

Traduzione del testo del brevetto europeo

No. 3 638 243

a nome: Celgene Corporation

a: Princeton, NJ 08543 - USA

dal titolo: Metodi per trattare mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa e anemia.

DESCRIZIONE

Campo tecnico

1. CAMPO

[0001] Il brevetto riguarda generalmente metodi per trattare anemia in un soggetto avente mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa, comprendenti somministrare al soggetto un inibitore di segnalazione di ActRIIB.

2. STATO DELL'ARTE

[0002] L'anemia è una diminuzione del numero di globuli rossi o un quantitativo inferiore al normale di emoglobina nel sangue. L'anemia può anche essere causata da una diminuita capacità dell'emoglobina di legare l'ossigeno. L'anemia è il disturbo più comune del sangue. L'anemia può essere causata da eritropoiesi inefficace. L'eritropoiesi inefficace è presente se si verifica una eritropoiesi attiva ma i globuli rossi maturi non riescono a svilupparsi alla

velocità corretta. Le cellule progenitrici subiscono apoptosi prima che venga raggiunto lo stadio di globuli rossi maturi.

[0003] Mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa (MPN) è un termine generico usato per descrivere una neoplasia mieloide clonale che può svilupparsi direttamente (mielofibrosi primaria (nota anche come metaplasia mieloide agnogenica, mielofibrosi idiopatica cronica, mielosclerosi con metaplasia mieloide e mielofibrosi idiopatica)) o evolversi da altre neoplasie mieloidi (policitemia vera e trombocitemia essenziale) ed è caratterizzata da disfunzione e fibrosi del midollo osseo, emopoiesi extramidollare e un aumentato stato infiammatorio. La mielofibrosi associata a MPN risulta in un'eccessiva formazione di tessuto fibroso nel midollo osseo, che può portare a grave anemia, affaticamento, debolezza e ingrossamento della milza e del fegato. Gli attuali trattamenti per la mielofibrosi associata a MPN includono idrossiurea, splenectomia e trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche. Tuttavia, il trattamento con idrossiurea può peggiorare l'anemia e c'è preoccupazione circa il suo potenziale mutageno con un uso a lungo termine; la splenectomia ha una breve durata media di risposta, può ridurre la sopravvivenza post-splenectomia e ha un'alta morbilità postoperatoria; il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche può portare alla trasformazione leucemica (Sochacki et al., 2016, Therapeutic approaches in myelofibrosis and myelodysplastic/myeloproliferative overlap syndromes, *Onco Targets Ther*, 2016(9):2273-286). Perciò, permane una necessità di agenti terapeutici per il trattamento di mielofibrosi associata a MPN.

[0004] Due recettori di tipo II correlati, ActRIIA e ActRIIB, sono stati identificati come recettori di tipo II per le attivine (Mathews e Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano et al., 1992, Cell 68: 97-108). Oltre alle attivine, ActRIIA e ActRIIB possono interagire biochimicamente con svariate altre proteine della famiglia TGF-beta, tra cui BMP7, Nodal, GDF8, e GDF11 (Yamashita et al., 1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee e McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311; Yeo e Whitman, 2001, Mol. Cell 7: 949-957; Oh et al., 2002, Genes Dev. 16:2749-54). ALK4 è il principale recettore di tipo I per le attivine, particolarmente per l'attivina A, e anche ALK-7 può fungere da recettore per le attivine, particolarmente per l'attivina B. Gli inibitori di segnalazione di ActRIIB sono stati descritti per trattare eritropoiesi inefficace e sindromi mielodisplastiche (si vedano, ad esempio, le pubblicazioni di brevetti internazionali n. WO 2013/059347, WO 2011/020045 e WO 2016/090077).

[0005] Keohane C et al.: "Ruxolitinib for myelofibrosis", Clinical Investigation, Future Science, Regno Unito, vol. 2, n. 10, 30 settembre 2012 (2012-09-30), pagine 1023-1031, è dedicato all'uso del ruxolitinib nel trattamento della mielofibrosi. Anemia e trombocitopenia vengono identificati come effetti collaterali del trattamento.

[0006] A Agarwal et al.: "Bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis: pathogenic mechanisms and the role of TGF-beta", Stem cell investigation, 1° gennaio 2016 (2016-01-01), pagine 5-5, indica che l'inibizione della via del

TGF-beta unitamente ad altre terapie potrebbe rivelarsi utile nell'inversione della fibrosi del midollo osseo nella mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa.

[0007] R. N. V. S. Suragani et al.: "Modified activin receptor IIB ligand trap mitigates ineffective erythropoiesis and disease complications in murine beta-thalassemia", BLOOD, vol. 123, n. 25, 2 maggio 2014 (2014-05-02), pagine 3864-3872, divulga l'uso della trappola per ligando del recettore dell'attivina di tipo IIB (ActRIIB) (RAP-536) modificata in un modello murino di beta-talassemia. Il trattamento ha mitigato l'anemia favorendo la differenziazione dei precursori eritroidi in stadio avanzato e riducendo l'emolisi.

3. SOMMARIO

[0008] Nella presente viene fornito un inibitore di segnalazione di ActRIIB per uso in un metodo per trattare anemia in un soggetto avente mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa, in cui il soggetto è stato precedentemente trattato con ruxolitinib, in cui il metodo comprende somministrare al soggetto una quantità farmaceuticamente efficace dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB, in cui l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è una proteina di fusione comprendente: (a) un frammento del dominio extracellulare di ActRIIB, in cui il frammento comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 9; (b) un linker; e (c) un Fc di una IgG. Ulteriori aspetti e forme di realizzazione dell'invenzione sono forniti nelle rivendicazioni allegate.

[0009] Un riferimento a un inibitore di segnalazione di ActRIIB in relazione alla presente invenzione deve essere inteso come riferimento all'inibitore di segnalazione di ActRIIB come definito sopra.

