ejemplos. Otros ejemplos de polipéptidos ActRIIa de unión a activina solubles comprenden una secuencia de señal además del dominio extracelular de una proteína ActRIIa, por

10

15

20

ejemplo, la secuencia líder de melitina de abeja (SEC ID N°: 8) o el líder activador de plasminógeno tisular (TPA) (SEC ID N°: 9) o el líder ActRIIa nativo (SEC ID N°: 10). El polipéptido ActRIIa-hFc ilustrado en la SEC ID N°: 13 usa un líder TPA. Los ejemplos de polipéptidos ActRIIb de unión a activina solubles incluyen los polipéptidos solubles ilustrados en las SEC ID N°: 16,17 y 20. Los polipéptidos ActRIIb de unión a activina también pueden comprender una secuencia de señal además del dominio extracelular de una proteína ActRIIb, por ejemplo, la secuencia líder de melitina de abeja (SEC ID N°: 8) o el líder activador de plasminógeno tisular (TPA) (SEC ID N°: 9).

Se pueden obtener fragmentos funcionalmente activos de polipéptidos ActRII seleccionando polipéptidos producidos de forma recombinante a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica un polipéptido ActRII. Además, los fragmentos se pueden sintetizar químicamente usando técnicas conocidas en el campo tales como química convencional f-Moc o t-Boc de fase sólida de Merrifield. Los fragmentos se pueden producir (de forma recombinante o por síntesis química) y ensayar para identificar los fragmentos peptídico que pueden funcionar como antagonistas (inhibidores) de la proteína ActRII o señalización mediada por activina.

Las variantes funcionalmente activas de polipéptidos ActRII se pueden obtener seleccionando bibliotecas de polipéptidos modificados de forma recombinante producidos a partir de los ácidos nucleicos mutagenizados correspondientes que codifican un polipéptido ActRII. Las variantes se pueden producir y ensayar para identificar aquellas que puedan funcionar como antagonistas (inhibidores) de proteína ActRII o señalización mediada por activina. En determinadas realizaciones, una variante funcional de los polipéptidos ActRIIa comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 75% a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID N°: 2 ó 3. En determinados casos, la variante funcional tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID N°: 2 ó 3. En

determinadas realizaciones, una variante funcional de los polipéptidos ActRIIb comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 75% a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID N°: 16 ó 17. En determinados casos, la variante funcional tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEC ID N°: 17 ó 18.

Las variantes funcionales se pueden generar modificando la estructura de un polipéptido ActRII para propósitos tales como mejorar la eficacia terapéutica o estabilidad (por ejemplo, vida útil *ex vivo* y resistencia a degradación proteolítica *in vivo*). Cuando se seleccionan tales polipéptidos ActRII modificados para conservar unión a activina, se consideran equivalentes funcionales de los polipéptidos ActRII de origen natural. Los polipéptidos ActRII modificados también se pueden producir, por ejemplo, por sustitución, supresión 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 conservativas) no tendrá un efecto muy importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Los reemplazos conservativos son aquellos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ActRII da como resultado un homólogo funcional se puede determinar fácilmente evaluando la capacidad del polipéptido ActRII variante de producir una respuesta en células de una manera similar al polipéptido ActRII de tipo silvestre.

En determinadas realizaciones, la presente invención contempla mutaciones específicas de los polipéptidos ActRII de forma de alterar la glicosilación del polipéptido. Tales mutaciones se pueden seleccionar de forma de introducir o eliminar uno o más sitios de glicosilación, tales como sitios de glicosilación unidos a O o unidos a N. Los sitios de reconocimiento de glicosilación unidos a asparagina generalmente comprenden una secuencia tripeptídica,

asparagina-X-treonina o asparagina-X-serina (donde "X" es cualquier aminoácido) que se reconoce específicamente por enzimas de glicosilación celular apropiadas. La alteración también se puede realizar mediante la adición de o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del polipéptido ActRII de tipo silvestre (para sitios de glicosilación unidos a O). Una variedad de sustituciones o supresiones de aminoácidos en una o ambas de la primera o tercera posiciones de aminoácidos de un sitio de reconocimiento de glicosilación (y/o supresión de aminoácidos en la segunda posición) da como resultado la no glicosilación en la secuencia tripeptídica. Otros medios para aumentar el número de restos de carbohidrato en un polipéptido ActRII son mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido ActRII. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el azúcar o los azúcares se pueden unir a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína; (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina; (e) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptofano o (f) el grupo amida de glutamina. La remoción de uno o más restos de carbohidrato presentes en un polipéptido ActRII se puede conseguir químicamente y/o enzimáticamente. La deglicosilación química puede implicar, por ejemplo, exposición del polipéptido ActRII al compuesto ácido trifluorometanosulfónico o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o todos los azúcares excepto el azúcar enlazante (N- acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que deja la secuencia de aminoácidos intacta. La escisión enzimática de restos de carbohidrato en polipéptidos ActRII se puede conseguir mediante el uso de una diversidad de endo y exo glicosidasas como se ha descrito por Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138: 350. La secuencia de un polipéptido ActRII se puede ajustar, según sea apropiado, dependiendo del tipo de sistema de expresión usado, ya que las células de mamífero, de levadura, de insectos y de plantas pueden introducir patrones de glicosilación diferentes que pueden estar influidos por la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, las proteínas ActRII para uso en seres humanos se pueden expresar en una línea

celular de mamífero que proporcione glicosilación apropiada, tal como líneas de células HEK293 o CHO, aunque se espera que otras líneas celulares de expresión de mamífero también sean útiles.

Esta descripción contempla además un método para generar mutantes, particularmente conjuntos de mutantes combinatorios de un polipéptido ActRII, así como mutantes de truncamiento; las combinaciones de mutantes combinatorios son especialmente útiles para identificar secuencias variantes funcionales. El propósito de seleccionar tales bibliotecas combinatorias puede ser generar, por ejemplo, variantes de polipéptido ActRII que se unan a activina u otros ligandos. Más adelante se proporciona una diversidad de ensayos de selección y tales ensayos se pueden usar para evaluar las variantes. Por ejemplo, una variante de polipéptido ActRII se puede seleccionar para determinar su capacidad de unirse a un ligando de ActRII, para evitar la unión de un ligando de ActRII a un polipéptido ActRII o para interferir con la señalización provocada por un ligando de ActRII.

La actividad de un polipéptido ActRII o sus variantes también se puede ensayar en un ensayo basado en células o *in vivo*. Por ejemplo, se puede evaluar el efecto de una variante de polipéptido ActRII sobre la expresión de genes implicados en la hematopoyesis. Esto se puede realizar, según sea necesario, en presencia de una o más proteínas de ligando ActRII recombinante (por ejemplo, activina) y se pueden transfectar células para producir un polipéptido ActRII y/o variantes del mismo y, opcionalmente, un ligando de ActRII. Análogamente, se puede administrar un polipéptido ActRII a un ratón u otro animal y se pueden evaluar una o más mediciones sanguíneas, tales como un recuento de RBC, hemoglobina o recuento de reticulocitos.

Se pueden generar variantes obtenidas de forma combinatoria que tengan una potencia selectiva o generalmente aumentada relativa a un polipéptido ActRII de origen natural. Análogamente, la mutagénesis puede dar origen a variantes que tengan semividas intracelulares espectacularmente diferentes a las que corresponden al polipéptido ActRII de tipo silvestre. Por ejemplo, la proteína alterada se puede volver o más estable o menos estable a la degradación

proteolítica u otros procesos celulares, lo cual da como resultado la destrucción o, de otra manera, la inactivación de un polipéptido ActRII nativo. Tales variantes y los genes que las codifican, se pueden utilizar para alterar los niveles de polipéptido ActRII modulando la semivida de los polipéptidos ActRII. Por ejemplo, una semivida corta puede dar origen a efectos biológicos más transitorios y, cuando son parte de un sistema de expresión inducible, pueden permitir un control más estricto de los niveles de polipéptido ActRII recombinante dentro de la célula. En una proteína de fusión Fc, las mutaciones se pueden realizar en el enlazador (si existe alguno) y/o la parte Fc para alterar la semivida de la proteína.

Se puede producir una biblioteca combinatoria por medio de una biblioteca degenerada de genes que codifican una biblioteca de polipéptidos los cuales cada uno incluye al menos una parte de las secuencias de polipéptido ActRII potenciales. Por ejemplo, se puede ligar enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias génicas de manera que el conjunto degenerado de secuencias de nucleótidos de polipéptido ActRII potenciales se pueda expresar como polipéptidos individuales o, como alternativa, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para expresión de fagos).

Existen muchas maneras mediante las cuales la biblioteca de homólogos potenciales se puede generar a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia génica degenerada se puede realizar en un sintetizador de ADN automático y los genes sintéticos después se pueden ligar en un vector apropiado para expresión. La síntesis de oligonucleótidos degenerados se conoce bien en la técnica (véase, por ejemplo, Narang, SA (1983) Tetrahedron 39: 3; Itakura et al., (1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier págs. 273-289; Itakura et al., (1984) Annu. Rev. Biochem. 53: 323; Itakura et al., (1984) Science 198: 1056; Ike et al., (1983) Nucleic Acid Res. 11: 477). Tales técnicas se han empleado en la evolución dirigida de otras proteínas (véase, por ejemplo, Scott et al., (1990) Science 249: 386-390; Roberts et al., (1992)

PNAS USA 89: 2429-2433; Devlin et al., (1990) Science 249: 404-406; Cwirla et al., (1990) PNAS USA 87: 6378-6382; Así como las Patentes de Estados Unidos N°: 5.223.409, 5.198.346 y 5.096.815).

Como alternativa, se pueden utilizar otras formas de mutagénesis para
 5 generar una biblioteca combinatoria. Por ejemplo, se pueden generar variantes de polipéptido ActRII y aislarse a partir de una biblioteca mediante selección usando, por ejemplo, mutagénesis mediante alanina y similares (Ruf et al., (1994) Biochemistry 33: 1565-1572; Wang et al., (1994) J. Biol. Chem. 269: 3095-3099; Balint et al., (1993) Gene 137: 109-118; Grodberg et al., (1993) Eur. J. Biochem.
 10 218: 597-601; Nagashima et al., (1993) J. Biol. Chem. 268: 2888-2892; Lowman et al., (1991) Biochemistry 30: 10832-10838 y Cunningham et al., (1989) Science 244: 1081-1085), por mutagénesis mediante enlazador (Gustin et al., (1993) Virology 193: 653-660; Brown et al., (1992) Mol. Cell Biol. 12: 2644-2652; McKnight et al., (1982) Science 232: 316); mediante mutagénesis por saturación
 15 (Meyers et al., (1986) Science 232: 613); mediante mutagénesis por PCR (Leung et al., (1989) Method Cell Mol Biol 1: 11-19) o mediante mutagénesis aleatoria, que incluye mutagénesis química, etc. (Miller et al., (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY y Greener et al., (1994) Strategies in Mol Biol 7: 32-34). La mutagénesis mediante enlazador,
 20 particularmente en un marco combinatorio, es un método atractivo para identificar formas truncadas (bioactivas) de polipéptidos ActRII.

En el campo se conoce una amplia variedad de técnicas para seleccionar productos génicos de bibliotecas combinatorias realizados por mutaciones y truncamientos puntuales y, en cuanto a eso, para seleccionar genotecas de ADNc
 25 para productos génicos que tengan una propiedad determinada. Tales técnicas generalmente serán adaptables para selección rápida de las bibliotecas génicas generadas por la mutagénesis combinatoria de polipéptidos ActRII. Las técnicas más ampliamente usadas para seleccionar bibliotecas de genes grandes típicamente comprenden clonación de la biblioteca de genes en vectores de
 30 expresión replicables, transformar células apropiadas con la biblioteca resultante

de vectores y expresar los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilite el aislamiento relativamente fácil del vector que codifica el gen cuyo producto se ha detectado. Los ensayos preferidos incluyen ensayos de unión a activina y ensayos de señalización de células mediada por activina.

En determinadas realizaciones, los polipéptidos ActRII de la invención pueden comprender además modificaciones post-traduccionales además de cualquiera que esté presente de forma natural en los polipéptidos ActRII. Tales modificaciones incluyen, pero sin limitación, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. Como resultado, los polipéptidos ActRII modificados pueden contener elementos no aminoacídicos, tales como polietilen glicoles, lípidos, poli o monosacáridos y fosfatos. Los efectos de tales elementos no aminoacídicos sobre la funcionalidad de un polipéptido ActRII se pueden ensayar como se ha descrito en este documento para otras variantes de polipéptido ActRII. Cuando un polipéptido ActRII se produce en células mediante la escisión de una forma naciente del polipéptido ActRII, el procesamiento post-traducciona l también puede ser importante para corregir el plegamiento y/o función de la proteína. Diferentes células (tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades post-traduccionales y se pueden elegir para asegurar la modificación y procesamiento correcto de los polipéptidos ActRII.

En determinados aspectos, las variantes funcionales o formas modificadas de los polipéptidos ActRII incluyen proteínas de fusión que tienen al menos una parte de los polipéptidos ActRII y uno o más dominios de fusión. Los ejemplos bien conocidos de tales dominios de fusión incluyen, pero sin limitación, polihistidina, Glu-Glu, glutatión S transferasa (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), una proteína de unión a maltosa (MBP) o albúmina sérica humana. Un dominio de fusión se puede seleccionar para conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para aislamiento de las proteínas de fusión

mediante cromatografía de afinidad. Con el propósito de la purificación por afinidad, se usan matrices pertinentes para cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas a glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Muchas de tales matrices están disponibles en forma de "kit", tales como el sistema de purificación

5 Pharmacia GST y el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil con compañeros de fusión (HIS₆). Como otro ejemplo, se puede seleccionar un dominio de fusión para facilitar la detección de los polipéptidos ActRII. Los ejemplos de tales dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (por ejemplo, GFP) así como "etiquetas de epítomos", que habitualmente son secuencias peptídicas cortas

10 para las cuales está disponible un anticuerpo específico. Las etiquetas de epítipo conocidas para las que están fácilmente disponibles anticuerpos monoclonales incluyen etiquetas FLAG, hemaglutinina de virus influenza (HA) y c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de proteasa, tal como para Factor Xa o Trombina, que permite a la proteasa pertinente digerir

15 parcialmente las proteínas de fusión y liberar de ese modo las proteínas recombinantes de las mismas. Después las proteínas liberadas se pueden aislar a partir del dominio de fusión por separación cromatográfica posterior. En determinadas realizaciones preferidas, un polipéptido ActRII se fusiona con un dominio que estabiliza el polipéptido ActRII *in vivo* (un dominio "estabilizador").

20 "Estabilizador" se refiere a cualquier cosa que aumente la semivida en suero, independientemente de si es debido a la destrucción disminuida, eliminación disminuida por el riñón u otro efecto farmacocinético. Las fusiones con la parte Fc de una inmunoglobulina se conoce que confieren propiedades farmacocinéticas deseables en una amplia variedad de proteínas. Análogamente, las fusiones a

25 albúmina sérica humana pueden conferir propiedades deseables. Otros tipos de dominios de fusión que se pueden seleccionar incluyen dominios multimerizantes (por ejemplo, dimerizantes, tetramerizantes) y dominios funcionales (que confieren una función biológica adicional, tal como estimulación adicional de crecimiento muscular).

Como un ejemplo específico, la presente invención proporciona una proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIa fusionado a un dominio Fc (por ejemplo, SEC ID N°: 6).

5 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD(A) VSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A) VSNKALPVPIEKTISKAK
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGD
 PFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN(A) HYTQKSLSLSPGK*

Como un ejemplo específico adicional, la presente invención proporciona una proteína de fusión que comprende un dominio extracelular soluble de ActRIIb fusionado a un dominio Fc (por ejemplo, SEC ID N°: 21).

10 SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLD
 DFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGHTTCP
 PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

Se entiende que elementos diferentes de las proteínas de fusión se pueden ordenar de cualquier manera que sea consistente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un polipéptido ActRII se puede poner C terminal a un dominio heterólogo o, como alternativa, un dominio heterólogo se puede poner C terminal a

un polipéptido ActRII. El dominio de polipéptido ActRII 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 terminal a cualquier dominio o entre los dominios.

5 En determinadas realizaciones, los polipéptidos ActRII de la presente invención contienen una o más modificaciones que son capaces de estabilizar los polipéptidos ActRII. Por ejemplo, tales modificaciones mejoran la semivida *in vitro* de los polipéptidos ActRII, mejoran la semivida circulatoria de los polipéptidos ActRII o reducen la degradación proteolítica de los polipéptidos ActRII. Tales
10 modificaciones estabilizantes incluyen, pero sin limitación, proteínas de fusión (que incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión que comprenden un polipéptido ActRII y un dominio estabilizador), modificaciones de un sitio de glicosilación (que incluyen, por ejemplo, adición de un sitio de glicosilación a un polipéptido ActRII) y modificaciones de restos de carbohidratos (que incluyen, por ejemplo, remoción de
15 restos de carbohidrato de un polipéptido ActRII). Como se usa en este documento, la expresión "dominio estabilizador" no sólo 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 proteináceas tales como un resto de carbohidrato o resto no proteináceo, tal como polietilen glicol.

20 En determinadas realizaciones, la presente invención hace disponibles formas aisladas y/o purificadas de los polipéptidos ActRII, que se aíslan a partir de o, de otra manera, están sustancialmente libres de otras proteínas. Los polipéptidos ActRII generalmente se producirán mediante expresión a partir de ácidos nucleicos recombinantes.

25

3. Ácidos Nucleicos que Codifican Polipéptidos ActRII

En determinados aspectos, la invención proporciona ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican cualquiera de los polipéptidos ActRII (por ejemplo, polipéptidos ActRIIa soluble y polipéptidos ActRIIb solubles), que incluyen
30 fragmentos, variantes funcionales y proteínas de fusión descritas en este

documento. Por ejemplo, la SEC ID N°: 4 codifica el polipéptido precursor de ActRIIa humano de origen natural, mientras que la SEC ID N°: 5 codifica el dominio extracelular procesado de ActRIIa. Por ejemplo, la SEC ID N°: 18 codifica el polipéptido precursor de ActRIIb humano de origen natural, mientras que la SEC ID N°: 19 codifica el dominio extracelular procesado de ActRIIb. Los ácidos nucleicos objeto pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Tales ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN. Estos ácidos nucleicos se pueden usar, por ejemplo, en métodos para preparar polipéptidos ActRII o como agentes terapéuticos directos (por ejemplo, en un enfoque de terapia génica).

En determinados aspectos, se aprecia adicionalmente que los ácidos nucleicos objeto que codifican polipéptidos ActRIIa incluyen ácidos nucleicos que son variantes de SEC ID N°: 4 ó 5. En determinados aspectos, se aprecia adicionalmente que los ácidos nucleicos objeto que codifican polipéptidos ActRIIb incluyen ácidos nucleicos que son variantes de SEC ID N°: 18 ó 19. Las secuencias de nucleótidos variantes incluyen secuencias que difieren en una o más sustituciones, adiciones o supresiones de nucleótidos, tales como variantes alélicas.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona secuencias de ácidos nucleicos aisladas o recombinantes que tienen una identidad de al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con la SEC ID N°: 4, 5, 18 ó 19. Un especialista en la técnica apreciará que las secuencias de ácidos nucleicos complementarias a SEC ID N°: 4, 5, 18 ó 19 y variantes de SEC ID N°: 4, 5, 18 ó 19 también están dentro del alcance de esta invención. En realizaciones adicionales, las secuencias de ácidos nucleicos de la invención pueden ser aisladas, recombinantes y/o fusionadas con una secuencia de nucleótidos heteróloga o en una genoteca de ADN.

En otras realizaciones, los ácidos nucleicos de la invención también incluyen secuencias de nucleótidos que hibridan en condiciones altamente rigurosas a la secuencia nucleotídica indicada en la SEC ID N°: 4, 5, 18 ó 19, secuencia de complemento de SEC ID N°: 4, 5, 18 ó 19 o fragmentos de las

mismas. Como se ha descrito anteriormente, un especialista en la técnica apreciará fácilmente que las condiciones de rigurosidad apropiadas que promueven la hibridación de ADN pueden variar. Por ejemplo, se puede realizar la hibridación a 6,0 x cloruro de sodio/citrato de 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 se puede seleccionar desde una rigurosidad baja de aproximadamente 2,0 x SSC a 50°C hasta una rigurosidad alta de aproximadamente 0,2 x SSC a 50°C. Además, la temperatura en la etapa de lavado se puede aumentar desde condiciones de rigurosidad baja a temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, hasta condiciones de rigurosidad alta a aproximadamente 65°C. Tanto la temperatura como la sal se pueden variar o la temperatura o concentración de sal se puede mantener constante mientras se cambia otra variable. En una realización, la invención proporciona ácidos nucleicos que hibridan en condiciones de rigurosidad baja 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 ha expuesto en la SEC ID N°: 4, 5, 18 ó 19 debido a la degeneración en el código genético también están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, varios aminoácidos se indican mediante más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos de histidina) pueden dar como resultado mutaciones "silentes" que no afectan la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que existan polimorfismos de secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas objeto entre células de mamífero. Un especialista en la técnica apreciará que estas variaciones en uno o más nucleótidos (hasta aproximadamente el 3-5% de los nucleótidos) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína particular pueden existir entre individuos de una especie dada debido a variación alélica natural. Cualquiera y todas las variaciones de tales nucleótidos y polimorfismos de aminoácidos resultantes están dentro del alcance de esta invención.

En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos recombinantes de la invención pueden estar unidos operativamente a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras en una construcción de expresión. Las secuencias de nucleótidos reguladoras generalmente serán apropiadas para la célula hospedadora usada para expresión. En la técnica se conocen numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas para una diversidad de células hospedadoras. Típicamente, dichas una o más secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, pero sin limitación, secuencias promotoras, secuencias líder o de señal, sitios de unión ribosomal, secuencias de inicio y terminación transcripcional, secuencias de inicio y terminación traduccional y secuencias potenciadoras o activadoras. Los promotores constitutivos o inducibles como se conocen en la técnica están contemplados por la invención. Los promotores pueden ser promotores de origen natural o promotores híbridos que combinen elementos de más de un promotor. Puede estar presente una construcción de expresión en una célula en un episoma, tal como un plásmido o la construcción de expresión puede estar insertada en un cromosoma. En una realización preferida, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células hospedadoras transformadas. Los genes marcadores seleccionables se conocen bien en la técnica y variarán con la célula hospedadora usada.

En determinados aspectos de la invención, el ácido nucleico objeto se proporciona en un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido ActRII y unido operativamente a al menos una secuencia reguladora. Las secuencias reguladoras se reconocen en la técnica y se seleccionan para dirigir la expresión del polipéptido ActRII. Por consiguiente, la expresión secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión. La secuencias reguladoras ilustrativas se describen en Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, en estos vectores se puede usar 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 la misma para expresar secuencias de ADN que codifican un polipéptido ActRII. Tales secuencias de control de expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores tempranos y tardíos de SV40, promotor tet, promotor temprano inmediato de adenovirus o citomegalovirus, promotores RSV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, el promotor T7 cuya expresión está dirigida por la ARNA polimerasa T7, las regiones principales operadoras y promotoras del fago lambda, las regiones de control para la proteína de recubrimiento fd, el promotor para 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de fosfatasa ácida, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de acoplamiento α de levadura, el promotor poliédrico del sistema de báculovirus y otras secuencias que se conoce que controlan la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus y diversas combinaciones de los mismos. Se debe entender que el diseño de vectores de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora que se tiene que transformar y/o el tipo de proteína que se desea que se exprese. Además, también se debe considerar el número de copia del vector, la capacidad de controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tales como marcadores antibióticos.

Un ácido nucleico recombinante de la invención se puede producir ligando el gen clonado o una parte del mismo, en un vector adecuado para expresión en células procariotas, células eucariotas (levadura, aviar, de insecto o mamífero) o ambas. Los vehículos de expresión para producción de un polipéptido ActRII recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos obtenidos de pBR322, plásmidos obtenidos de pEMBL, plásmidos obtenidos de PEX, plásmidos obtenidos de pBTac y plásmidos obtenidos de pUC para expresión en células procariotas, tales como *E. coli*.

Algunos vectores de expresión de 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 obtenidos de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamíferos adecuados para transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores están modificados con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y selección de resistencia a fármaco tanto en células procariotas como eucariotas. Como alternativa, se pueden usar derivados de virus tales como el virus de papiloma bovino (BPV-1) o el virus de Epstein-Barr (pHEBo, obtenido de pREP y p205) para expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Los ejemplos de otros sistemas de expresión virales (que incluyen retroviral) se pueden encontrar más adelante en la descripción de sistemas de administración de terapia génica. Los diversos métodos empleados en la preparación de plásmidos y en la transformación de organismos hospedadores se conocen bien en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados para células tanto procariotas como eucariotas, así como procedimientos recombinantes generales, véase *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3ª Ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). En algunos casos, puede ser deseable expresar los polipéptidos recombinantes mediante el uso de un sistema de expresión de bacteriología. Los ejemplos de tales sistemas de expresión de bacteriología incluyen vectores obtenidos de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores obtenidos de pAcUW (tales como pAcUW1) y vectores obtenidos de pBlueBac (tales como el β -gal que contiene pBlueBac III).

En una realización preferida, se diseñará un vector para producción de los polipéptidos ActRII objeto en células CHO, tales como un vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif) y vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wise). Como será evidente, las construcciones génicas objeto se pueden usar para provocar la expresión de los polipéptidos ActRII objeto en células propagadas en cultivo, por ejemplo, para

producir proteínas, que incluyen proteínas de fusión o proteínas de variante, para purificación.

Esta descripción también se refiere a una célula hospedadora transfectada con un gen recombinante que incluye una secuencia codificante (por ejemplo, SEC ID N°: 4, 5, 18 ó 19) para uno o más de los polipéptidos ActRII objeto. La célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido ActRII de la invención se puede expresar en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (por ejemplo, usando un sistema de expresión de bacterióvirus), levaduras o células de mamífero. Los especialistas en la técnica conocen otras células hospedadoras adecuadas.

En consecuencia, la presente invención se refiere además a métodos para producir los polipéptidos ActRII objeto. Por ejemplo, una célula hospedadora transfectada con un vector de expresión que codifica un polipéptido ActRIIa o ActRIIb se puede cultivar en condiciones apropiadas para permitir que ocurra la expresión del polipéptido ActRII. El polipéptido ActRII se puede secretar y aislar a partir de una mezcla de células y medio que contiene el polipéptido ActRII. Como alternativa, el polipéptido ActRII se puede retener citoplasmáticamente o en una fracción de membrana y recoger y lisar las células y aislar la proteína. Un cultivo celular incluye células hospedadoras, medios y otros subproductos. Los medios adecuados para cultivo celular se conocen en la técnica. Los polipéptidos ActRII objeto se pueden aislar a partir de medio de cultivo celular, células hospedadoras o ambos, usando técnicas conocidas en el campo para purificar proteínas, que incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis, purificación por inmovinoafinidad con anticuerpos específicos para epítopos particulares de los polipéptidos ActRII y purificación por afinidad con un agente que se une a un dominio fusionado al polipéptido ActRII (por ejemplo, se puede usar una columna de proteína A para purificar una fusión de ActRIIa-Fc o ActRIIb-Fc). En una realización preferida, el polipéptido ActRII es una proteína de fusión que contiene un dominio que facilita su purificación. En una realización preferida, la purificación se consigue mediante una serie de etapas de

cromatografía en columna, que incluyen, por ejemplo, tres o más de las siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de Q sefarosa, cromatografía de fenilsefarosa, cromatografía por exclusión de tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación se podría completar con
5 filtración viral e intercambio de tampón. Como se ha demostrado en este documento, la proteína ActRIIa-hFc se purificó hasta una pureza de > el 98% como se determinó por cromatografía por exclusión de tamaño y > el 95% como se determinó por SDS PAGE. Este nivel de pureza fue suficiente para conseguir resultados deseables en ratones, ratas y primates no humanos.

10 En otra realización, un gen de fusión de codifica una secuencia líder de purificación, tal como una secuencia de sitio de escisión poli-(His)/enteroquinasa en el extremo N de la parte deseada del polipéptido ActRII recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada mediante cromatografía por afinidad usando una resina de metal Ni^{2+} . Después la secuencia líder de
15 purificación se puede retirar posteriormente mediante tratamiento con enteroquinasa para proporcionar el polipéptido ActRII purificado (por ejemplo, véase, Hochuli et al., (1987) *J. Chromatography* 411: 177 y Janknecht et al., *PNAS USA* 88: 8972).

Las técnicas para preparar genes de fusión son bien conocidas.
20 Básicamente, se realiza la unión de diversos fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias polipeptídicas de acuerdo con técnicas convencionales, empleando extremos romos o escalonados para ligamiento, digestión de enzima de restricción para proporcionar el extremo apropiado, relleno de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento de fosfatasa alcalina para evitar unión
25 indeseada y ligamiento enzimático. En otra realización, el gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Como alternativa, se puede realizar la amplificación por PCR de fragmentos de genes usando cebadores de anclaje que dan origen a protuberancias complementarias entre dos fragmentos de genes consecutivos que
30 posteriormente se pueden hibridar para generar una secuencia de genes

quimérica (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

4. Antagonistas de Activina y ActRII Alternativos

Los datos presentados en este documento demuestran que los antagonistas de señalización de activina-ActRII se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos o hemoglobina. Aunque los polipéptidos ActRIIa y ActRIIb solubles y, particularmente ActRIIa-Fc y ActRIIb-Fc son antagonistas preferidos y aunque tales antagonistas pueden influir en los niveles de glóbulos rojos a través de un mecanismo diferente al antagonismo a activina (por ejemplo, la inhibición de activina puede ser un indicador de la tendencia de un agente a inhibir las actividades de un espectro de moléculas, que incluyen, tal vez, otros miembros de la superfamilia TGF-beta y tal inhibición colectiva puede conducir al efecto deseado sobre la hematopoyesis), se espera que otros tipos de antagonistas de activina-ActRII sean útiles, incluyendo anticuerpos anti-activina (por ejemplo, activina β_A , β_B , β_C y β_E), anticuerpos anti-ActRIIa, anticuerpos anti-ActRIIb, antisentido, ácidos nucleicos de ARNi o ribozima que inhiben la producción de ActRIIa y/o ActRIIb y otros inhibidores de activina, ActRIIb o ActRIIa, particularmente aquellos que interrumpen la unión a activina-ActRIIa y/o activina-ActRIIb.

Un anticuerpo que es específicamente reactivo con un polipéptido ActRIIb (por ejemplo, un polipéptido ActRIIa o ActRIIb soluble) y que se une competitivamente a ligando con el polipéptido ActRII o, de otra manera, inhibe la señalización mediada por ActRII se puede usar como un antagonista de las actividades del polipéptido ActRII. Análogamente, se puede usar como un antagonista un anticuerpo que sea específicamente reactivo con un polipéptido de activina β_A , β_B , β_C o β_E o cualquier heterodímero de los mismos y que interrumpa la unión a ActRIIa y/o ActRIIb.

Usando inmunógenos obtenidos a partir de un polipéptido ActRIIa, polipéptido ActRIIb o un polipéptido de activina, se pueden preparar antisueros o anticuerpos monoclonales anti-proteína/anti-péptido mediante protocolos

convencionales (véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. por Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Un mamífero, tal como un ratón, un hámster o un conejo se puede inmunizar con una forma inmunogénica del polipéptido de activina, ActRIIa o ActRIIb, un fragmento antigénico que sea capaz de provocar una respuesta a anticuerpo o una proteína de fusión. Las técnicas para conferir inmunogenicidad sobre una proteína o péptido incluyen conjugación a vehículos u otras técnicas bien conocidas en el campo. Una parte inmunógena de un polipéptido ActRII o activina se puede administrar en presencia de adyuvante. El progreso de la inmunización se puede supervisar mediante la detección de títulos de anticuerpo en plasma o suero. Se puede usar ELISA convencional u otros inmunoensayos con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos.

A continuación de la inmunización de un animal con una preparación antigénica de un polipéptido de activina, ActRIIa o ActRIIb, se puede obtener antisuero y, si se desea, se pueden aislar anticuerpos policlonales a partir del suero. Para producir anticuerpos monoclonales, se pueden recoger células productoras de anticuerpo (linfocitos) a partir de un animal inmunizado y fusionarse mediante procedimientos de fusión celular somática convencional con células inmortalizantes tales como células de mieloma para producir células de hibridoma. Tales técnicas se conocen en el campo e incluyen, por ejemplo, la técnica de hibridoma (desarrollada originalmente por Kohler y Milstein, (1975) *Nature*, 256: 495-497), la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbar et al., (1983) *Immunology Today*, 4: 72) y la técnica de hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales (Cole et al., (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. págs. 77-96). Las células de hibridoma se pueden seleccionar inmunoquímicamente para producción de anticuerpos específicamente reactivos con un polipéptido de activina, ActRIIa o ActRIIb y anticuerpos monoclonales aislados a partir de un cultivo que comprende tales células de hibridoma.

El término "anticuerpo" como se usa en este documento tiene por objeto incluir anticuerpos completos, por ejemplo, de cualquier isotipo (IgG, IgA, IgM, IgE, etc) e incluye fragmentos o dominios de inmunoglobulinas que son reactivos con un antígeno seleccionado. Los anticuerpos se pueden fragmentar usando técnicas convencionales y los fragmentos seleccionarse por su utilidad y/o interacción con un epítipo específico de interés. Por tanto, el término incluye segmentos de partes de una molécula de anticuerpo escindidas proteolíticamente o preparadas de forma recombinante que son capaces de reaccionar selectivamente con una proteína determinada. Los ejemplos no limitantes de tales fragmentos proteolíticos y/o recombinantes incluyen Fab, F (ab')₂, Fab', Fv y anticuerpos de cadena única (scFv) que contienen un dominio V[L] y/o V[H] unido por un enlazador peptídico. Los scFv se pueden unir covalentemente o no covalentemente para formar anticuerpos que tengan dos o más sitios de unión. El término anticuerpo también incluye anticuerpos policlonales, monoclonales u otras preparaciones purificadas de anticuerpos y anticuerpos recombinantes. La expresión "anticuerpo recombinante", se refiere a un anticuerpo o dominio de unión a antígeno de una inmunoglobulina, expresado a partir de un ácido nucleico que se ha construido usando las técnicas de biología molecular, tal como un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano completamente desarrollado a partir de un anticuerpo de cadena única. Los anticuerpos de dominio único y cadena única también están incluidos dentro de la expresión "anticuerpo recombinante".