[0010] Non vengono rivendicati metodi di trattamento di un corpo umano o animale. Dovesse nel contesto della presente invenzione essere menzionato un metodo di trattamento, è da intendersi come un inibitore di segnalazione di ActRIIB per uso in tale metodo.

[0011] In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi primaria. In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi da policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi da policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2* o una mutazione dell'esone 12 di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi post-policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi post-policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è trombocitopenia essenziale o mielofibrosi post-trombocitemia essenziale. In forme di realizzazione più

specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-essenziale trombocitemia sono associate o causate da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-trombocitemia essenziale include fibrosi reticolinica o la fibrosi tricromica. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi se il soggetto ha ricevuto nessuna (0) unità di globuli rossi durante un periodo di tempo di 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi se ha ricevuto una frequenza media di trasfusione di globuli rossi da 2 a 4 unità di globuli rossi ogni 28 giorni durante un periodo di tempo di almeno 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. In forme di realizzazione specifiche, la quantità farmacologicamente efficace è da 0,3 mg/kg a 2,0 mg/kg, ad esempio 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg o 2,0 mg/kg. In forme di realizzazione specifiche, la quantità farmacologicamente efficace è 1 mg/kg. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene

somministrato al soggetto una volta ogni 21 giorni, una volta ogni 28 giorni, o una volta ogni 48 giorni. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto una volta ogni 21 giorni. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto per via endovenosa o per via sottocutanea. In forme di realizzazione specifiche, la quantità farmacologicamente efficace è 1 mg/kg e l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto per via sottocutanea una volta ogni 21 giorni. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto per via sottocutanea. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è una proteina di fusione umanizzata consistente nel dominio extracellulare di ActRIIB comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:9 e il dominio Fc di IgG1 umana. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è una proteina di fusione comprendente il dominio extracellulare di ActRIIB di cui sopra e il dominio Fc di IgG1 umana. Un inibitore di segnalazione di ActRIIB noto è un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo consistente in: (a) identica al 90% a SEQ ID NO:4; (b) identica al 95% a SEQ ID NO:4; (c) identica al 98% a SEQ ID NO:4; (d) SEQ ID NO:4; (e) identica al 90% a SEQ ID NO:7; (f) identica al 95% a SEQ ID NO:7; (g) identica al 98% a SEQ ID NO:7; (h) SEQ ID NO:7; (i) identica al 90% a SEQ ID NO:8; (j) identica al 95% a SEQ ID NO:8; (k) identica al 98% a SEQ ID NO:8; (l) SEQ ID NO:8; (m) identica al 90% a SEQ ID NO:11; (n) identica al 95% a SEQ ID NO:11; (o) identica al 98% a SEQ ID NO:11; e (p) SEQ ID NO:11. Un inibitore di

segnalazione di ActRIIB noto è un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo consistente in: (a) identica al 90% a SEQ ID NO:11; (b) identica al 95% a SEQ ID NO:11; (c) identica al 98% a SEQ ID NO:11; e (d) SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica consistente nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide consistente nella sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è un essere umano.

[0012] Il trattamento in conformità con l'invenzione riduce o allevia uno o più sintomi di detta mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa in detto soggetto. In forme di realizzazione specifiche, il sintomo è uno o più tra affaticamento, sudorazione notturna, prurito, disturbi addominali, dolore sotto le costole sul lato sinistro, sazietà precoce, o dolore osseo. In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi primaria. In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi da policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi da policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2* o una mutazione dell'esone 12 di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la

mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi post-policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi post-policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è trombocitopenia essenziale o mielofibrosi post-trombocitemia essenziale. In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-essenziale trombocitemia sono associate o causate da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-trombocitemia essenziale include fibrosi reticolinica o la fibrosi tricromica. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi se il soggetto ha ricevuto nessuna (0) unità di globuli rossi durante un periodo di tempo di 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi se ha ricevuto una frequenza media di trasfusione di globuli rossi da 2 a 4 unità di globuli rossi ogni 28 giorni durante un periodo di tempo di almeno 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75,

76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. In forme di realizzazione specifiche, una quantità farmaceuticamente efficace dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è da 0,3 mg/kg a 2,0 mg/kg, ad esempio 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg o 2,0 mg/kg. In forme di realizzazione specifiche, la quantità farmaceuticamente efficace è 1 mg/kg. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto una volta ogni 21 giorni, una volta ogni 28 giorni, o una volta ogni 48 giorni. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto una volta ogni 21 giorni. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto per via endovenosa o per via sottocutanea. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto per via sottocutanea. In forme di realizzazione specifiche, la quantità farmaceuticamente efficace è 1 mg/kg e l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto per via sottocutanea una volta ogni 21 giorni. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è una proteina di fusione umanizzata consistente nel dominio extracellulare di ActRIIB comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:9 e il dominio Fc di IgG1 umana. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è una proteina di fusione comprendente il dominio extracellulare di ActRIIB di cui sopra e il dominio Fc di IgG1 umana. Un inibitore di segnalazione di ActRIIB noto è un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica

selezionata dal gruppo consistente in: (a) identica al 90% a SEQ ID NO:4; (b) identica al 95% a SEQ ID NO:4; (c) identica al 98% a SEQ ID NO:4; (d) SEQ ID NO:4; (e) identica al 90% a SEQ ID NO:7; (f) identica al 95% a SEQ ID NO:7; (g) identica al 98% a SEQ ID NO:7; (h) SEQ ID NO:7; (i) identica al 90% a SEQ ID NO:8; (j) identica al 95% a SEQ ID NO:8; (k) identica al 98% a SEQ ID NO:8; (l) SEQ ID NO:8; (m) identica al 90% a SEQ ID NO:11; (n) identica al 95% a SEQ ID NO:11; (o) identica al 98% a SEQ ID NO:11; e (p) SEQ ID NO:11. Un inibitore di segnalazione di ActRIIB noto è un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo consistente in: (a) identica al 90% a SEQ ID NO:11; (b) identica al 95% a SEQ ID NO:11; (c) identica al 98% a SEQ ID NO:11; e (d) SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica consistente nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide consistente nella sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è un essere umano.