En determinadas realizaciones, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal y en determinadas realizaciones, la invención hace disponibles métodos para generar anticuerpos nuevos. Por ejemplo, un método para generar un anticuerpo monoclonal que se una específicamente a un polipéptido ActRIIa, un polipéptido ActRIIb o un polipéptido de activina puede comprender administrar a un ratón una cantidad de una composición inmunogénica que comprende el polipéptido antigénico eficaz para estimular una respuesta inmune detectable, obtener células productoras de anticuerpos (por

ejemplo, células del bazo) a partir del ratón y fusionar las células productoras de anticuerpo con células de mieloma para obtener hibridomas productores de anticuerpo y ensayar los hibridomas productores de anticuerpo y ensayar los hibridomas productores de anticuerpo para identificar un hibridoma que produzca un anticuerpo monoclonal se una específicamente al antígeno. Una vez obtenido, un hibridoma se puede propagar en un cultivo celular, opcionalmente en condiciones de cultivo donde las células obtenidas de hibridoma produzcan el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno. El anticuerpo monoclonal se puede purificar a partir del cultivo celular.

El adjetivo “específicamente reactivo con” como se usa con referencia a un anticuerpo tiene por objeto referirse, como se aprecia generalmente en la técnica, a que el anticuerpo es suficientemente selectivo entre el antígeno de interés (por ejemplo, un polipéptido de activina, ActRIIa o ActRIIb) y otros antígenos que no son de interés, que el anticuerpo es útil para, como mínimo, detectar la presencia del antígeno de interés en un tipo particular de muestra biológica. En determinados métodos que emplean el anticuerpo, tales como aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable un grado mayor de especificidad de unión. Los anticuerpos monoclonales generalmente tienen una tendencia mayor (en comparación con anticuerpos policlonales) a diferenciar eficazmente entre los antígenos deseados y polipéptidos de reacción cruzada. Una característica que influye en la especificidad de una interacción anticuerpo: antígeno es la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Aunque la especificidad deseada se puede alcanzar con una variedad de afinidades diferentes, generalmente los anticuerpos preferidos tendrán una afinidad (una constante de disociación) de aproximadamente 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M o menos.

Además, las técnicas usadas para seleccionar anticuerpos para identificar un anticuerpo deseable pueden influir en las propiedades del anticuerpo obtenido. Por ejemplo, si se tiene que usar un anticuerpo para unión a un antígeno en solución, puede ser deseable ensayar la unión de solución. Están disponibles una diversidad de técnicas diferentes para ensayar la interacción entre anticuerpos y

antígenos para identificar anticuerpos particularmente deseables. Tales técnicas incluyen ELISA, ensayos de unión de resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, el ensayo de unión Biacore™, Biacore AB, Uppsala, Suecia), ensayos de tipo sándwich (por ejemplo, el sistema de perla paramagnética de IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), transferencias de western, ensayos de inmunoprecipitación e inmunohistoquímica.

Los ejemplos de categorías de compuestos de ácidos nucleicos que son antagonistas de activina o ActRII incluyen ácidos nucleicos antisentido, construcciones de ARNi y construcciones de ácidos nucleicos catalíticos. Un compuesto de ácido nucleico puede ser mono o bicatenario. Un compuesto bicatenario también puede incluir regiones de protuberancias o no complementariedad, donde una o la otra hebra es monocatenaria. Un compuesto monocatenario puede incluir regiones de auto complementariedad, lo que significa que el compuesto forma una estructura denominada "horquilla" o "tallo-lazo", con una región de estructura de doble hélice. Un compuesto de ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que sea complementaria a una región que consiste en no más de 1000, no más de 500, no más de 250, no más de 100 o no más de 50, 35, 25, 22, 20, 18 ó 15 nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos de ActRII de longitud completa o secuencia de ácidos nucleicos de activina β_A , β_B , β_C o β_E . La región de complementariedad preferiblemente tendrá al menos 8 nucleótidos y, opcionalmente, aproximadamente de 18 a 35 nucleótidos. Una región de complementariedad puede estar dentro de un intrón, una secuencia codificante o una secuencia no codificante del transcrito diana, tal como la parte de secuencia codificante. En general, un compuesto de ácido nucleico tendrá una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 500 nucleótidos o pares de bases de longitud y, opcionalmente, la longitud será de aproximadamente 14 a aproximadamente 50 nucleótidos. Un ácido nucleico puede ser un ADN (particularmente para uso como un antisentido), ARN o híbrido ARN:ADN. Cualquiera de las hebras puede incluir una mezcla de ADN y ARN, así como formas modificadas que no se pueden clasificar fácilmente como ADN o ARN.

Análogamente, un compuesto bicatenario puede ser ADN:ADN, ADN:ARN o ARN:ARN y una cualquiera de las hebras también puede incluir una mezcla de ADN y ARN, así como formas modificadas que no se pueden clasificar fácilmente como ADN o ARN. Un compuesto de ácido nucleico puede incluir cualquiera de una diversidad de modificaciones, que incluyen una o más modificaciones a la cadena principal (la parte azúcar-fosfato en un ácido nucleico natural, que incluye uniones internucleotídicas) o la parte de base (la parte de purina o pirimidina de un ácido nucleico natural). Un compuesto de ácido nucleico antisentido preferiblemente tendrá una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos y con frecuencia contendrá una o más modificaciones para mejorar características tales como estabilidad en el suero, en una célula o en un lugar donde el compuesto tiene probabilidades de administrarse, tal como el estómago en caso de compuestos administrados por vía oral y los pulmones para compuestos inhalados. En el caso de una construcción de ARNi, la hebra complementaria al transcrito diana generalmente será ARN o modificaciones del mismo. La otra hebra puede ser ARN, ADN o cualquier otra variación. La parte doble de una construcción de ARNi de "horquilla" bicatenaria o monocatenaria generalmente tendrá una longitud de 18 a 40 nucleótidos de longitud y, opcionalmente, aproximadamente 21 a 23 nucleótidos de longitud, siempre y cuando sirva como un sustrato de Dicer. Los ácidos nucleicos catalíticos o enzimáticos pueden ser ribozimas o enzimas de ADN y también pueden contener formas modificadas. Los compuestos de ácidos nucleicos pueden inhibir la expresión de la diana en aproximadamente el 50%, el 75%, el 90% o más cuando se ponen en contacto con células en condiciones fisiológicas y en una concentración en la que un control sin sentido o sentido tenga poco o ningún efecto. Las concentraciones preferidas para ensayar el efecto de compuestos de ácidos nucleicos son 1,5 y 10 micromolar. Los compuestos de ácidos nucleicos también se pueden ensayar para determinar los efectos sobre, por ejemplo, los niveles de glóbulos rojos.

30

5. Ensayos de Selección

En determinados aspectos, la presente invención se refiere al uso de polipéptidos ActRII (por ejemplo, polipéptidos ActRIIa o ActRIIb solubles) y polipéptidos de activina para identificar compuestos (agentes) que sean agonistas o antagonistas de la ruta de señalización de activina-ActRIIa y/o activina-ActRIIb. Los compuestos identificados a través de esta selección se pueden ensayar para evaluar su capacidad de modular los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina y/o reticulocitos *in vivo* o *in vitro*. Estos compuestos se pueden ensayar, por ejemplo, en modelos animales.

Existen numerosos enfoques para seleccionar los agentes terapéuticos para aumentar los niveles de glóbulos rojos o hemoglobina dirigiendo la señalización de activina y ActRII. En determinadas realizaciones, se puede realizar la selección de alto rendimiento de compuestos para identificar agentes que alteren los efectos mediados por activina o ActRII sobre una línea celular seleccionada. En determinadas realizaciones, el ensayo se realiza para seleccionar e identificar compuestos que inhiben o reducen específicamente la unión de un polipéptido ActRIIa o ActRIIb a activina. Como alternativa, el ensayo se puede usar para identificar compuestos que mejoren la unión de un polipéptido ActRIIa o ActRIIb a activina. En una realización adicional, los compuestos se pueden identificar por su capacidad de interaccionar con una activina, polipéptido ActRIIb o polipéptido ActRIIa.

Una diversidad de formatos de ensayo será suficiente y, a la luz de la presente descripción, un especialista en la técnica comprenderá, sin embargo, aquellos que no se describen expresamente en este documento. Como se describe en este documento, los compuestos de ensayo (agentes) de la invención se pueden crear por cualquier método químico combinatorio. Como alternativa, los compuestos objeto pueden ser biomoléculas de origen natural sintetizadas *in vivo* o *in vitro*. Los compuestos (agentes) que se tienen que ensayar para determinar su capacidad de actuar como moduladores de crecimiento de tejido se pueden producir, por ejemplo, por bacterias, levaduras, plantas u otros organismos (por

ejemplo, productos naturales), producirse químicamente (por ejemplo, moléculas pequeñas, que incluyen peptidomiméticos) o producirse de forma recombinante. Los compuestos de ensayo contemplados por la presente invención incluyen moléculas orgánicas no peptídicas, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, azúcares, hormonas y moléculas de ácido nucleico. En una realización específica, el agente de ensayo es una molécula orgánica pequeña que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 2.000 Daltons.

Los compuestos de ensayo de la invención se pueden proporcionar como entidades únicas y separadas o proporcionarse en bibliotecas de complejidad mayor, tales como preparados 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 compuestos de ensayo al sistema de ensayo puede ser en forma aislada o como mezclas de compuestos, especialmente en etapas de selección iniciales. Opcionalmente, los compuestos se pueden derivatizar opcionalmente con otros compuestos y tener grupos derivatizantes que faciliten el aislamiento de los compuestos. Los ejemplos no limitantes de grupos derivatizantes incluyen biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína fluorescente verde, isótopos, polihistidina, perlas magnéticas, glutatión S transferasa (GST), agentes reticulantes fotoactivables o cualquier combinación de los mismos.

En muchos programas de selección de fármacos que ensayan bibliotecas de compuestos y extractos naturales, los ensayos de alto rendimiento son deseables para maximizar el número de compuestos estudiados en un período de tiempo dado. Los ensayos que se realizan en sistemas sin células, tales como los que se pueden obtener con proteínas purificadas o semi-purificadas, con frecuencia se prefieren como selecciones "principales" ya que los mismos se pueden generar para permitir el desarrollo rápido y la detección relativamente fácil de una alteración en una diana molecular que está mediada por un compuesto de ensayo. Además, los efectos de toxicidad celular o biodisponibilidad del compuesto de ensayo se pueden ignorar generalmente en el sistema *in vitro*,

enfocándose el ensayo, en lugar de ello, principalmente en el efecto del fármaco sobre la diana molecular como puede ser evidente en una alteración de afinidad de unión entre un polipéptido ActRIIa y activina y/o entre un polipéptido ActRIIb y activina.

5 Simplemente como ilustración, en un ensayo de selección ilustrativo de la presente invención, el compuesto de interés se pone en contacto con un polipéptido ActRIIa aislado y purificado que normalmente es capaz de unirse a activina. Después, a la mezcla del compuesto y polipéptido ActRIIa se añade una composición que contiene un ligando de ActRIIa. La detección y cuantificación de
10 complejos ActRIIa/activina proporciona un medio para determinar la eficacia del compuesto para inhibir (o potenciar) la formación de complejos entre el polipéptido ActRIIa y activina. La eficacia del compuesto se puede evaluar generando curvas de dosis-respuesta a partir de datos obtenidos usando concentraciones diversas del compuesto de ensayo. Además, también se puede realizar un ensayo de
15 control para proporcionar una línea basal para comparación. Por ejemplo, en un ensayo de control, se añade activina aislada y purificada a una composición que contiene el polipéptido ActRIIa y la formación de complejo ActRIIa/activina se cuantifica en ausencia del compuesto de ensayo. Se apreciará que, en general, el orden en que los reactantes se mezclen puede variar y se pueden mezclar
20 simultáneamente. Además, en lugar de proteínas purificadas, se pueden usar extractos y lisados celulares para producir un sistema de ensayo sin células adecuado. Los compuestos que influyen sobre la señalización de ActRIIb se pueden identificar de una manera similar usando un polipéptido ActRIIb y un ligando de ActRIIb.

25 La formación de complejos entre el polipéptido ActRII y activina se puede detectar mediante una diversidad de técnicas. Por ejemplo, la modulación de la formación de complejos se puede cuantificar usando, por ejemplo, proteínas marcadas de forma detectable tales como polipéptido ActRIIa o ActRIIb o activina marcados radiactivamente (por ejemplo, ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C o ^3H), marcados de forma

fluorescente (por ejemplo, FITC) o marcados enzimáticamente, por inmunoensayo o por detección cromatográfica.

En determinadas realizaciones, la presente invención contempla el uso de ensayos de polarización de fluorescencia y ensayos de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) para medir, directamente o indirectamente, el grado de interacción entre un polipéptido ActRII y su proteína de unión. Además, otros modos de detección, tales como los que se basan en guías de onda óptica (Publicación PCT WO 96/26432 y Patente de Estados Unidos N° 5.677.196), resonancia de plasmón de superficie (SPR), sensores de carga superficial y sensores de fuerza superficial, son compatibles con muchas realizaciones de la invención.

Además, la presente invención contempla el uso de un ensayo de interacción trap, también conocido como el “ensayo de dos híbridos”, para identificar agentes que alteren o potencien la interacción entre un polipéptido ActRII y su proteína de unión. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 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 una realización específica, la presente invención contempla el uso de sistemas de dos híbridos inversos para identificar compuestos (por ejemplo, moléculas pequeñas o péptidos) que disocian las interacciones entre un polipéptido ActRII y su proteína de unión. Véase, por ejemplo, Vidal y Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27: 919-29; Vidal y Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17: 374-81; y Patente de Estados Unidos N° 5.525.490; 5.955.280; y 5.965.368.

En determinadas realizaciones, los compuestos objeto se identifican por su capacidad para interaccionar con un polipéptido ActRII o activina de la invención. La interacción entre el compuesto y el polipéptido ActRIIa, ActRIIb o activina puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, tal interacción se puede identificar en el nivel proteico usando métodos bioquímicos *in vitro*, que incluyen foto-reticulación, unión a ligando marcado radiactivamente y cromatografía de

afinidad (Jakoby WB et al., 1974, Methods in Enzymology 46: 1). En determinados casos, los compuestos se pueden seleccionar en un ensayo basado en mecanismo, tal como un ensayo para detectar compuestos que se unen a un polipéptido activina o ActRII. Esto puede incluir un acontecimiento de unión en fase sólida o fase líquida. Como alternativa, el gen que codifica un polipéptido de activina o ActRII se puede transfectar con un sistema informador (por ejemplo, β -galactosidasa, luciferasa o proteína fluorescente verde) en una célula y seleccionarse frente a la biblioteca opcionalmente mediante una selección de alto rendimiento o con miembros individuales de la biblioteca. Se pueden usar otros ensayos de unión basados en mecanismo, por ejemplo, ensayos de unión que detectan cambios en energía libre. Los ensayos de unión se pueden realizar con la diana unida a un pocillo, perla o microplaca o capturada mediante un anticuerpo inmovilizado o resuelta por electroforesis capilar. Los compuestos unidos se pueden detectar habitualmente usando colorimetría o fluorescencia o resonancia de plasmón superficial.

6. Usos Terapéuticos Ilustrativos

En determinadas realizaciones, los antagonistas de activina-ActRII (por ejemplo, polipéptidos ActRIIa o ActRIIb) de la presente invención se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos en mamíferos tales como roedores y primates y, particularmente, en pacientes humanos. En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona métodos de tratamiento o prevención de anemia en un individuo que necesita el mismo, administrando al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de activina-ActRIIa, tal como un polipéptido ActRIIa o una cantidad eficaz de un antagonista de activina-ActRIIb, tal como un polipéptido ActRIIb. En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para promover la formación de glóbulos rojos en un individuo administrando al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de activina-ActRII, particularmente un polipéptido ActRII. Estos métodos se pueden usar para

tratamientos terapéuticos y profilácticos de mamíferos y, particularmente, seres humanos.

Como se usa en este documento, un 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 con relación a una muestra de control no tratada o retarda la aparición o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o afección con relación a la muestra de control no tratada. El término “tratar”, como se usa en este documento incluye profilaxis de la condición mencionada o mejora o eliminación de la afección una vez que se ha establecido. En cualquier caso, la prevención o tratamiento se puede discernir en el diagnóstico proporcionado por un médico u otro asistente sanitario y el resultado pretendido de la administración del agente terapéutico.

Como se muestra en este documento, los antagonistas de activina-ActRIIa y antagonistas de activina-ActRIIb se pueden usar para aumentar los niveles de glóbulos rojos, hemoglobina o reticulocitos en individuos sanos y tales antagonistas se pueden usar en poblaciones seleccionadas de pacientes. Los ejemplos de poblaciones apropiadas de pacientes incluyen aquellas con niveles indeseablemente bajos de glóbulos rojos o hemoglobina, tales como pacientes que tienen una anemia y aquellos que están en riesgo de desarrollar niveles indeseablemente bajos de glóbulos rojos o hemoglobina, tales como aquellos pacientes que están próximos a someterse a una cirugía mayor u otros procedimientos que pueden dar como resultado pérdida de sangre sustancial. En una realización, un paciente con niveles de glóbulos rojos adecuados se trata con un antagonista de activina-ActRIIa para aumentar los niveles de glóbulos rojos y después se extrae sangre y se almacena para uso posterior en transfusiones. En una realización, un paciente con niveles de glóbulos rojos adecuados se trata con un antagonista de activina-ActRIIb para aumentar los niveles de glóbulos rojos y después se extrae sangre y se almacena para uso posterior en transfusiones.

Los antagonistas de Activina-ActRII descritos en este documento y, particularmente, proteínas ActRIIa-Fc y ActRIIb, se pueden usar para aumentar los

niveles de glóbulos rojos en pacientes que tienen una anemia. Cuando se observan los niveles de hemoglobina en seres humanos, un nivel menor del normal para la categoría apropiada de edad y género puede ser un indicio de anemia, aunque se toman en cuenta las variaciones individuales. Por ejemplo, un nivel de hemoglobina de 12 g/dl generalmente se considera el límite inferior de lo normal en la población adulta general. Las causas potenciales incluyen pérdida de sangre, déficit nutricional, reacción a la medicación, problemas diversos con la médula ósea y muchas enfermedades. Más particularmente, la anemia se ha asociado con una diversidad de trastornos que incluyen, por ejemplo, fallo renal crónico, síndrome mielodisplásico, artritis reumatoide y trasplante de médula ósea. La anemia también puede estar asociada con las siguientes afecciones: tumores sólidos (por ejemplo, cáncer mamario, cáncer pulmonar, 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); terapia de radiación; quimioterapia (por ejemplo, regímenes que contienen platino); enfermedades inflamatorias y autoinmunes, que incluyen, pero sin limitación, artritis reumatoide, otras artritis inflamatorias, lupus eritematoso sistémico (SLE), enfermedades agudas o crónicas de la piel (por ejemplo, psoriasis), enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa); enfermedad o fallo renal agudo o crónico que incluye afecciones idiopáticas o congénitas; enfermedad hepática aguda o crónica; hemorragia aguda o crónica, situaciones en las que la transfusión de glóbulos rojos no es posible debido a alo o auto-anticuerpos del paciente y/o por razones religiosas (por ejemplo, algunos testigos de Jehová); infecciones (por ejemplo, malaria y osteomielitis); hemoglobinopatías, que incluyen, por ejemplo, enfermedad de células falciformes y talasemias; uso o abuso de drogas, por ejemplo, abuso de alcohol; pacientes pediátricos con anemia de cualquier causa para evitar la transfusión y pacientes mayores o pacientes con enfermedad cardiopulmonar subyacente con anemia que no pueden recibir transfusiones debido a preocupaciones por sobrecarga circulatoria.

Los pacientes se pueden tratar con un régimen de dosificación que tenga por objeto restituir al paciente al nivel de hemoglobina diana, habitualmente entre aproximadamente 10 g/dl y aproximadamente 12,5 g/dl y, típicamente, aproximadamente 11,0 g/dl (véase también, Jacobs et al. (2000) Nephrol Dial Transplant 15, 15-19), aunque los niveles diana inferiores pueden causar menos efectos secundarios cardiovasculares. Como alternativa, se pueden usar los niveles de hematocrito (porcentaje del volumen de una muestra de sangre ocupado por las células) como una medida de la condición de los glóbulos rojos. Los niveles de hematocrito de individuos sanos varían del 41 al 51% para hombres adultos y del 35 al 45% para mujeres adultas. Los niveles de hematocrito diana habitualmente están alrededor del 30-33%. Además, los niveles de hemoglobina/hematocrito varían de persona a persona. Por tanto, óptimamente, el nivel de hemoglobina/hematocrito diana se puede individualizar para cada paciente.

El efecto rápido de los antagonistas de activina-ActRIIa descritos en este documento sobre los niveles de glóbulos rojos indica que estos agentes actúan mediante un mecanismo diferente a Epo. Por consiguiente, estos antagonistas pueden ser útiles para aumentar los niveles de glóbulos rojos y hemoglobina en pacientes que no responden bien a Epo. Por ejemplo, un antagonista de activina-ActRIIa puede ser beneficioso para un paciente en el cual la administración de una dosis normal a aumentada (> 300 UI/kg/semana) de EPO no produce el aumento del nivel de hemoglobina hasta el nivel diana. Los pacientes con una respuesta de Epo inadecuada se observan para todos los tipos de anemia, pero se han observado cantidades mayores de pacientes que no responden particularmente frecuentemente en pacientes con cánceres y pacientes con enfermedad renal en fase final. Una respuesta inadecuada a la Epo puede ser constitutiva (es decir, observada después del primer tratamiento con Epo) o adquirida (por ejemplo, observada después del tratamiento repetido con Epo).

Los antagonistas de activina-ActRII también se pueden usar para tratar pacientes que son propensos a los efectos secundarios de Epo. Los efectos

secundarios principales de Epo son un aumento excesivo en los niveles de hematocrito o hemoglobina y policitemia. Los niveles de hematocrito elevados pueden conducir a hipertensión (más particularmente, empeoramiento de hipertensión) y trombosis vascular. Otros efectos secundarios de Epo que se han indicado, algunos de los cuales están relacionados con la hipertensión, son dolores de cabeza, síndrome similar a influenza, obstrucción de shunts, infartos al miocardio y convulsiones cerebrales debido a trombosis, encefalopatía hipertensiva y aplasia 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).

7. Composiciones Farmacéuticas

En determinadas realizaciones, los antagonistas de activina-ActRII (por ejemplo, polipéptidos ActRIIa y ActRIIb) de la presente invención se formulan con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, se puede administrar un polipéptido ActRII solo o como un componente de una formulación farmacéutica (composición terapéutica). Los compuestos objeto se pueden formular para administración en cualquier forma conveniente para uso en medicina humana o veterinaria.

En determinadas realizaciones, el método terapéutico de la invención incluye administrar la composición sistémicamente o localmente como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para uso en esta invención es, por supuesto, en una forma sin pirógeno y fisiológicamente aceptable. Los agentes terapéuticamente útiles diferentes a los antagonistas de activina-ActRII que también se pueden incluir opcionalmente en la composición como se ha descrito anteriormente, se pueden administrar simultáneamente o secuencialmente con los compuestos objeto (por ejemplo, polipéptidos ActRIIa y ActRIIb) en los métodos de la invención.

Típicamente, los antagonistas de activina-ActRII se administrarán por vía parenteral. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden comprender uno o más polipéptidos ActRII en combinación con

- una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables o polvos estériles que se pueden reconstituir en soluciones o dispersiones inyectables estériles inmediatamente antes del uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que vuelven la solución isotónica con la sangre del receptor pretendido o agentes de suspensión o espesantes. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilen glicol, polietilen glicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como etil oleato. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.
- Además, la composición se puede encapsular o inyectar en una forma para administración a un sitio de tejido diana (por ejemplo, médula ósea). En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden incluir una matriz capaz de administrar uno o más compuestos terapéuticos (por ejemplo, polipéptidos ActRIIa o ActRIIb) a un sitio de tejido diana (por ejemplo, médula ósea), proporcionando una estructura para el tejido en desarrollo y óptimamente capaz de reabsorberse en el organismo. Por ejemplo, la matriz puede proporcionar liberación lenta de los polipéptidos ActRII. Tales matrices pueden estar formadas de materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.
- La elección del material de matriz se basa en biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, aspecto cosmético y propiedades de interfase. La aplicación particular de las composiciones objeto definirá la formulación apropiada. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser sulfato de calcio, fosfato tricálcico, hidroxiapatita, ácido poliláctico y polianhídridos biodegradables y químicamente definidos. Otros materiales

potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, tales como colágeno óseo o dérmico. Las matrices adicionales están comprendidas de proteínas puras o componentes de matriz extracelular. Otras matrices potenciales son no biodegradables y químicamente definidas, tales como hidroxiapatita sinterizada, biovidrio, aluminatos u otros cerámicos. Las matrices pueden estar comprendidas de combinaciones de cualquiera de los tipos de material mencionados anteriormente, tales como ácido poliláctico e hidroxiapatita o colágeno y fosfato tricálcico. Los biocerámicos pueden estar alterados en la composición, tales como en calcio-aluminato-fosfato y procesarse para alterar el tamaño de poro, tamaño de partícula, forma de partícula y biodegradabilidad.

En determinadas realizaciones, los métodos de la invención se pueden administrar por vía oral, por ejemplo, en forma de cápsulas, obleas, píldoras, comprimidos, grageas (que usan una base saporífera, habitualmente sacarosa y goma arábiga o de 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 (que usan una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábiga) y/o como elixires bucales y similares, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de un agente como un ingrediente activo. También se puede administrar un agente como un bolo, electuario o pasta.

En formas farmacéuticas sólidas para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), uno o más compuestos terapéuticos de la presente invención se puede mezclar con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o diluyentes, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinil pirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato de

sodio; (5) agentes retardantes de 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, lauril sulfato de sodio y mezclas de los mismos y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tampón. Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina suave y dura usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de elevado peso molecular y similares.

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

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

Las composiciones de la invención también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsificantes y agentes de dispersión. La prevención de la acción de microorganismos se puede asegurar mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido sórbico de fenol 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 conseguir mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Se entiende que el régimen de dosificación será determinado por el médico a cargo del caso considerando factores diversos que modifican la acción de los compuestos objeto de la invención (por ejemplo, polipéptidos ActRIIa y ActRIIb). Los factores diversos incluyen, pero sin limitación, el recuento de glóbulos rojos del paciente, el nivel de hemoglobina u otras evaluaciones de diagnóstico, el recuento de glóbulos rojos diana deseado, la edad, sexo y dieta del paciente, la gravedad de cualquier enfermedad que pueda estar contribuyendo a un nivel de glóbulos rojos disminuido, el tiempo de administración y otros factores clínicos. La adición de otros factores de crecimiento conocidos a la composición final también puede afectar la dosis. El progreso se puede supervisar mediante la evaluación periódica de niveles de glóbulos rojos y hemoglobina, así como evaluaciones de los niveles de reticulocitos y de otros indicadores de los procesos hematopoyéticos.

Experimentos con primates y seres humanos han demostrado que los efectos de ActRIIa-Fc sobre los niveles de glóbulos rojos son detectables cuando el compuesto se dosifica en intervalos y cantidades suficientes para conseguir las concentraciones en suero de aproximadamente 100 ng/ml o mayores durante un período de al menos aproximadamente 20 a 30 días. También se puede usar dosificación para obtener niveles en suero de 200 ng/ml, 500 ng/ml, 1.000 ng/ml o mayores durante un período de al menos 20 a 30 días. Los efectos óseos se

pueden observar en niveles en suero de aproximadamente 200 ng/ml, comenzando los efectos sustanciales a aproximadamente 1000 ng/ml o mayores, a lo largo de un período de al menos aproximadamente 20 a 30 días. Por tanto, si se desea conseguir efectos sobre los glóbulos rojos a la vez que se tienen efectos mínimos sobre los huesos, se puede diseñar un esquema de dosificación para administrar una concentración en suero de entre aproximadamente 100 y 1000 ng/ml a lo largo de un período de aproximadamente 20 a 30 días. En seres humanos, los niveles en suero de 200 ng/ml se pueden conseguir con una dosis única de 0,1 mg/kg o mayor y los niveles en suero de 1000 ng/ml se pueden conseguir con una dosis única de 0,3 mg/kg o mayor. La semivida en suero observada de la molécula está entre aproximadamente 20 y 30 días, sustancialmente más larga que la mayoría de las proteínas de fusión Fc y, por tanto, se puede conseguir un nivel en suero eficaz sostenido, por ejemplo, dosificando con aproximadamente 0,05 a 0,5 mg/kg en una base semanal o bisemanal o se pueden usar dosis más altas con intervalos más largos entre dosificaciones. Por ejemplo, se pueden usar dosis de 0,1 a 1 mg/kg en una base mensual o bimensual.

En determinadas realizaciones, la presente invención también proporciona terapia génica para la producción *in vivo* de polipéptidos ActRII. Esta terapia conseguiría su efecto terapéutico mediante la introducción de las secuencias de polinucleótido ActRIIa o ActRIIb en células o tejidos que tengan los trastornos enumerados anteriormente. La administración de secuencias de polinucleótidos ActRII se puede conseguir usando un vector de expresión recombinante tal como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. El uso de liposomas dirigidos se prefiere para la administración terapéutica de secuencias de polinucleótidos ActRII.

Diversos vectores virales que se pueden utilizar para terapia génica como se ha mostrado en este documento incluyen adenovirus, herpes virus, vaccinia o un virus ARN tal como un retrovirus. El vector retroviral puede ser un derivado de un retrovirus murino o aviar. Los ejemplos de vectores retrovirales en los que se

puede insertar un gen ajeno único incluyen, pero sin limitación: virus de leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus de sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus de tumor mamario murino (MuMTV) y Virus de Sarcoma de Rous (RSV). Varios vectores retrovirales adicionales pueden incorporar genes múltiples. Todos
 5 estos vectores pueden transferir o incorporar un gen de un marcador seleccionable de forma que se puedan identificar y generar células transducidas. Los vectores retrovirales se pueden hacer específicos de diana uniendo, por ejemplo, un azúcar, un glicolípido o una proteína. La dirección preferida se consigue usando un anticuerpo. Los especialistas en la técnica reconocerán que
 10 se pueden insertar secuencias de polinucleótidos específicas en el genoma retroviral o unirse a una envuelta viral para permitir la administración específica de diana del vector retroviral que contienen el polinucleótido ActRII.

Como alternativa, se pueden transfectar directamente células de cultivo tisular con plásmidos que codifican los genes estructurales retrovirales gag, pol y
 15 env, mediante transfección de fosfato de calcio convencional. Después, estas células se transfectan con el plásmido de vector que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retroviral en el medio de cultivo.

Otro sistema de administración dirigida para polinucleótidos ActRII es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen
 20 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 de esta invención es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificial que son útiles como vehículos de administración *in vitro* e *in vivo*. Dentro del interior acuoso se pueden
 25 encapsular ARN, ADN y viriones intactos y administrarse a células en una forma biológicamente activa (véase, por ejemplo, Fraley, et al. Trends Biochem. Sci., 6: 77, 1981). Los métodos para la transferencia génica eficaz que usan un vehículo de liposoma se conocen en la técnica, véase, por ejemplo, Mannino, et al., Biotechnologies, 6: 682, 1988. La composición del liposoma habitualmente es una
 30 combinación de fosfolípidos, habitualmente en combinación con esteroides,

especialmente colesterol. También se pueden usar otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

Los ejemplos de lípidos útiles en producción de liposomas incluyen
5 compuestos fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina. La dirección de liposomas es algo posible basándose en, por ejemplo, especificidad de órgano, especificidad de célula y especificidad de
10 organelo como se conoce en la técnica.

EJEMPLIFICACIÓN

La invención que se describe actualmente de forma general, se entenderá más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen
15 sólo con propósitos de ilustración de determinadas realizaciones y realizaciones de la presente invención y no tienen por objeto limitar la invención.

Ejemplo 1: Proteína de Fusión ActRIIa-Fc

Los solicitantes construyeron una proteína de fusión ActRIIa soluble que
20 tiene el dominio extracelular de un ActRIIa humano fusionado a un dominio Fc humano o de ratón con un enlazador mínimo entre los mismos. Las construcciones se denominan ActRIIa-hFc y ActRIIa-mFc, respectivamente.

Más adelante se muestra ActRIIa-hFc purificado a partir de líneas de células CHO (SEC ID N°: 7):

25

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
CWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVQTQPTSNPVTPK
PPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
VPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

Las proteínas ActRlla-hFc y ActRlla-mFc se expresaron en líneas de células CHO. Se consideraron tres secuencias líderes diferentes:

- 5
- (i)

Melitina de abeja (HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEC ID N°: 8)
- (ii)

Activador de plasminógeno tisular (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEC ID N°: 9)
- (iii)

Nativo: MGAAAKLAFVFLISCSSGA (SEC ID N°: 10)

10

La forma seleccionada emplea el líder de TPA y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos no procesada:

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCY
GDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEG
NMCNEKFSYFPMEVQTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID N°: 13)

15

nucleicos:

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCT
 TCGTTTCGCCCCGGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTT
 TTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCGTGT
 ATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGG
 TTCCATTGAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACA
 GGACTGATTGTGTAGAAAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGA
 GGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCGGAGATGGAAGTCACACAG
 CCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGGAACTCACACAT
 GCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC
 CCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG
 GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
 GGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG
 CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGTCCCCATCGAGAAA
 ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC
 CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA
 GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
 AACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT
 ATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
 GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
 GTCTCCGGGTAAATGAGAATTC (SEC ID N°: 14)

Tanto ActRlla-hFc como ActRlla-mFc fueron marcadamente susceptibles a
 la expresión recombinante. Como se muestra en la Figura 1, la proteína se purificó
 5 como un pico de proteína único bien definido. La secuenciación N-terminal reveló
 una secuencia única de ILGRSTQE (SEC ID N°: 11). La purificación se pudo
 conseguir mediante una serie de etapas de cromatografía en columna, que
 incluyen, por ejemplo, tres o más de las siguientes, en cualquier orden:
 cromatografía de proteína A, cromatografía de Q sefarosa, cromatografía de fenil
 10 sefarosa, cromatografía por exclusión de tamaño y cromatografía de intercambio
 catiónico. La purificación se pudo completar con filtración viral e intercambio de
 tampón. La proteína ActRlla-hFc se purificó hasta una pureza de > el 98% como

se determinó mediante cromatografía por exclusión de tamaño y > el 95% como se determinó por SDS PAGE.