[0013] In una forma di realizzazione, il metodo comprende somministrare al soggetto una dose di 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg o 2,0 mg/kg di un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11, in cui il polipeptide viene

somministrato al soggetto per via sottocutanea una volta ogni 21 giorni. In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi da policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi da policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2* o una mutazione dell'esone 12 di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi post-policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi post-policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è trombocitopenia essenziale o mielofibrosi post-trombocitemia essenziale. In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-essenziale trombocitemia sono associate o causate da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-trombocitemia essenziale include fibrosi reticolinica o la fibrosi tricromica. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi se il soggetto ha ricevuto nessuna (0) unità di globuli rossi durante un periodo di tempo di 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81,

82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi se ha ricevuto una frequenza media di trasfusione di globuli rossi da 2 a 4 unità di globuli rossi ogni 28 giorni durante un periodo di tempo di almeno 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è un essere umano.

[0014] In una forma di realizzazione, il metodo comprende somministrare al soggetto una dose di 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg o 2,0 mg/kg di un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica consistente nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11, in cui il polipeptide viene somministrato al soggetto per via sottocutanea una volta ogni 21 giorni. In forme di realizzazione specifiche, la dose è 1 mg/kg. In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi da policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi da policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2* o una mutazione dell'esone 12 di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi post-policitemia vera. In

forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi post-policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è trombocitopenia essenziale o mielofibrosi post-trombocitemia essenziale. In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-essenziale trombocitemia sono associate o causate da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-trombocitemia essenziale include fibrosi reticolinica o la fibrosi tricromica. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi se il soggetto ha ricevuto nessuna (0) unità di globuli rossi durante un periodo di tempo di 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi se ha ricevuto una frequenza media di trasfusione di globuli rossi da 2 a 4 unità di globuli rossi ogni 28 giorni durante un periodo di tempo di almeno 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di

segnalazione di ActRIIB al soggetto. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è un essere umano.

[0015] In una forma di realizzazione, il metodo comprende somministrare al soggetto una dose di 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg o 2,0 mg/kg di un polipeptide consistente nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11, in cui il polipeptide viene somministrato al soggetto per via sottocutanea una volta ogni 21 giorni. In forme di realizzazione specifiche, la dose è 1 mg/kg. In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi da policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi da policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2* o una mutazione dell'esone 12 di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi post-policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi post-policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è trombocitopenia essenziale o mielofibrosi post-trombocitemia essenziale. In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-essenziale trombocitemia sono associate o causate da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della

trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-trombocitemia essenziale include fibrosi reticolinica o la fibrosi tricromica. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi se il soggetto ha ricevuto nessuna (0) unità di globuli rossi durante un periodo di tempo di 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi se ha ricevuto una frequenza media di trasfusione di globuli rossi da 2 a 4 unità di globuli rossi ogni 28 giorni durante un periodo di tempo di almeno 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è un essere umano.

4. TERMINOLOGIA E ABBREVIAZIONI

[0016] Secondo l'uso fattone nella presente, "ActRII" si riferisce a recettore per attivina di tipo II. Secondo l'uso fattone nella presente, "ActRIIA" si riferisce a recettore per attivina di tipo IIA. Si vedano, ad esempio, Mathews e Vale, 1991, Cell 65:973-982. Il numero di accesso GenBank™ NM_001278579.1 fornisce una sequenza di acido nucleico esemplificativa di ActRIIA umano. Il numero di

accesso GenBank™ NP_001265508.1 fornisce una sequenza amminoacidica esemplificativa di ActRIIA umano. Secondo l'uso fattone nella presente, "ActRIIB" si riferisce a recettore per attivina di tipo IIB. Si veda, ad esempio, Attisano et al., 1992, Cell 68: 97-108. Il numero di accesso GenBank™ NM 001106.3 fornisce una sequenza di acido nucleico esemplificativa di ActRIIB umano. Il numero di accesso GenBank™ NP_001097.2 fornisce una sequenza amminoacidica esemplificativa di ActRIIB umano.

[0017] Secondo l'uso fattone nella presente, "Hb" e "Hgb" si riferiscono ad emoglobina.

[0018] Secondo l'uso fattone nella presente, "mg/kg", nel contesto di una dose di un inibitore di segnalazione di ActRIIB, si riferisce a milligrammi dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB per chilogrammo di peso del soggetto a cui deve essere somministrato l'inibitore di segnalazione di ActRIIB.

[0019] Secondo l'uso fattone nella presente, "MF" si riferisce a mielofibrosi.

[0020] Secondo l'uso fattone nella presente, il termine "PMF" si riferisce a mielofibrosi primaria.

[0021] Secondo l'uso fattone nella presente, il termine "MF post-PV" si riferisce a mielofibrosi post-policitemia vera.

[0022] Secondo l'uso fattone nella presente, il termine "MF post-ET" si riferisce a mielofibrosi post-trombocitemia essenziale.

[0023] Secondo l'uso fattone nella presente, il termine "MPN" si riferisce a neoplasia mieloproliferativa.

[0024] Secondo l'uso fattone nella presente, "RBC" si riferisce a globulo rosso.

[0025] Secondo l'uso fattone nella presente, "RBC-TI" si riferisce ad indipendenza da trasfusioni di globuli rossi.

4.1 BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

[0026]

Figura 1: meccanismo d'azione di luspatercept.

Figura 2: disegno dello studio.