ActRlla-hFc y ActRlla-mFc mostraron una afinidad alta por ligandos, particularmente activina A. GDF-11 o Activina A ("ActA") se inmovilizaron en una microplaca Biacore CM5 usando procedimiento de acoplamiento a amina convencional. Las proteínas ActRlla-hFc y ActRlla-mFc se cargaron en el sistema y se midió la unión. ActRlla-hFc se unió a activina con una constante de disociación (K_D) de 5×10^{12} y la proteína se unió a GDF11 con una K_D de $9,96 \times 10^9$. Véase la Figura 2. ActRlla-mFc se comportó de forma similar.

La ActRlla-hFc fue muy estable en estudios farmacocinéticos. Se dosificaron ratas con 1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg de proteína ActRlla-hFc y los niveles en plasma de la proteína se midieron a las 24, 48, 72, 144 y 168 horas. En un estudio separado, las ratas se dosificaron a 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg. En ratas, ActRlla-hFc tuvo una semivida en suero de 11-14 días y los niveles en circulación del fármaco fueron bastante altos después de dos semanas (11 µg/ml, 110 µg/ml o 304 µg/ml para administraciones iniciales de 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg, respectivamente.) En monos *cynomolgus*, la semivida en plasma fue sustancialmente mayor que 14 días y los niveles circulantes del fármaco fueron 25 µg/ml, 304 µg/ml o 1440 µg/ml para administraciones iniciales de 1 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg, respectivamente.

Ejemplo 2: ActRlla-hFc Aumenta los Niveles de Glóbulos Rojos en Primates No Humanos

El estudio empleó cuatro grupos de cinco monos *cynomolgus* macho y cinco hembras cada uno, con tres por sexo por grupo programados para terminación el día 29 y dos por sexo por grupo programados para terminación el día 57. A cada animal se administró el vehículo (Grupo 1) o ActRlla-Fc a dosis de 1, 10 ó 30 mg/kg (Grupos 2, 3 y 4, respectivamente) por inyección intravenosa (IV) los días 1, 8, 15 y 22. El volumen de dosis se mantuvo a 3 ml/kg. Se evaluaron diversas medidas de niveles de glóbulos rojos dos días antes de la primera

administración y los días 15, 29 y 57 (para los dos animales restantes) después de la primera administración.

La ActRIIa-hFc provoca aumentos estadísticamente significativos en los parámetros de glóbulos rojos medios (recuento de glóbulos rojos) [RBC], hemoglobina [HGB] y hematocrito [HCT]) para machos y hembras, en todos los niveles de dosis y puntos de tiempo a lo largo del estudio, con elevaciones acompañantes en recuentos de reticulocitos absolutos y relativos. (ARTC; RTC). Véanse las Figuras 3-6.

La significancia estadística se calculó para cada grupo de tratamiento con relación a la media para el grupo de tratamiento en la línea basal.

En particular, los aumentos en recuentos de glóbulos rojos y niveles de hemoglobina son aproximadamente equivalentes en magnitud a los efectos indicados con eritropoyetina. La aparición de estos efectos es más rápida con ActRIIa-Fc que con eritropoyetina.

Se observaron resultados similares con ratas y ratones.

Ejemplo 3: ActRIIa-hFc Aumenta los Niveles de Glóbulos Rojos en Pacientes Humanos

La proteína de fusión ActRIIa-hFc descrita en el Ejemplo 1 se administró a pacientes humanos en un estudio aleatorizado de doble ciego controlado por placebo que se condujo para evaluar, principalmente, la seguridad de la proteína en mujeres post-menopáusicas sanas. Cuarenta y ocho sujetos se aleatorizaron en cohortes de 6 para recibir una dosis única de ActRIIa-hFc o placebo (5 activos: 1 placebo). Los niveles de dosis variaron de 0,01 a 3,0 mg/kg por vía intravenosa (IV) y de 0,03 a 0,1 mg/kg por vía subcutánea (SC). Todos los sujetos se siguieron durante 120 días. Además de los análisis farmacocinéticos (PK), también se evaluó la actividad biológica de ActRIIa-hFc a través de la medición de los marcadores bioquímicos de formación y reabsorción ósea y los niveles de FSH.

Para buscar cambios potenciales, se examinaron los números de hemoglobina y RBC con detalle para todos los sujetos durante el transcurso del estudio y se compararon con los niveles de línea basal. Los recuentos de

plaquetas se compararon a lo largo del mismo tiempo que el control. No hubo cambios clínicamente significativos desde los valores de línea basal a lo largo del tiempo para los recuentos de plaquetas

El análisis PK de ActRIIa-hFc presentó un perfil lineal con dosis y una semivida media de aproximadamente 25-32 días. El área bajo la curva (AUC) para ActRIIa-hFc estuvo relacionado linealmente con la dosis y la absorción después de la dosificación SC fue básicamente completa (véanse las Figuras 7 y 8). Estos datos indican que SC es un enfoque deseable para la dosificación debido a que proporciona biodisponibilidad y semivida en suero equivalente para el fármaco mientras evita la punta en concentraciones en suero de fármacos asociada con los primeros días de dosificación IV (véase la Figura 8). ActRIIa-hFc provocó un aumento rápido sostenido y dependiente de dosis en niveles en suero de fosfatasa alcalina específica de hueso (BAP), que es un marcador para crecimiento óseo anabólico y una disminución dependiente de dosis en los niveles de telopéptido colágeno de tipo 1 C-terminal y de fosfatasa ácida resistente a tartrato 5b, que son marcadores para la resorción ósea. Otros marcadores, tales como P1NP mostraron resultados no concluyentes. Los niveles de BAP mostraron efectos casi saturantes en la dosis más alta del fármaco, indicando que los efectos medio máximos de este biomarcador óseo anabólico se podrían conseguir a una dosis de 0,3 mg/kg, con aumentos que varían hasta 3 mg/kg. Calculada como una relación del efecto farmacodinámico a AUC para el fármaco, la CE50 es 51.465 (día*ng/ml). Véase la Figura 9. Estos cambios en el biomarcador óseo se mantuvieron durante aproximadamente 120 días en los niveles de dosis más altos ensayados. También hubo una disminución dependiente de dosis en los niveles de FSH en suero consecuente con la inhibición de activina.

En conjunto, hubo una reducción muy pequeña no relacionada con el fármaco en hemoglobina a lo largo de la primera semana del estudio relacionada probablemente con la flebotomía de estudio en los grupos de 0,01 y 0,03 mg/kg administrados IV o SC. Los resultados de hemoglobina de la administración SC e IV de 0,1 mg/kg fueron estables o mostraron aumentos moderados para los días

8-15. En el nivel de dosis de 0,3 mg/kg IV hubo un aumento evidente en los niveles de HGB tan pronto como en el día 2 y con frecuencia llegando a picos los días 15-29 que no se observaron en los sujetos de placebo. En este punto del estudio, este cambio no ha alcanzado la significancia estadística.

- 5 En conjunto, ActRIIa-hFc mostró un efecto dependiente de dosis sobre los recuentos de glóbulos rojos y recuentos de reticulocitos. Para un resumen de cambios hematológicos, véanse las Figuras 10-13.

Ejemplo 4: Proteínas ActRIIa-Fc Alternativas

- 10 Una diversidad de variantes de ActRIIa que se pueden usar de acuerdo con los métodos descritos en este documento se describen en la Solicitud de Patente Internacional publicada como WO2006/012627 (véase, por ejemplo, págs. 55-58), incorporada en este documento como referencia en su totalidad. Una construcción alternativa puede tener una supresión en la cola del extremo C (los 15 aminoácidos finales del dominio extracelular de ActRIIa. La secuencia para una construcción de este tipo se presenta más adelante (parte Fc subrayada) (SEC ID
- 15 N°: 12):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
CWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPMTGGGTHTCP CPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Ejemplo 5: Proteínas de Fusión ActRIIb-Fc

- 20 Los solicitantes construyeron una proteína de fusión de ActRIIb soluble que tiene el dominio extracelular de ActRIIb humano fusionado a un dominio Fc humano. Una estructura co-cristalina de Activina y ActRIIb extracelular no mostraron ningún papel para los 15 aminoácidos finales (extremo C) (denominados en este documento como la "cola") del dominio extracelular en la unión a ligando. Esta secuencia no se pudo resolver en la estructura cristalina,
- 25 sugiriendo que estos residuos están presentes en un bucle flexible que no se empaquetó de forma uniforme en el cristal. Thompson et al. EMBO J. 1 de abril

2003; 22(7): 1555-66. Esta secuencia también está poco conservada entre ActRIIb y ActRIIa. Por consiguiente, estos residuos se omitieron en la construcción de fusión ActRIIb-Fc básica o de fondo. Adicionalmente, la posición 64 en la forma de fondo está ocupada por una alanina, que generalmente se considera la forma de "tipo silvestre", aunque un alelo A64R es de origen natural. Por tanto, la fusión ActRIIb-Fc de fondo tiene la secuencia (parte Fc subrayada) (SEC ID N°: 20):

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVK
KGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGGTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Sorprendentemente, se observó que la cola del extremo C mejora la unión de activina y GDF-11, por tanto, una versión preferida de ActRIIb-Fc tiene una secuencia (parte Fc subrayada) (SEC ID N°: 21):

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVK
KGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPP
TAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
OPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Una diversidad de variantes de ActRIIb a que se pueden usar de acuerdo con los métodos descritos en este documento se describen en la Solicitud de Patente Internacional publicada como WO2006/012627 (véase, por ejemplo, págs. 59-60), incorporada en este documento como referencia en su totalidad.

Ejemplo 6: ActRIIb-hFc Estimula la Eritropoyesis en Primates No Humanos

Se administró ActRIIb-hFc (IgG1) una vez a la semana durante 1 mes a monos *cynomolgus* machos y hembras mediante inyección subcutánea. Cuarenta y ocho monos *cynomolgus* (24/sexo) se asignaron a uno de cuatro grupos de

tratamiento (6 animales/sexo/grupo) y se administraron inyecciones subcutáneas de vehículo o ActRIIb-hFc a 3, 10 ó 30 mg/kg una vez a la semana durante 4 semanas (total de 5 dosis). Los parámetros evaluados incluyeron patología clínica general (hematología, química clínica, coagulación y urianálisis). ActRIIb-hFc
5 provocó valores de reticulocitos absolutos medios elevados estadísticamente significativos para el día 15 en animales tratados. Para el día 36, ActRIIb-hFc provocó varios cambios hematológicos, que incluían valores de anchura de distribución de reticulocitos y glóbulos rojos medios elevados absolutos y concentración de hemoglobina corpuscular media menor. Todos los grupos
10 tratados y ambos sexos se vieron afectados.

Estos efectos son coherentes con un efecto positivo de ActRIIb-hFc sobre la liberación de reticulocitos inmaduros a partir de la médula ósea. Este efecto se revirtió después de que el fármaco se lavara de los animales tratados (para el día de estudio 56). Por consiguiente, se concluye que ActRIIb-hFc estimula la
15 eritropoyesis.

INCORPORACIÓN COMO REFERENCIA

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en este documento se incorporan por este medio como referencia en su totalidad como si se hubiera indicado que cada publicación o patente individual estaba específicamente e
20 individualmente incorporada como referencia.

Aunque se han tratado las realizaciones específicas de la materia objeto, la memoria descriptiva anterior es ilustrativa y no limitante. Muchas variaciones serán evidentes para los especialistas en la técnica tras la revisión de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones más adelante. El alcance completo de la
25 invención se debe determinar con referencia a las reivindicaciones, junto con el alcance completo de sus equivalentes y la memoria descriptiva, junto con tales variaciones.

REIVINDICACIONES

- 1 Un método para aumentar los niveles de glóbulos rojos en un
5 paciente humano, comprendiendo el método administrar a un paciente humano
que lo necesita una cantidad eficaz de un polipéptido ActRII seleccionado entre el
grupo que consiste en:
- a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos
el 90% idéntica a SEC ID N°: 2;
 - 10 b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos
el 90% idéntica a SEC ID N°: 3 y
 - c) un polipéptido que comprende al menos 50 aminoácidos consecutivos
seleccionados de SEC ID N°: 2.
 - d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos
15 el 90% idéntica a SEC ID N°: 16;
 - e) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos
el 90% idéntica a SEC ID N°: 17 y
 - f) un polipéptido que comprende al menos 50 aminoácidos consecutivos
seleccionados de SEC ID N°: 16.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que polipéptido tiene una o más de
las siguientes características:
- i) se une a un ligando de ActRII con una K_D de al menos 10^{-7} M y
 - 25 ii) inhibe la señalización de ActRII en una célula.
- 30 3. El método de la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido es una proteína
de fusión que incluye, además de un dominio de polipéptido ActRII, una o más
partes de polipéptido que mejoran una o más de estabilidad *in vivo*, semivida *in*
vivo, captación/administración, localización o distribución tisular, formación de
30 complejos proteicos y/o purificación.

4. El método de la reivindicación 1, en el que dicha proteína de fusión incluye una parte de polipéptido seleccionada entre el grupo que consiste en: un dominio Fc de inmunoglobulina y una albúmina sérica.
5. El método de la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido incluye uno o más residuos de aminoácidos modificados seleccionados entre: un aminoácido glicosilado, un amino PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a un resto lipídico y un aminoácido conjugado a un agente derivatizante orgánico.
6. El método de la reivindicación 1, en el que el aumento en los niveles de glóbulos rojos se mide como un aumento en los niveles de hemoglobina en la sangre.
7. Un método para tratar una anemia, comprendiendo el método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad eficaz de un antagonista de activina-ActRII.
8. El método de la reivindicación 7, en el que el antagonista de activina-ActRII es un polipéptido antagonista de activina o ActRII.
9. El método de la reivindicación 8, en el que el polipéptido antagonista de activina-ActRII se selecciona entre el grupo que consiste en:
- a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90% idéntica a SEC ID N°: 2;
 - b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90% idéntica a SEC ID N°: 3 y
 - c) un polipéptido que comprende al menos 50 aminoácidos consecutivos seleccionados de SEC ID N°: 2

- d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90% idéntica a SEC ID N°: 16;
- e) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90% idéntica a SEC ID N°: 17 y
- 5 f) un polipéptido que comprende al menos 50 aminoácidos consecutivos seleccionados de SEC ID N°: 16.
10. El método de la reivindicación 9, en el que el polipéptido antagonista de activina-ActRII tiene una o más de las siguientes características:
- 10 i) se une a un ligando de ActRII con una K_D de al menos 10^{-7} M y
- ii) inhibe la señalización de ActRII en una célula.
11. El método de la reivindicación 9, en el que dicho polipéptido antagonista de activina-ActRII es una proteína de fusión que incluye, además de dicho polipéptido
- 15 antagonista de activina-ActRII, una o más partes de polipéptido que mejoran uno o más de estabilidad *in vivo*, semivida *in vivo*, captación/administración, localización o distribución tisular, formación de complejos proteicos y/o purificación.
12. El método de la reivindicación 11, en el que dicha proteína de fusión incluye
- 20 una parte de polipéptido seleccionada entre el grupo que consiste en: un dominio Fc de inmunoglobulina y una albúmina sérica.
13. El método de la reivindicación 8, en el que dicho polipéptido antagonista de activina o ActRII incluye uno o más residuos de aminoácidos modificados
- 25 seleccionados entre: un aminoácido glicosilado, un amino PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a un resto lipídico y un aminoácido conjugado a un agente derivatizante orgánico.

14. Un método para identificar un agente que aumente los niveles de glóbulos rojos, comprendiendo el método:
- a) identificar un agente de ensayo que se una a un dominio de unión a ligando de un polipéptido ActRII competitivamente con un ligando de ActRII y
 - b) evaluar el efecto del agente sobre los niveles de glóbulos rojos en un animal.
15. Uso de un polipéptido antagonista de activina o ActRII para preparar un medicamento para aumentar los niveles de glóbulos rojos en un paciente humano.
16. Un método para aumentar los niveles de glóbulos rojos en un paciente humano, comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad eficaz de una proteína de fusión ActRII-Fc, en el que la proteína de fusión ActRII-Fc comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:
- a) una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3,
 - b) una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQIDNO: 3,
 - c) la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3,
 - d) la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2,
 - e) la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 7,
 - f) una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 17,
 - g) una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 17,
 - h) la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 17,
 - i) la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 16,
 - j) la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 20 y

k) la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 21.

17. El método de la reivindicación 16, en el que método provoca menos del 15% de aumento en la masa de músculo esquelético del paciente.

5

18. El método de la reivindicación 16, en el que la proteína de fusión ActRII-Fc se administra para alcanzar una concentración en suero en el paciente de al menos 100 ng/ml durante un periodo de aproximadamente 20 a 30 días.

10 19. El método de la reivindicación 16, en el que la proteína de fusión ActRII-Fc se administra para alcanzar una concentración en suero en el paciente en el intervalo de 100 ng/ml a 1000 ng/ml.

15 20. El método de la reivindicación 16, en el que la proteína de fusión ActRII-Fc tiene una semivida en suero de entre 15 y 30 días.

21. El método de la reivindicación 20, en el que la proteína de fusión ActRII-Fc se administra al paciente con una frecuencia no mayor de una vez por semana.

20 22. El método de la reivindicación 20, en el que la proteína de fusión ActRII-Fc se administra al paciente con una frecuencia no mayor de una vez por mes.

RESUMEN

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona composiciones y métodos para aumentar los niveles sanguíneos de glóbulos rojos y/o hemoglobina en vertebrados, incluyendo roedores y primates, y particularmente en seres humanos.

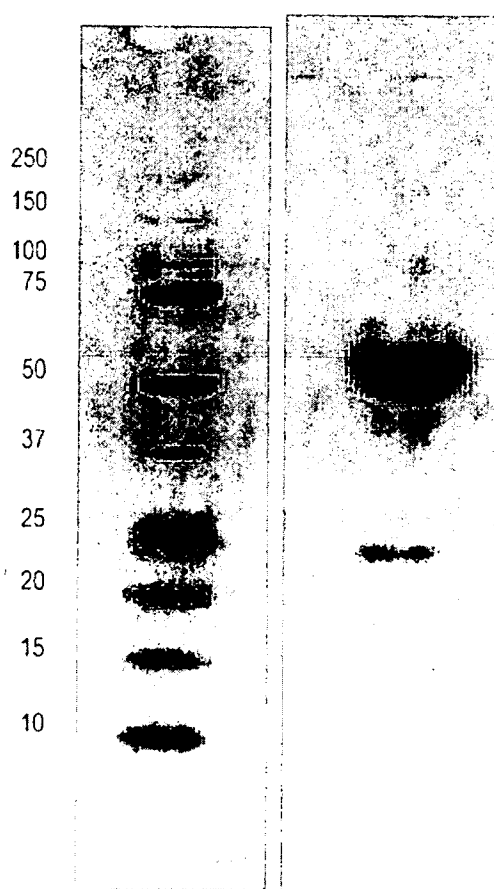
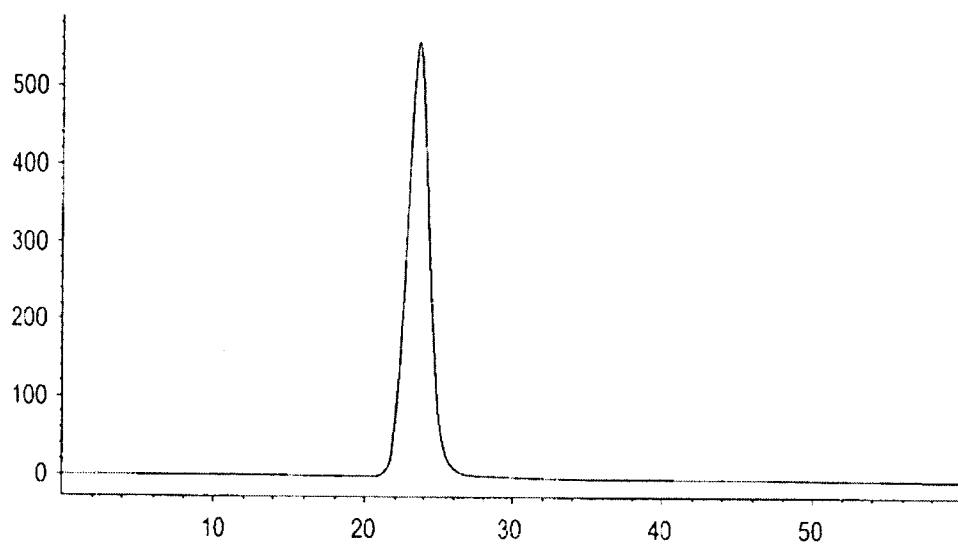


Figura 1

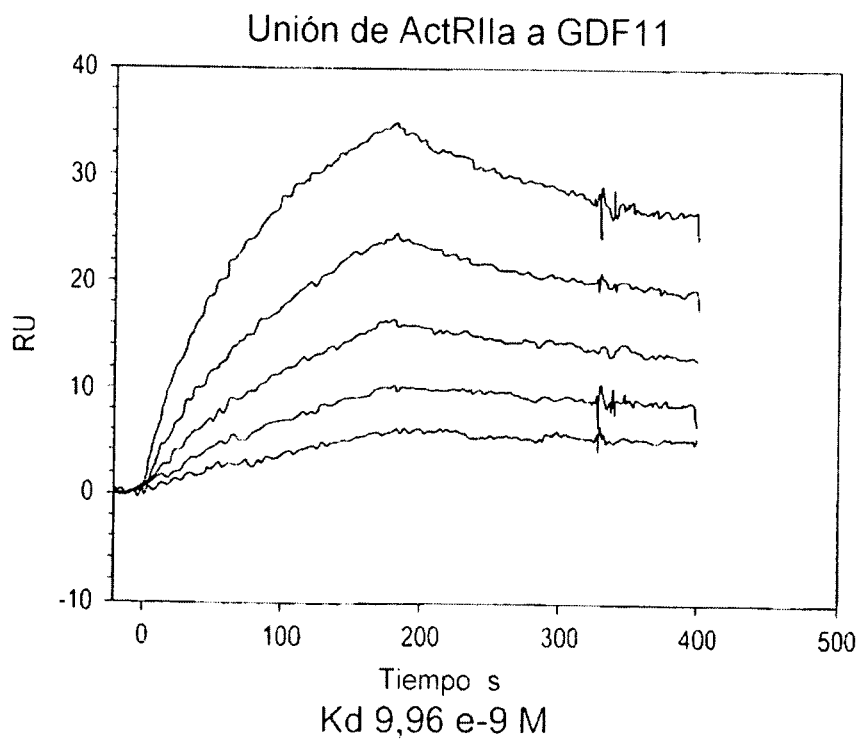
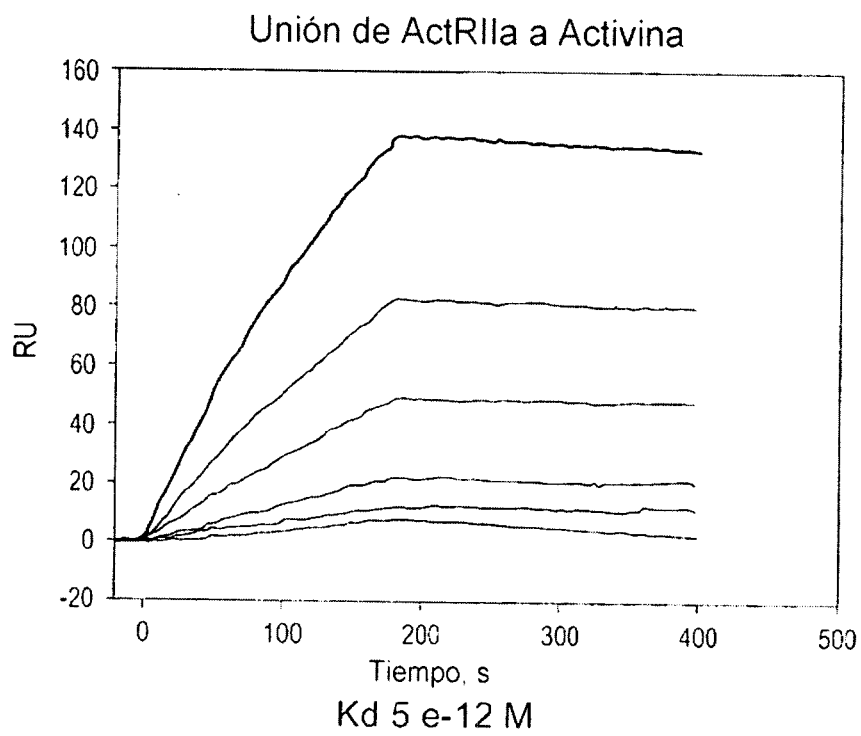