5. DESCRIZIONE DETTAGLIATA

5.1 PANORAMICA

[0027] Nella presente viene fornito un inibitore di segnalazione di ActRIIB per uso in un metodo per trattare anemia in un soggetto avente mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa, in cui il soggetto è stato precedentemente trattato con ruxolitinib, in cui il metodo comprende

somministrare al soggetto una quantità farmaceuticamente efficace dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB, in cui l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è una proteina di fusione comprendente: (a) un frammento del dominio extracellulare di ActRIIB, in cui il frammento comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 9; (b) un linker; e (c) un Fc di una IgG. Ulteriori aspetti e forme di realizzazione dell'invenzione sono forniti nelle rivendicazioni allegate.

[0028] In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi primaria. In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi da policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi da policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2* o una mutazione dell'esone 12 di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi post-policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi post-policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è trombocitopenia essenziale o mielofibrosi post-trombocitemia essenziale. In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-essenziale trombocitemia sono associate o causate da una mutazione di *JAK2*, ad

esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-trombocitemia essenziale include fibrosi reticolinica o la fibrosi tricromica. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi se il soggetto ha ricevuto nessuna (0) unità di globuli rossi durante un periodo di tempo di 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi se ha ricevuto una frequenza media di trasfusione di globuli rossi da 2 a 4 unità di globuli rossi ogni 28 giorni durante un periodo di tempo di almeno 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. In forme di realizzazione specifiche, la quantità farmaceuticamente efficace è da 0,3 mg/kg a 2,0 mg/kg, ad esempio 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg o 2,0 mg/kg. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto una volta ogni 21 giorni, una volta ogni 28 giorni, o una volta ogni 48 giorni. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto una volta ogni 21 giorni. In forme di realizzazione

specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto per via endovenosa o per via sottocutanea. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto per via sottocutanea. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è una proteina di fusione umanizzata consistente nel dominio extracellulare di ActRIIB comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:9 e il dominio Fc di IgG1 umana. Un inibitore di segnalazione di ActRIIB noto è un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo consistente in: (a) identica al 90% a SEQ ID NO:4; (b) identica al 95% a SEQ ID NO:4; (c) identica al 98% a SEQ ID NO:4; (d) SEQ ID NO:4; (e) identica al 90% a SEQ ID NO:7; (f) identica al 95% a SEQ ID NO:7; (g) identica al 98% a SEQ ID NO:7; (h) SEQ ID NO:7; (i) identica al 90% a SEQ ID NO:8; (j) identica al 95% a SEQ ID NO:8; (k) identica al 98% a SEQ ID NO:8; (l) SEQ ID NO:8; (m) identica al 90% a SEQ ID NO:11; (n) identica al 95% a SEQ ID NO:11; (o) identica al 98% a SEQ ID NO:11; e (p) SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo consistente in: (a) identica al 90% a SEQ ID NO:11; (b) identica al 95% a SEQ ID NO:11; (c) identica al 98% a SEQ ID NO:11; e (d) SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica consistente nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione

specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide consistente nella sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è un essere umano.

[0029] Il trattamento in conformità con l'invenzione riduce o allevia uno o più sintomi di detta mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa in detto soggetto. In forme di realizzazione specifiche, il sintomo è uno o più tra affaticamento, sudorazione notturna, prurito, disturbi addominali, dolore sotto le costole sul lato sinistro, sazietà precoce, o dolore osseo. In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi primaria. In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi da policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi da policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2* o una mutazione dell'esone 12 di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi post-policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi post-policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è trombocitopenia essenziale o mielofibrosi post-trombocitemia essenziale. In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-essenziale

trombocitemia sono associate o causate da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-trombocitemia essenziale include fibrosi reticolinica o la fibrosi tricromica. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi se il soggetto ha ricevuto nessuna (0) unità di globuli rossi durante un periodo di tempo di 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi se ha ricevuto una frequenza media di trasfusione di globuli rossi da 2 a 4 unità di globuli rossi ogni 28 giorni durante un periodo di tempo di almeno 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. In forme di realizzazione specifiche, la quantità farmacologicamente efficace è da 0,3 mg/kg a 2,0 mg/kg, ad esempio 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg o 2,0 mg/kg. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto una volta ogni 21 giorni, una volta ogni 28 giorni, o una volta ogni 48 giorni. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene

somministrato al soggetto una volta ogni 21 giorni. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto per via endovenosa o per via sottocutanea. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto per via sottocutanea. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è una proteina di fusione umanizzata consistente nel dominio extracellulare di ActRIIB comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:9 e il dominio Fc di IgG1 umana. Un inibitore di segnalazione di ActRIIB noto è un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo consistente in: (a) identica al 90% a SEQ ID NO:4; (b) identica al 95% a SEQ ID NO:4; (c) identica al 98% a SEQ ID NO:4; (d) SEQ ID NO:4; (e) identica al 90% a SEQ ID NO:7; (f) identica al 95% a SEQ ID NO:7; (g) identica al 98% a SEQ ID NO:7; (h) SEQ ID NO:7; (i) identica al 90% a SEQ ID NO:8; (j) identica al 95% a SEQ ID NO:8; (k) identica al 98% a SEQ ID NO:8; (l) SEQ ID NO:8; (m) identica al 90% a SEQ ID NO:11; (n) identica al 95% a SEQ ID NO:11; (o) identica al 98% a SEQ ID NO:11; e (p) SEQ ID NO:11. Un inibitore di segnalazione di ActRIIB noto è un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo consistente in: (a) identica al 90% a SEQ ID NO:11; (b) identica al 95% a SEQ ID NO:11; (c) identica al 98% a SEQ ID NO:11; e (d) SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica consistente nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11.

In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide consistente nella sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è un essere umano.

[0030] In una forma di realizzazione, il metodo comprende somministrare al soggetto una dose di 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg o 2,0 mg/kg di un polipeptide consistente nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11, in cui il polipeptide viene somministrato al soggetto per via sottocutanea una volta ogni 21 giorni. In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi da policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi da policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2* o una mutazione dell'esone 12 di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi post-policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi post-policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è trombocitopenia essenziale o mielofibrosi post-trombocitemia essenziale. In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-essenziale trombocitemia sono associate o causate da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una

mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-trombocitemia essenziale include fibrosi reticolinica o la fibrosi tricromica. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi se il soggetto ha ricevuto nessuna (0) unità di globuli rossi durante un periodo di tempo di 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi se ha ricevuto una frequenza media di trasfusione di globuli rossi da 2 a 4 unità di globuli rossi per giorni durante un periodo di tempo di almeno 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è un essere umano.

5.2 METODI DI TRATTAMENTO

[0031] Nella presente viene divulgato un metodo per trattare mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa in un soggetto che ne ha bisogno, in cui il metodo comprende somministrare al soggetto una quantità farmaceuticamente efficace di un inibitore di segnalazione di ActRIIB. In casi

specifici, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi primaria. In casi specifici, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi da policitemia vera. In casi più specifici, la mielofibrosi da policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2* o una mutazione dell'esone 12 di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In casi specifici, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi post-policitemia vera. In casi più specifici, la mielofibrosi post-policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In casi specifici, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è trombocitopenia essenziale o mielofibrosi post-trombocitemia essenziale. In casi più specifici, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-essenziale trombocitemia sono associate o causate da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In casi più specifici, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-trombocitemia essenziale include fibrosi reticolinica o la fibrosi tricromica.

[0032] In casi specifici, il soggetto è un soggetto descritto nella Sezione 5.3. In casi specifici, il soggetto è un essere umano. In casi specifici il soggetto ha anemia. In casi specifici, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi. In casi specifici, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi se il soggetto ha ricevuto nessuna (0) unità di globuli rossi durante un periodo

di tempo di 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. In casi specifici il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi. In casi specifici, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi se ha ricevuto una frequenza media di trasfusione di globuli rossi da 2 a 4 unità di globuli rossi ogni 28 giorni durante un periodo di tempo di almeno 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto.

[0033] In casi specifici, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto come parte di una composizione. In casi specifici, la composizione è una composizione descritta nella Sezione 5.5.

[0034] In casi specifici, la dose farmaceuticamente efficace è una dose descritta nella Sezione 5.6. In casi specifici, la quantità farmaceuticamente efficace è da 0,3 mg/kg a 2,0 mg/kg, ad esempio 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg o 2,0 mg/kg dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB. In casi specifici, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto ad una frequenza descritta nella Sezione 5.6. In casi specifici, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto una volta ogni 21 giorni, una volta ogni 28 giorni, o una volta ogni 48

giorni. In casi preferiti, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto una volta ogni 21 giorni.

[0035] In casi specifici, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto tramite una via di somministrazione descritta nella Sezione 5.6. In casi specifici, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto per via endovenosa o per via sottocutanea. In casi preferiti, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto per via sottocutanea.

[0036] In casi specifici, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un inibitore di segnalazione di ActRIIB descritto nella Sezione 5.4. In casi specifici, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In casi specifici, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica consistente nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In casi specifici, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide consistente nella sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO:11. In un caso preferito, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è luspatercept. In casi specifici, il soggetto è un essere umano.

[0037] Nella presente viene anche divulgato un metodo per trattare mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa in un soggetto che ne ha bisogno, in cui il metodo comprende somministrare al soggetto una quantità

farmaceuticamente efficace di un inibitore di segnalazione di ActRIIB, e in cui detto trattare riduce o allevia uno o più sintomi di detta mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa in detto soggetto. In casi specifici, il sintomo è uno o più tra affaticamento, sudorazione notturna, prurito, fastidio addominale, dolore sotto le costole sul lato sinistro, sazietà precoce, o dolore osseo. In casi specifici, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi primaria. In casi specifici, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi da policitemia vera. In casi più specifici, la mielofibrosi da policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2* o una mutazione dell'esone 12 di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In casi specifici, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi post-policitemia vera. In casi più specifici, la mielofibrosi post-policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In casi specifici, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è trombocitopenia essenziale o mielofibrosi post-trombocitemia essenziale. In casi più specifici, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-essenziale trombocitemia sono associate o causate da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In casi più specifici, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-trombocitemia essenziale include fibrosi reticolinica o la fibrosi tricromica.

[0038] In casi specifici, il soggetto è un soggetto descritto nella Sezione 5.3. In casi specifici, il soggetto è un essere umano. In casi specifici, il soggetto ha anemia. In casi specifici, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi. In casi specifici, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi se il soggetto ha ricevuto nessuna (0) unità di globuli rossi durante un periodo di tempo di 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. In casi specifici il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi. In casi specifici, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi se ha ricevuto una frequenza media di trasfusione di globuli rossi da 2 a 4 unità di globuli rossi ogni 28 giorni durante un periodo di tempo di almeno 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto.

[0039] In casi specifici, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto come parte di una composizione. In casi specifici, la composizione è una composizione descritta nella Sezione 5.5.

[0040] In casi specifici, la dose farmaceuticamente efficace è una dose descritta nella Sezione 5.6. In casi specifici, la quantità farmaceuticamente efficace è da 0,3 mg/kg a 2,0 mg/kg, ad esempio 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg o 2,0 mg/kg dell'inibitore di

segnalazione di ActRIIB. In casi specifici, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto ad una frequenza descritta nella Sezione 5.6. In casi specifici, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto una volta ogni 21 giorni, una volta ogni 28 giorni, o una volta ogni 48 giorni. In casi preferiti, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto una volta ogni 21 giorni.