Figura 2

Efecto de ActRIIA-Fc sobre Recuento de RBC en PNH Hembras

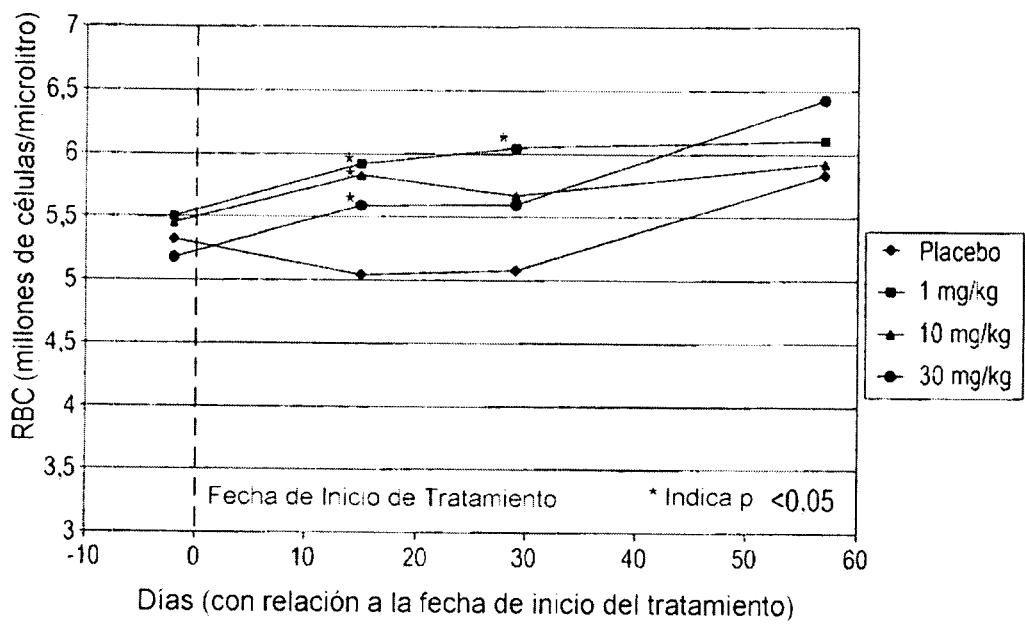


Figura 3A

Efecto de ActRIIA-Fc sobre Hemoglobina en PNH Hembras

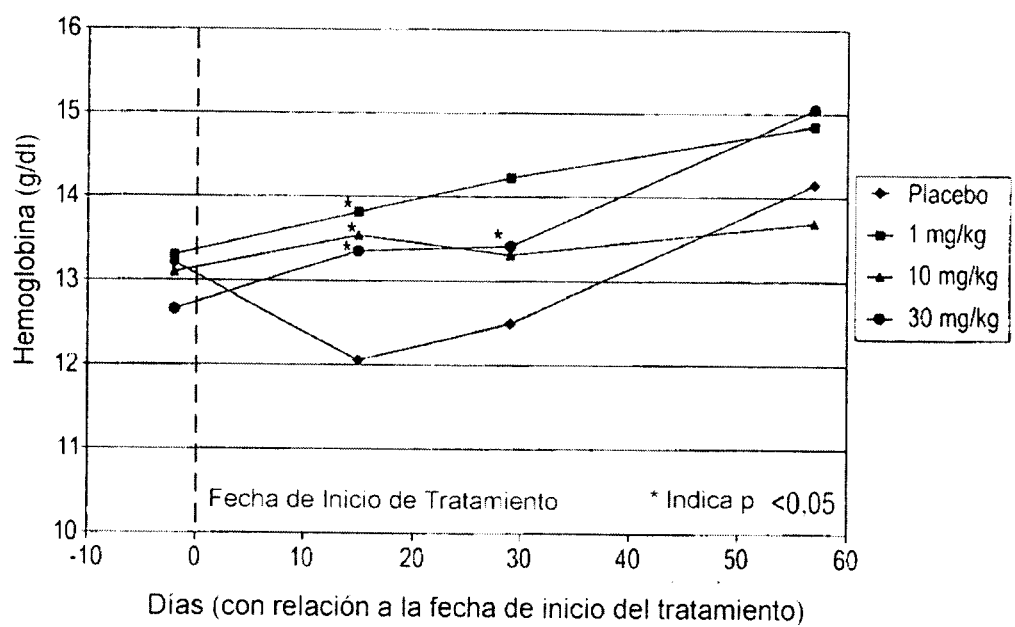


Figura 3B

136

Efecto de ActRIIA-Fc sobre Recuento de RBC en PNH Machos

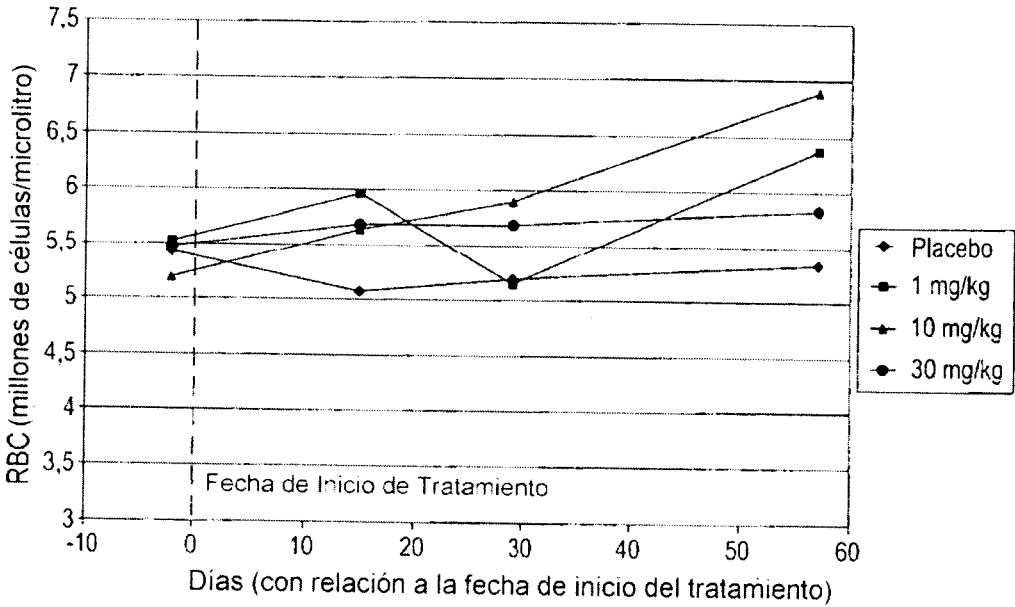


Figura 4A

Efecto de ActRIIA-Fc sobre Hemoglobina en PNH Machos

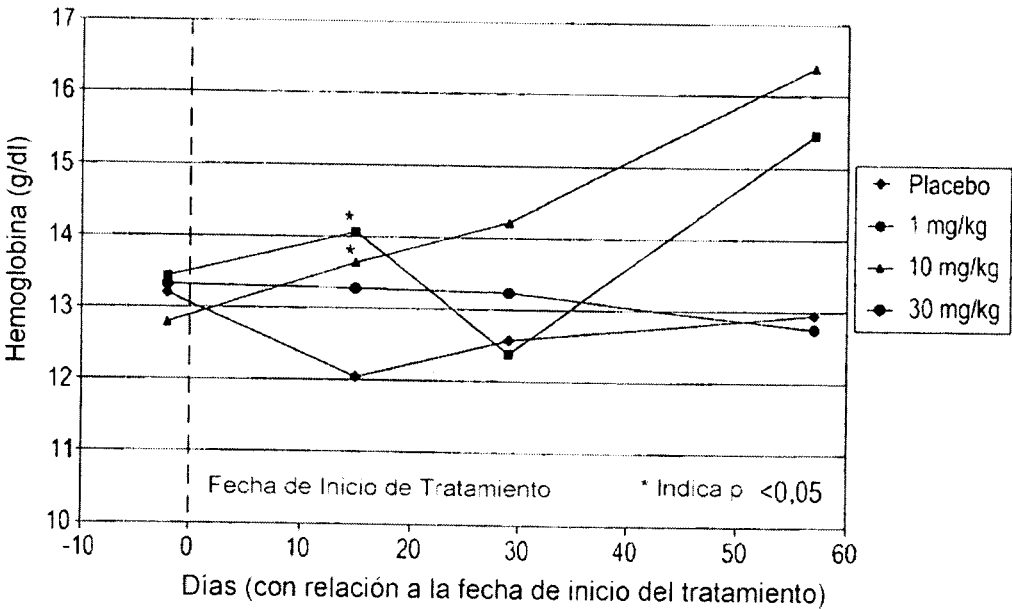


Figura 4B

Efecto de ActRIIA-Fc sobre Recuentos de Reticulocitos en PNH Hembras

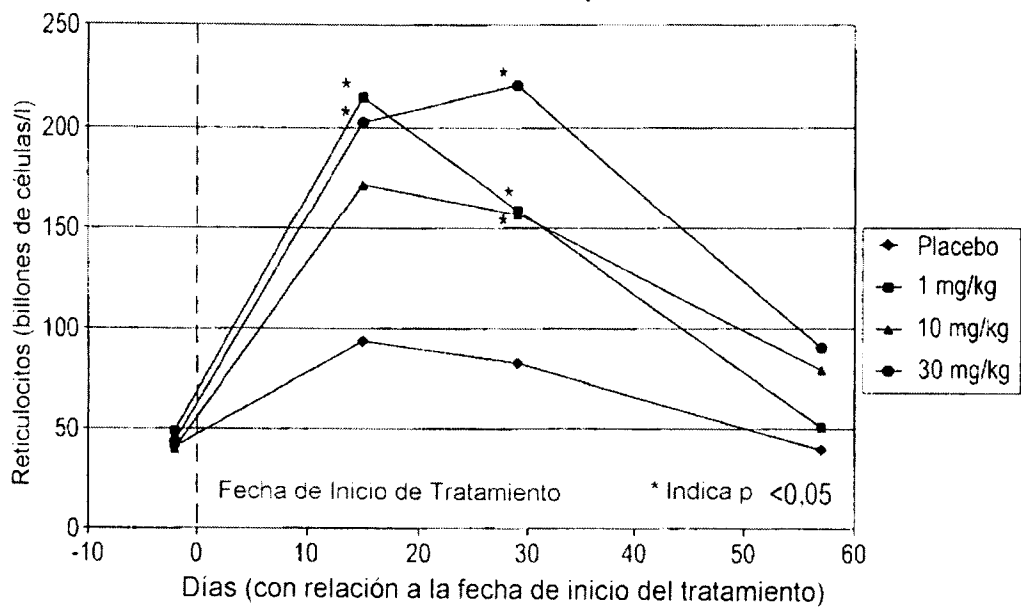


Figura 5A

Efecto de ActRIIA-Fc sobre Porcentaje de Reticulocitos en PNH Hembras

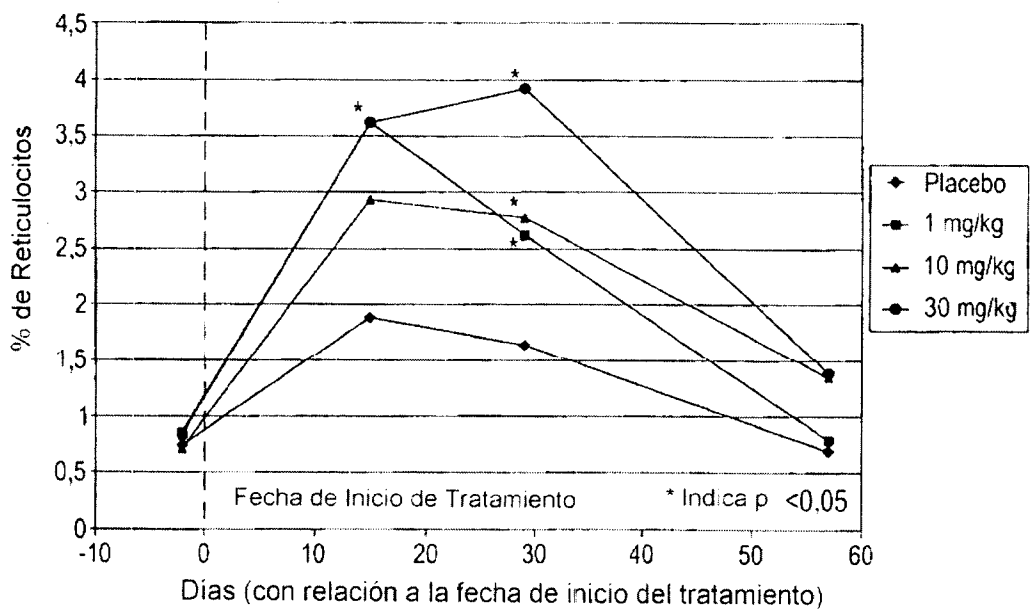


Figura 5B

Efecto de ActRIIA-Fc sobre Recuentos de Reticulocitos en PNH Machos

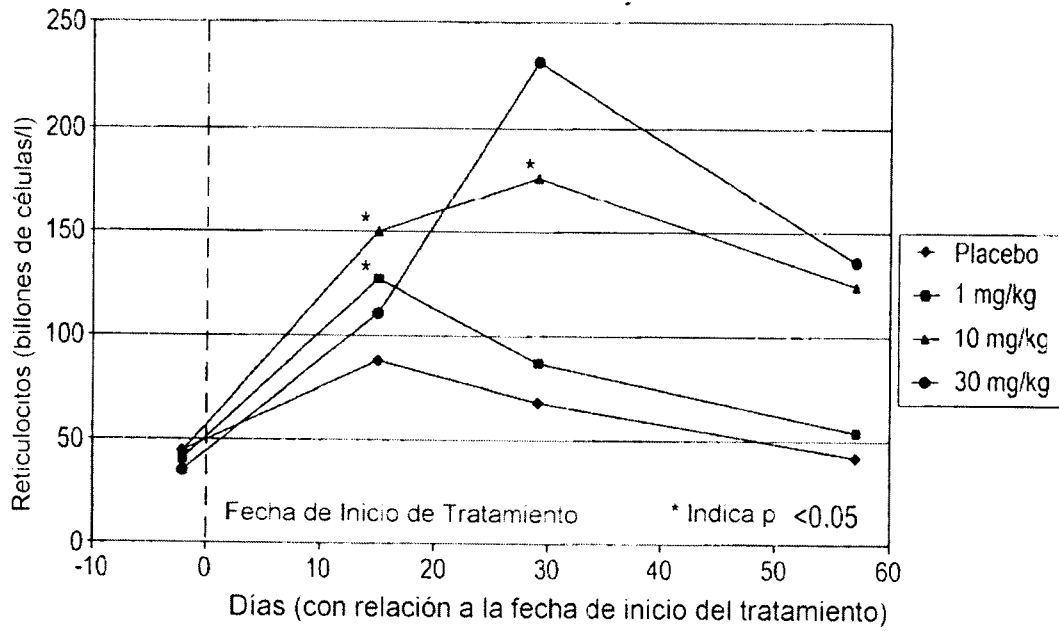


Figura 6A

Efecto de ActRIIA-Fc sobre Porcentaje de Reticulocitos en PNH Machos

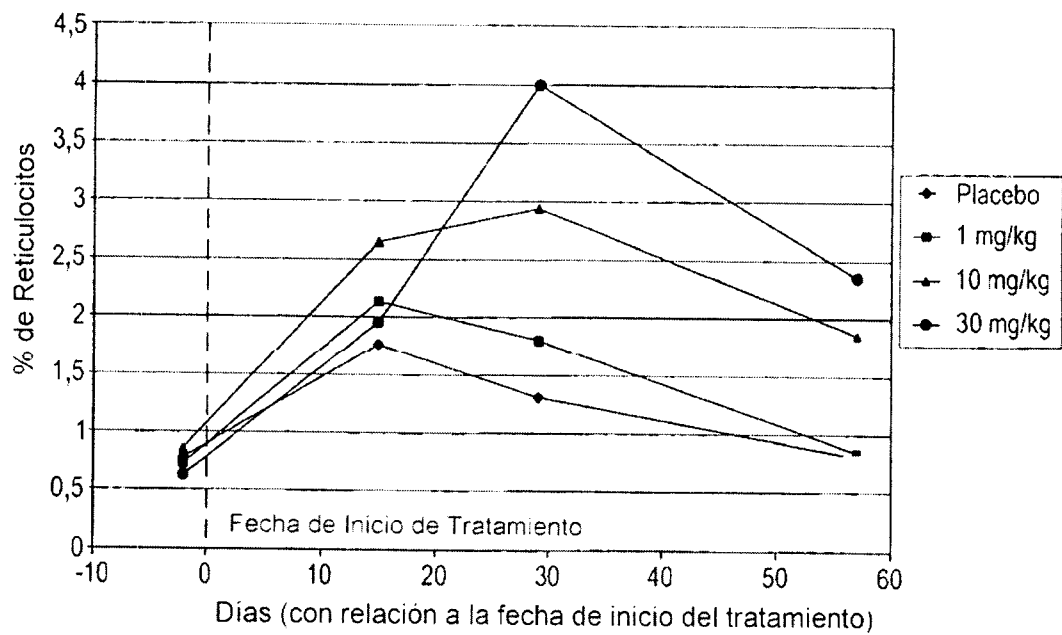


Figura 6B

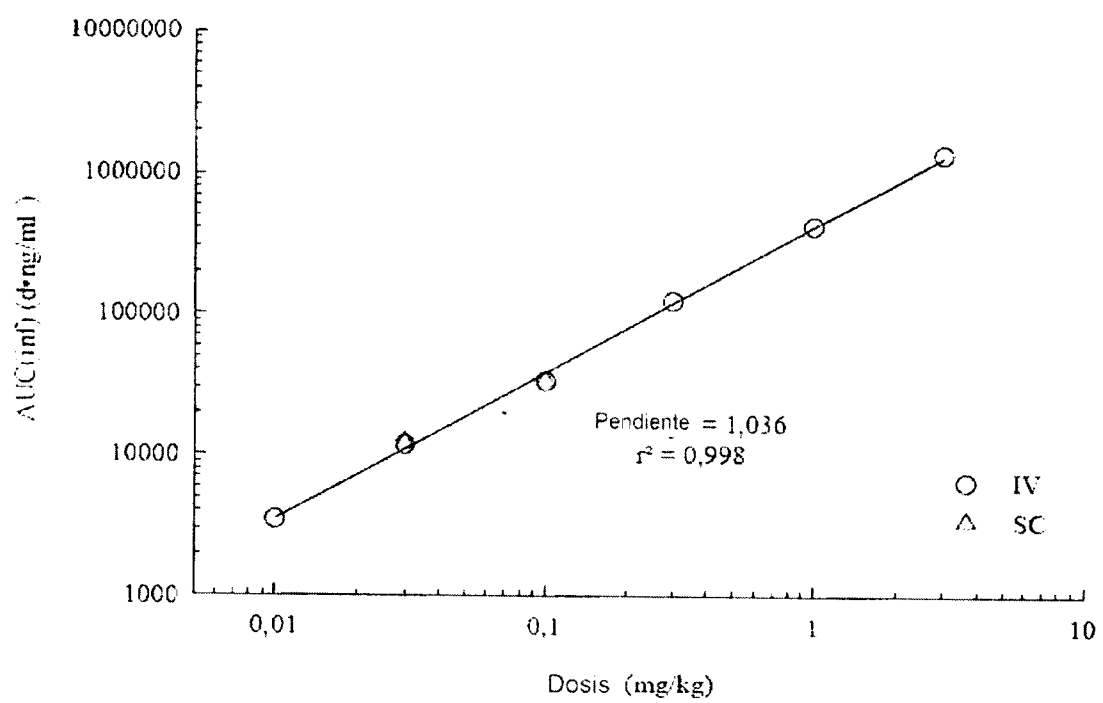


Figura 7

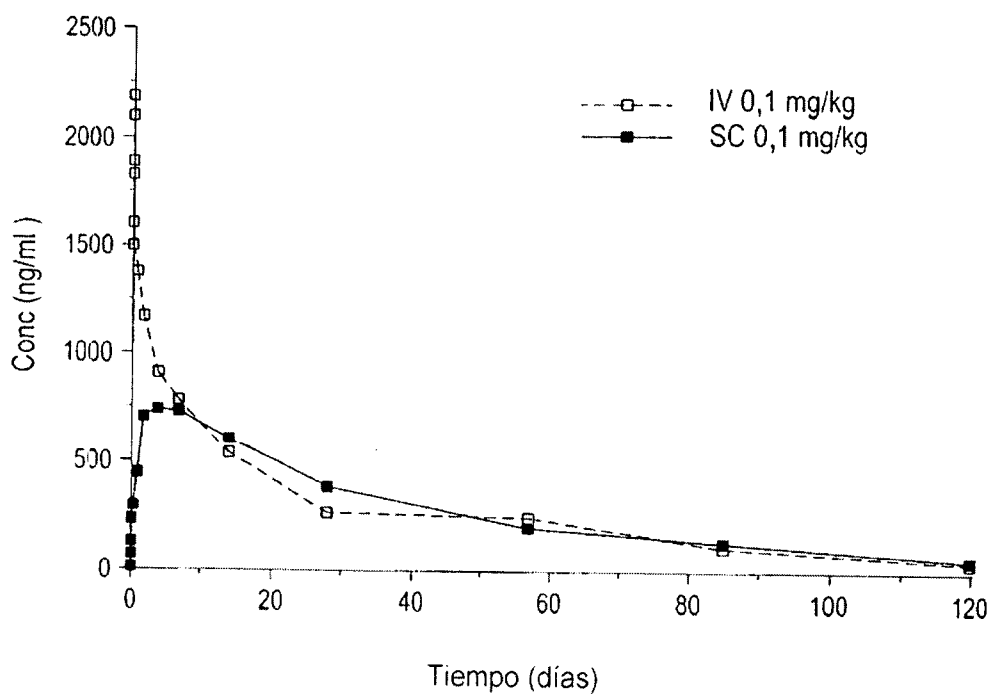


Figura 8

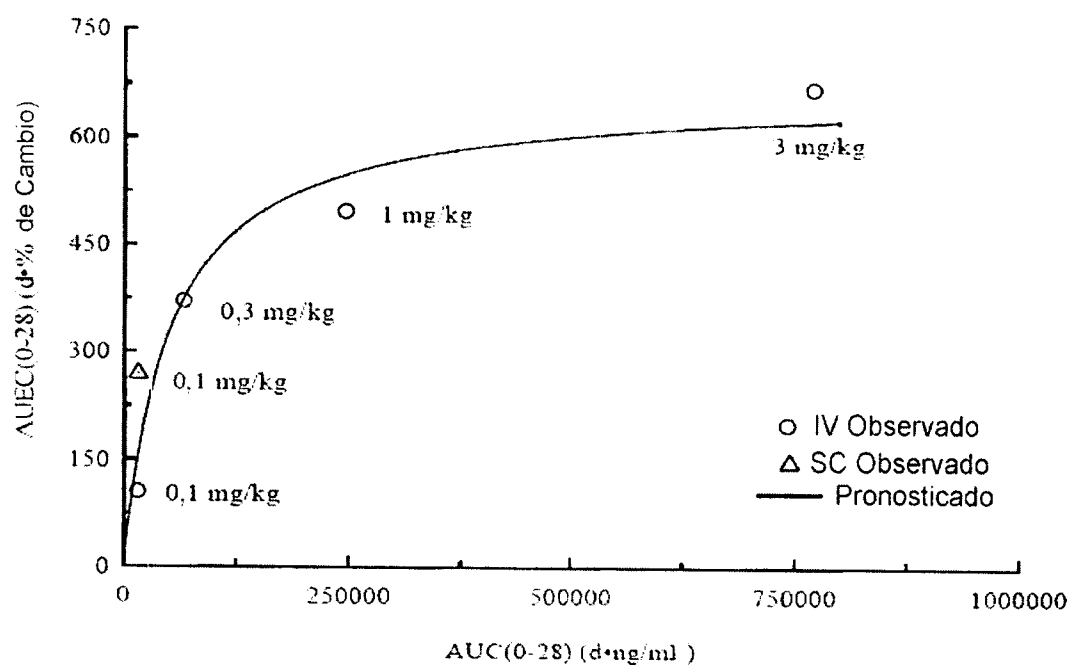
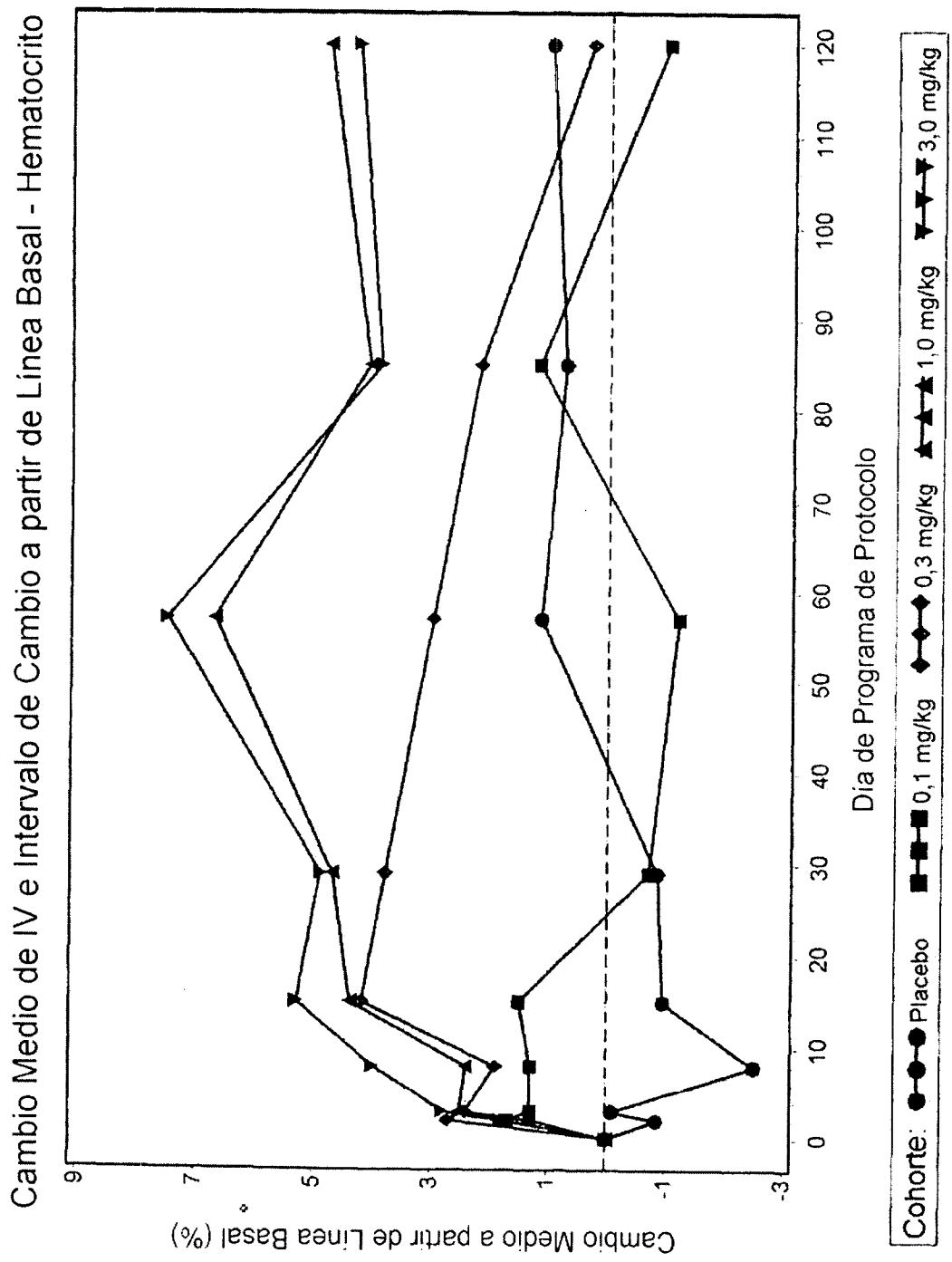
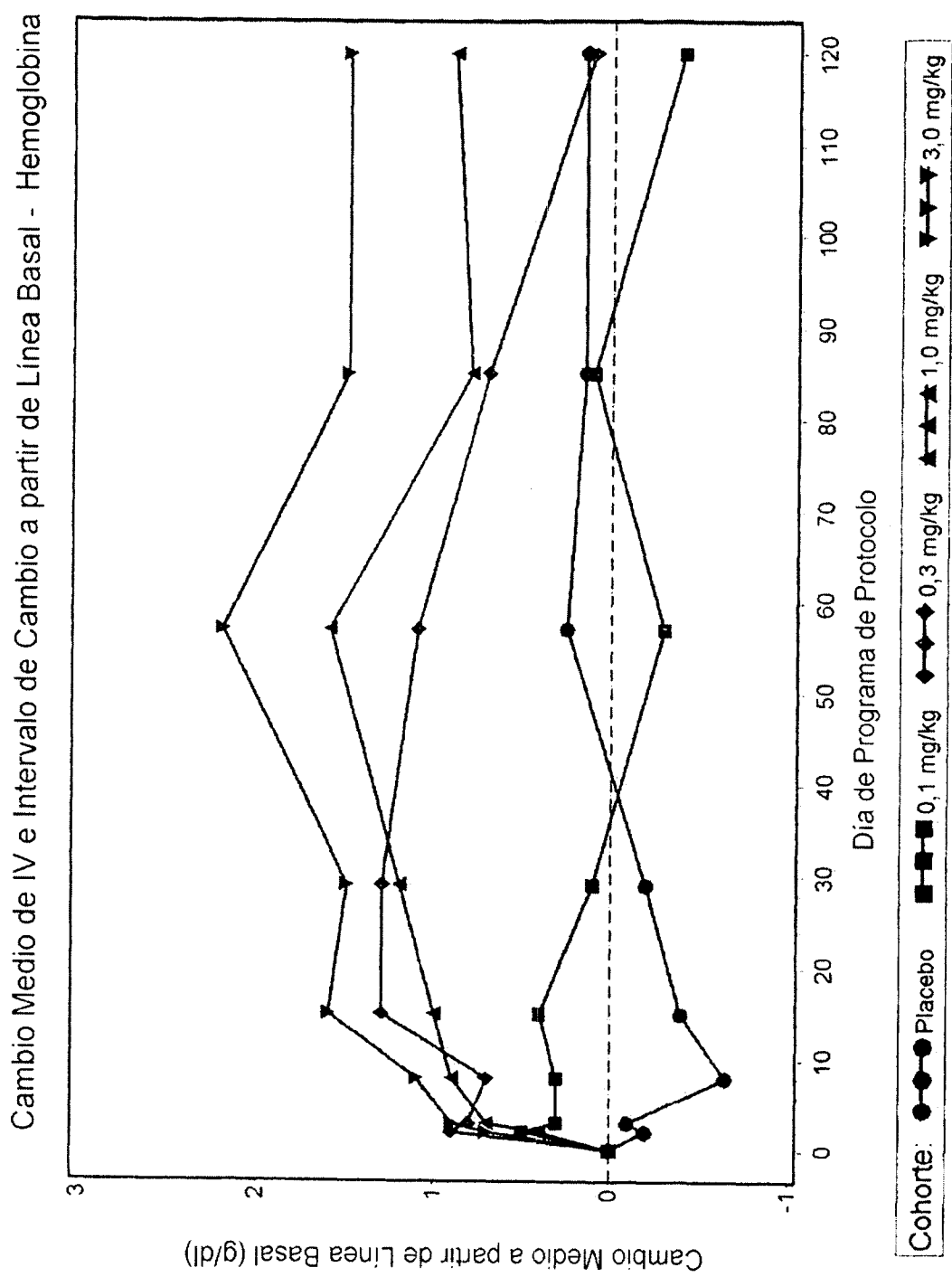