[0041] In casi specifici, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto tramite una via di somministrazione descritta nella Sezione 5.6. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto per via endovenosa o per via sottocutanea. In casi preferiti, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto per via sottocutanea.

[0042] In casi specifici, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un inibitore di segnalazione di ActRIIB descritto nella Sezione 5.4. In casi specifici, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In casi specifici, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica consistente nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In casi specifici, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide consistente nella sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO:11. In un caso preferito, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è luspatercept. In casi specifici, il soggetto è un essere umano.

[0043] Nella presente è fornito un metodo per trattare anemia in un soggetto che ne ha bisogno, comprendente somministrare al soggetto una quantità farmaceuticamente efficace di un inibitore di segnalazione di ActRIIB, in cui il soggetto ha mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa, come definito nelle rivendicazioni allegate. In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi primaria. In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi da policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi da policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2* o una mutazione dell'esone 12 di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi post-policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi post-policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è trombocitopenia essenziale o mielofibrosi post-trombocitemia essenziale. In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-essenziale trombocitemia sono associate o causate da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione

più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-trombocitemia essenziale include fibrosi reticolinica o la fibrosi tricromica.

[0044] In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è un soggetto descritto nella Sezione 5.3. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è un essere umano. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi se il soggetto ha ricevuto nessuna (0) unità di globuli rossi durante un periodo di tempo di 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi se ha ricevuto una frequenza media di trasfusione di globuli rossi da 2 a 4 unità di globuli rossi ogni 28 giorni durante un periodo di tempo di almeno 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto.

[0045] In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto come parte di una composizione. In forme di realizzazione specifiche, la composizione è una composizione descritta nella Sezione 5.5.

[0046] In forme di realizzazione specifiche, la dose farmaceuticamente efficace è una dose descritta nella Sezione 5.6. In forme di realizzazione specifiche, la quantità farmaceuticamente efficace è da 0,3 mg/kg a 2,0 mg/kg, ad esempio 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg o 2,0 mg/kg dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto ad una frequenza descritta nella Sezione 5.6. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto una volta ogni 21 giorni, una volta ogni 28 giorni, o una volta ogni 48 giorni. In forme di realizzazione preferite, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto una volta ogni 21 giorni.

[0047] In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto tramite una via di somministrazione descritta nella Sezione 5.6. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto per via endovenosa o per via sottocutanea. In forme di realizzazione preferite, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto per via sottocutanea.

[0048] In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un inibitore di segnalazione di ActRIIB descritto nella Sezione 5.4. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In forme di

realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica consistente nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide consistente nella sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO:11. In una forma di realizzazione preferita, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è luspatercept. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è un essere umano.

[0049] In una forma di realizzazione, il metodo comprende somministrare al soggetto una dose di 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg o 2,0 mg/kg di un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11, in cui il polipeptide viene somministrato al soggetto per via sottocutanea una volta ogni 21 giorni. In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi primaria. In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi da policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi da policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2* o una mutazione dell'esone 12 di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi post-policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi post-policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della

trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è trombocitopenia essenziale o mielofibrosi post-trombocitemia essenziale. In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-essenziale trombocitemia sono associate o causate da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-trombocitemia essenziale include fibrosi reticolinica o la fibrosi tricromica.

[0050] In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è un soggetto descritto nella Sezione 5.3. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi se il soggetto ha ricevuto nessuna (0) unità di globuli rossi durante un periodo di tempo di 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi se ha ricevuto una frequenza media di trasfusione di globuli rossi da 2 a 4 unità di globuli rossi ogni 28 giorni durante un periodo di tempo di almeno 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83,

84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto.

[0051] In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto come parte di una composizione. In forme di realizzazione specifiche, la composizione è una composizione descritta nella Sezione 5.5.

[0052] In una forma di realizzazione, il metodo comprende somministrare al soggetto una dose di 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg o 2,0 mg/kg di un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica consistente nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11, in cui il polipeptide viene somministrato al soggetto per via sottocutanea una volta ogni 21 giorni. In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi primaria. In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi da policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi da policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2* o una mutazione dell'esone 12 di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi post-policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi post-policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione

V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è trombocitopenia essenziale o mielofibrosi post-trombocitemia essenziale. In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-essenziale trombocitemia sono associate o causate da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-trombocitemia essenziale include fibrosi reticolinica o la fibrosi tricromica.

[0053] In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è un soggetto descritto nella Sezione 5.3. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi se il soggetto ha ricevuto nessuna (0) unità di globuli rossi durante un periodo di tempo di 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi se ha ricevuto una frequenza media di trasfusione di globuli rossi da 2 a 4 unità di globuli rossi ogni 28 giorni durante un periodo di tempo di almeno 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83,

84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto.

[0054] In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto come parte di una composizione. In forme di realizzazione specifiche, la composizione è una composizione descritta nella Sezione 5.5.

[0055] In una forma di realizzazione, il metodo comprende somministrare al soggetto una dose di 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg o 2,0 mg/kg di un polipeptide consistente nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11, in cui il polipeptide viene somministrato al soggetto per via sottocutanea una volta ogni 21 giorni. In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi primaria. In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi da policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi da policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2* o una mutazione dell'esone 12 di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi post-policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi post-policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della

trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è trombocitopenia essenziale o mielofibrosi post-trombocitemia essenziale. In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-essenziale trombocitemia sono associate o causate da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-trombocitemia essenziale include fibrosi reticolinica o la fibrosi tricromica.

[0056] In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è un soggetto descritto nella Sezione 5.3. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi se il soggetto ha ricevuto nessuna (0) unità di globuli rossi durante un periodo di tempo di 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi se ha ricevuto una frequenza media di trasfusione di globuli rossi da 2 a 4 unità di globuli rossi ogni 28 giorni durante un periodo di tempo di almeno 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83,

84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto.

[0057] In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto come parte di una composizione. In forme di realizzazione specifiche, la composizione è una composizione descritta nella Sezione 5.5.

5.3 POPOLAZIONE DI PAZIENTI

[0058] I soggetti trattati in conformità con i metodi descritti nella presente possono essere qualsiasi mammifero come roditori e primati e, in una forma di realizzazione preferita, esseri umani. In certe forme di realizzazione, il soggetto è un essere umano. In certe forme di realizzazione, i metodi descritti nella presente possono essere usati per trattare mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa e in qualsiasi mammifero, come roditori e primati, e, in una forma di realizzazione preferita, in soggetti umani.

[0059] In certe forme di realizzazione, il soggetto trattato in conformità con i metodi qui descritti può essere di qualsiasi età. In certe forme di realizzazione, il soggetto trattato in conformità con i metodi descritti nella presente ha meno di 18 anni. In una forma di realizzazione specifica, il soggetto trattato in conformità con i metodi descritti nella presente ha meno di 13 anni. In un'altra forma di realizzazione specifica, il soggetto trattato in conformità con i metodi descritti nella presente ha meno di 12, meno di 11, meno di 10, meno di 9, meno

di 8, meno di 7, meno di 6, o meno di 5 anni. In un'altra forma di realizzazione specifica, il soggetto trattato in conformità con i metodi descritti nella presente ha 1-3 anni, 3-5 anni, 5-7 anni, 7-9 anni, 9-11 anni, 11-13 anni, 13-15 anni, 15-20 anni, 20-25 anni, 25-30 anni, o più di 30 anni. In un'altra forma di realizzazione specifica, il soggetto trattato in conformità con i metodi descritti nella presente ha 30-35 anni, 35-40 anni, 40-45 anni, 45-50 anni, 50-55 anni, 55-60 anni, o più di 60 anni. In un'altra forma di realizzazione specifica, il soggetto trattato in conformità con i metodi descritti nella presente ha 60-65 anni, 65-70 anni, 70-75 anni, 75-80 anni, o più di 80 anni.

[0060] Il soggetto trattato secondo i metodi forniti nella presente ha mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa. In certe forme di realizzazione, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi primaria. In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi da policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi da policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2* o una mutazione dell'esone 12 di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi post-policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi post-policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia

mieloproliferativa è trombocitopenia essenziale o mielofibrosi post-trombocitemia essenziale. In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-essenziale trombocitemia sono associate o causate da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-trombocitemia essenziale include fibrosi reticolinica o la fibrosi tricromica.

[0061] Il soggetto trattato secondo i metodi forniti nella presente ha mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa e anemia. In certe forme di realizzazione, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi primaria. In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi da policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi da policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2* o una mutazione dell'esone 12 di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è mielofibrosi post-policitemia vera. In forme di realizzazione più specifiche, la mielofibrosi post-policitemia vera è associata o causata da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione specifiche, la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è trombocitopenia essenziale o

mielofibrosi post-trombocitemia essenziale. In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-essenziale trombocitemia sono associate o causate da una mutazione di *JAK2*, ad esempio una mutazione V617F di *JAK2*, o una mutazione del recettore della trombopoietina (MPL). In forme di realizzazione più specifiche, la trombocitopenia essenziale o la mielofibrosi post-trombocitemia essenziale include fibrosi reticolinica o la fibrosi tricromica.

[0062] Il soggetto trattato secondo i metodi forniti nella presente è stato precedentemente trattato con ruxolitinib. In una forma di realizzazione specifica, un soggetto trattato secondo i metodi forniti nella presente ha assunto una dose stabile di ruxolitinib per almeno 112 giorni immediatamente prima del trattamento.

[0063] In certe forme di realizzazione, un soggetto trattato secondo i metodi forniti nella presente è indipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, un soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi se il soggetto ha ricevuto nessuna (0) unità di globuli rossi durante un periodo di tempo di 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima di una prima somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto.

[0064] In certe forme di realizzazione, un soggetto trattato secondo i metodi forniti nella presente è dipendente da trasfusioni di globuli rossi. In forme di realizzazione specifiche, un soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi se ha ricevuto una frequenza media di trasfusione di globuli rossi da 2 a 4 unità di globuli rossi ogni 28 giorni durante un periodo di tempo di almeno 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima di una prima somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto.

5.4 INIBITORI DI SEGNALAZIONE DI ACTRIIB

[0065] Secondo l'uso fattone nella presente, il termine "ActRIIB" si riferisce a una famiglia di proteine di recettore per attivina di tipo IIB (ActRIIB) da qualsiasi specie e varianti derivate da tali proteine ActRIIB mediante mutagenesi o altra modifica. Un riferimento ad ActRIIB nella presente è inteso come riferimento a una qualsiasi delle forme attualmente identificate del recettore. I membri della famiglia ActRIIB sono generalmente proteine transmembrana, composte da un dominio extracellulare di legame a ligando con una regione ricca di cisteina, un dominio transmembrana, e un dominio citoplasmatico con attività serina/treonina chinasi prevista.

[0066] Inibitori di segnalazione di ActRIIB includono, senza limitazione, polipeptidi di ActRIIB solubile di legame ad attivina; anticorpi che si legano ad attivina (particolarmente le subunità A o B di attivina, cui si fa riferimento anche come βA o βB) e interrompono il legame di ActRIIB; anticorpi che si legano ad

ActRIIB e interrompono il legame di attivina; proteine non anticorpali selezionate per il legame ad attivina o ActRIIB; e peptidi randomizzati selezionati per il legame ad attivina o ActRIIB, che possono essere coniugati a un dominio Fc.