Figura 9





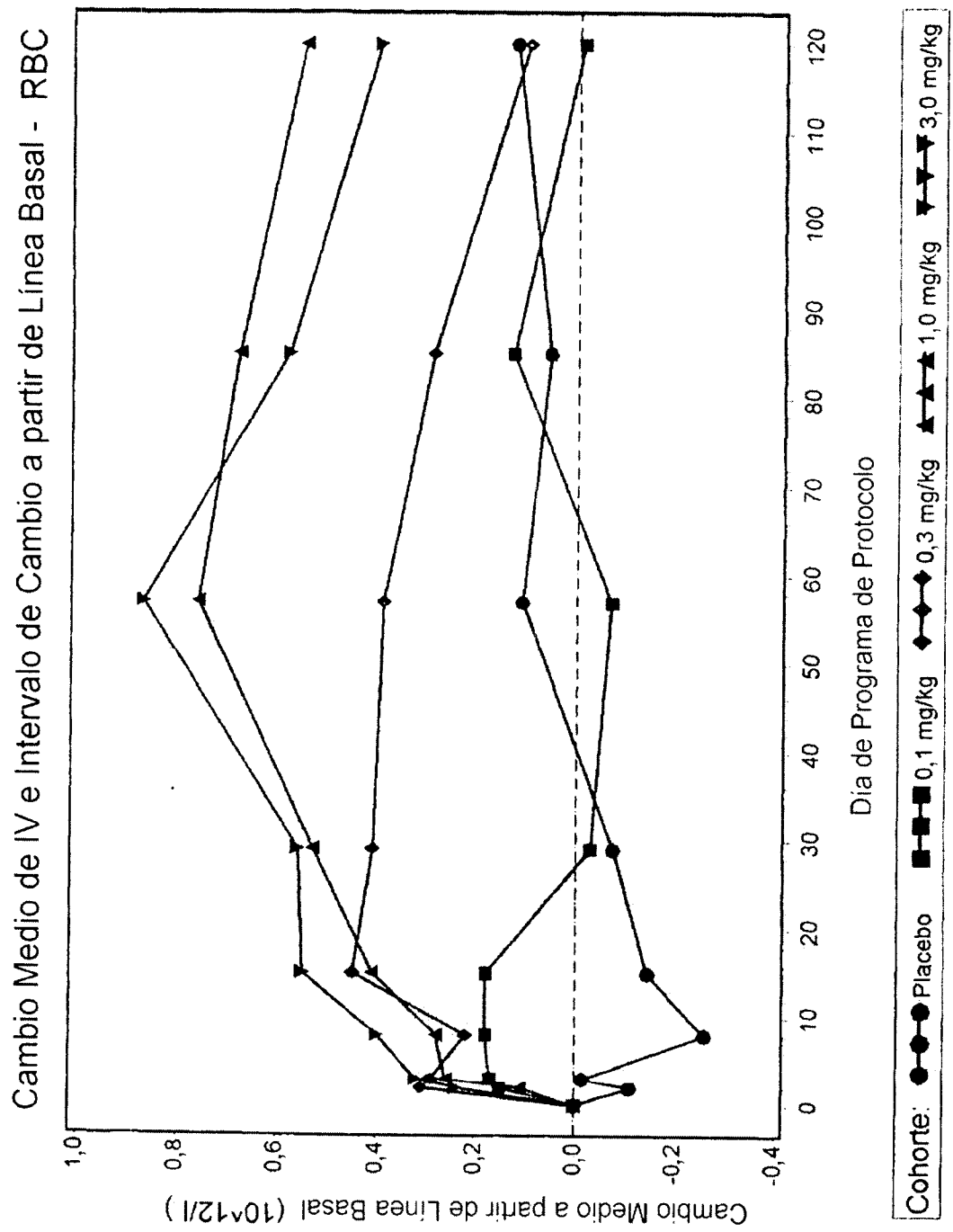


Figura 12

Cambio Medio de IV e Intervalo de Cambio a partir de Línea Basal - Recuento de Reticulocitos (%)

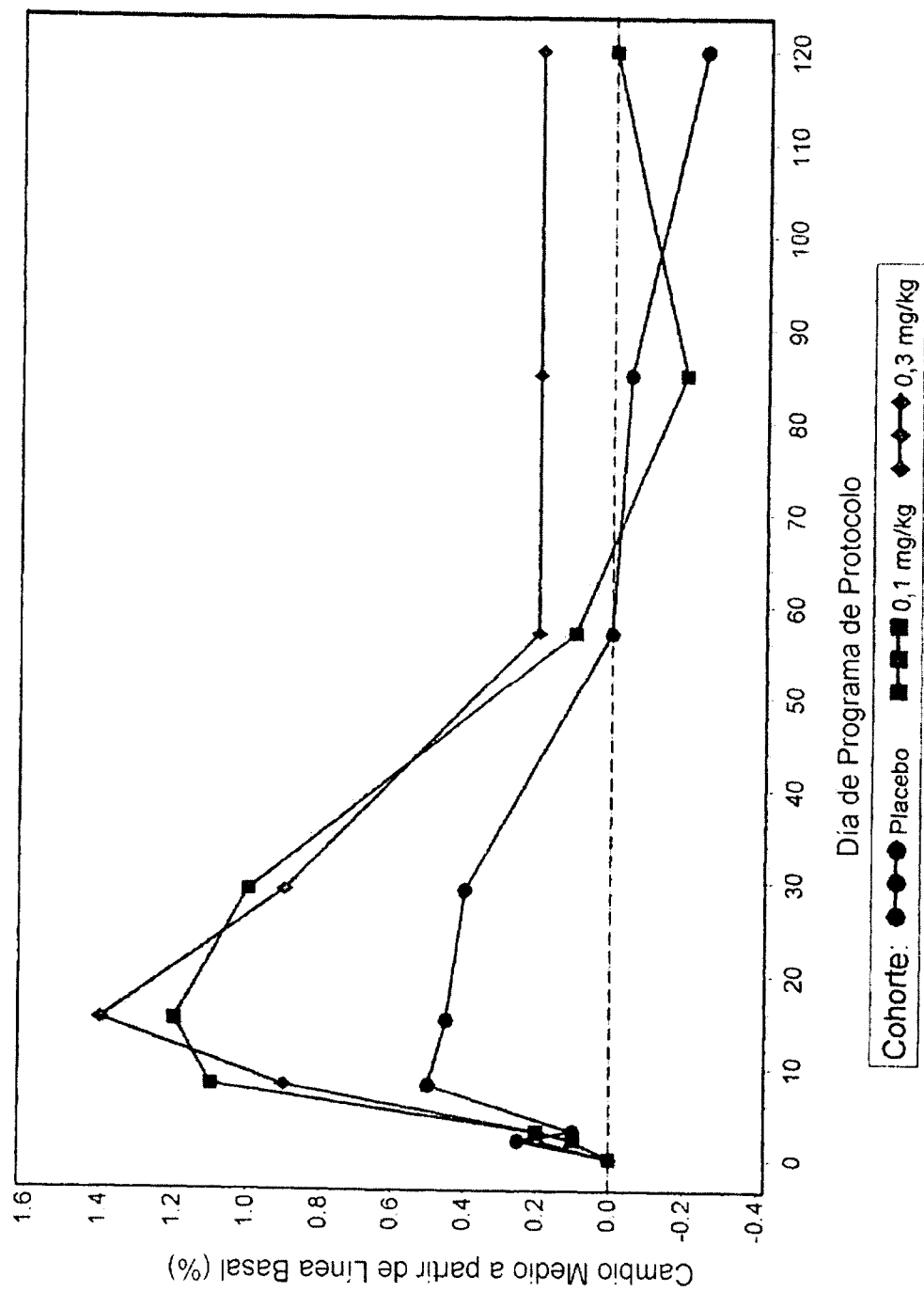
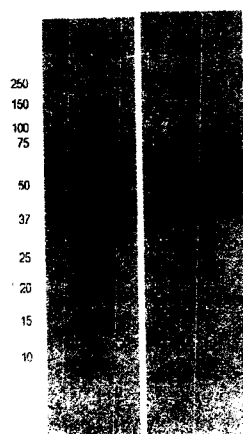
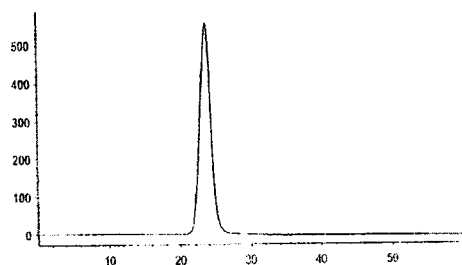
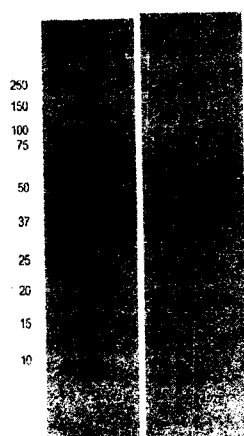
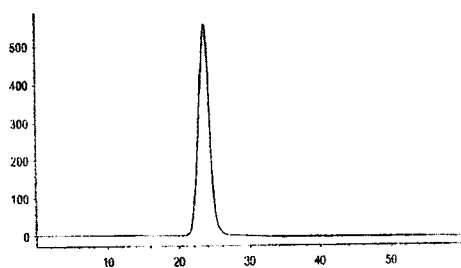


Figura 13





Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 09 DE JULIO DE 2.009

(51) Clasificación Internacional :

(71) Solicitante(s) **ACCELERON PHARMA INC.**

(72) Inventor(es) **Matthew L. SHERMAN**

(74) Agente: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO**

(30) Prioridad
ESTADOUNIDENSE

(31) No. Prioridad
60/875,682

(32) Fecha
18/12/2006

(33) País
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

(85) Fecha inicio fase nacional:

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: **26/06/2008**

Fecha de presentación de la solicitud: **18/12/2007**

N° publicación: **WO 2008/076437**

No. de solicitud: **PCT/US2007/025868**

(54) Titulo: **ANTAGONISTAS DE ACTIVINA-ACTRII Y USOS PARA AUMENTAR LOS NIVELES DE GLÓBULOS ROJOS**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

PATENTE DE INVENCION _____ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD _____ DISEÑO INDUSTRIAL _____

(21) N° de solicitud: _____ (22) Fecha de solicitud: **09 DE JULIO DE 2.009**

(31) Clasificación Internacional: _____

(71) Solicitante(s) **ACCELERON PHARMA INC.**

(72) Inventor(es) **Matthew L. SHERMAN**

(74) Agente: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO**

(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País
ESTADOUNIDENSE		60/875,682		18/12/2006		ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

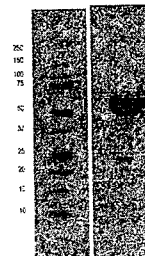
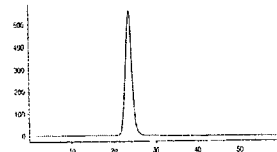
(85) Fecha inicio fase nacional: _____

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: **18/12/2007**
No. de solicitud: **PCT/US2007/025868**

(87) Publicación internacional: _____

Fecha: **26/06/2008**

No. de publicación: **WO 2008/076437**



(54) Título: **ANTAGONISTAS DE ACTIVINA-ACTRII Y USOS PARA AUMENTAR LOS NIVELES DE GLÓBULOS ROJOS**

Resumen:

Un método para aumentar los niveles de glóbulos rojos en un paciente humano, comprendiendo el método administrar a un paciente humano que lo necesita una cantidad eficaz de un polipéptido ActRII seleccionado entre el grupo que consiste en:

- a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90% idéntica a SEC ID N°: 2;
- b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90% idéntica a SEC ID N°: 3 y
- c) un polipéptido que comprende al menos 50 aminoácidos consecutivos seleccionados de SEC ID N°: 2.
- d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90% idéntica a SEC ID N°: 16;
- e) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90% idéntica a SEC ID N°: 17 y
- f) un polipéptido que comprende al menos 50 aminoácidos consecutivos seleccionados de SEC ID N°: 16.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISIÓN A TRAMITE

PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◇ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◇ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◇ Descripción de la invención ☒
- ◇ Dibujos de ser estos pertinentes ☐
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◇ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◇ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◇ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◇ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◇ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◇ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Firma Responsable

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Fecha



No. 09-071017- -00000-0000

Fecha: 2009-07-09 14:08:28 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 149

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5,7y10'

Conmutador: 3 82 0840

Fax: 3505220

E-mail: info@sic.gov.co

www.sic.gov.co

Bogotá D.C. - Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RUBIO CAMACHO HUMBERTO

REFERENCIA	Radicación No.	9 71017
	Solicitud internacional	PCT/US2007/025868
	Fecha inicio fase nacional	18/07/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	8693

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

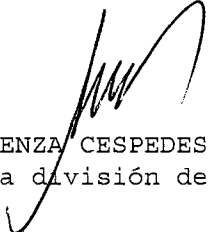
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 9 71017



ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 8 JUL 2009
jfernand