[0067] Due o più proteine differenti (o altre porzioni funzionali) con attività di legame ad attivina o ActRIIB, specialmente leganti di attivina che bloccano rispettivamente i siti di legame di tipo I (ad esempio, un recettore per attivina di tipo I solubile) e di tipo II (ad esempio, un recettore per attivina di tipo II solubile), possono essere collegate insieme per creare una molecola di legame bifunzionale o multifunzionale che inibisce ActRIIB e che può perciò essere usata nelle composizioni e nei metodi descritti nella presente. Antagonisti dell'asse di segnalazione attivina-ActRIIB che inibiscono ActRIIB, includono aptameri di acidi nucleici, piccole molecole e altri agenti, vengono usati nelle composizioni e nei metodi descritti nella presente.

5.4.1 Inibitori di segnalazione di ActRIIB comprendenti polipeptidi di ActRIIB

[0068] Secondo l'uso fattone nella presente, il termine "polipeptide di ActRIIB" si riferisce a polipeptidi comprendenti qualsiasi polipeptide presente in natura di un membro della famiglia ActRIIB nonché qualsiasi loro variante (inclusi mutanti, frammenti, fusioni, e forme peptidomimetiche) che conservano un'attività utile. Ad esempio, polipeptidi di ActRIIB includono polipeptidi derivati dalla sequenza di qualsiasi recettore ActRIIB noto avente una sequenza

identica almeno all'80% circa alla sequenza di un polipeptide di ActRIIB, e facoltativamente identità di almeno l'85%, il 90%, il 95%, il 96%, il 97%, il 98%, il 99% o più. Ad esempio, un polipeptide di ActRIIB può legarsi a, e inibire la funzione di, una proteina ActRIIB e/o attivina. Un esempio di polipeptide di ActRIIB include il polipeptide precursore di ActRIIB umano (SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO: 14). Per quanto riguarda il polipeptide precursore di ActRIIB la cui sequenza amminoacidica è raffigurata come SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO: 14 (ossia il polipeptide precursore di ActRIIB umano), il peptide segnale del polipeptide precursore di ActRIIB è situato negli amminoacidi da 1 a 18; il dominio extracellulare è situato negli amminoacidi da 19 a 134 e i potenziali siti di glicosilazione N-collegati sono situati nelle posizioni amminoacidiche 42 e 65. La sequenza di acido nucleico codificante il polipeptide precursore di ActRIIB umano di SEQ ID NO:3 è divulgata come SEQ ID NO:6 (SEQ ID NO:6 fornisce una alanina nel codone corrispondente alla posizione amminoacidica 64, ma potrebbe essere facilmente modificata da un tecnico del ramo usando metodi noti nell'arte per fornire invece una arginina nel codone corrispondente alla posizione amminoacidica 64). *Si veda* la Tabella 2 per una descrizione delle sequenze. L'inibitore di segnalazione di ActRIIB dell'invenzione è definito nelle rivendicazioni.

[0069] La numerazione degli amminoacidi per tutti i polipeptidi correlati ad ActRIIB descritti nella presente si basa sulla numerazione degli amminoacidi per SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO: 14 (che differiscono solo nell'amminoacido espresso in posizione 64), a meno che non sia specificatamente indicato

diversamente. Ad esempio, se un polipeptide di ActRIIB è descritto come avente una sostituzione/mutazione nella posizione amminoacidica 79, allora è da intendersi che la posizione 79 si riferisce al 79° amminoacido in SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14, da cui deriva il polipeptide di ActRIIB. Allo stesso modo, se un polipeptide di ActRIIB è descritto come avente una alanina o una arginina nella posizione amminoacidica 64, allora è da intendersi che la posizione 64 si riferisce al 64° amminoacido in SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14, da cui deriva il polipeptide di ActRIIB.

[0070] Gli inibitori di segnalazione di ActRIIB usati nelle composizioni e nei metodi descritti nella presente comprendono polipeptidi comprendenti un dominio di legame ad attivina di ActRIIB. In alcuni casi, i domini di legame ad attivina di ActRIIB comprendono il dominio extracellulare di ActRIIB, o una sua porzione. In casi specifici, il dominio extracellulare di ActRIIB, o sua porzione, è solubile. Forme modificate illustrative di polipeptidi di ActRIIB sono descritte nelle pubblicazioni di domanda di brevetto statunitense n. 20090005308 e 20100068215. Forme modificate illustrative di polipeptidi di ActRIIB sono inoltre divulgate nelle pubblicazioni di domanda di brevetto internazionale n. WO 2008/097541 e WO 2010/019261

[0071] In casi specifici, i polipeptidi di ActRIIB usati nelle composizioni e nei metodi descritti nella presente sono polipeptidi di ActRIIB solubile. Il termine "polipeptide di ActRIIB solubile" si riferisce generalmente a polipeptidi comprendenti un dominio extracellulare di una proteina ActRIIB, incluso

qualsiasi dominio extracellulare presente in natura di una proteina ActRIIB, nonché qualsiasi sua variante (inclusi mutanti, frammenti e forme peptidomimetiche). Polipeptidi di ActRIIB solubile possono legarsi ad attivina; tuttavia, la proteina ActRIIB di tipo selvatico non esibisce selettività significativa nel legarsi ad attivina rispetto a GDF8/11. In certi casi, forme alterate di ActRIIB con differenti proprietà di legame possono essere usate nei metodi forniti nella presente. Tali forme alterate sono divulgate, ad esempio, nella pubblicazione della domanda di brevetto internazionale n. WO 2006/012627 e WO 2010/019261. A proteine ActRIIB native o alterate può essere conferita una specificità aggiuntiva per l'attivina accoppiandole con un secondo agente di legame selettivo per l'attivina. Polipeptidi di ActRIIB solubile esemplificativi includono il dominio extracellulare di un polipeptide di ActRIIB umano (ad esempio SEQ ID NO: 4, 5, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28, e 29).

[0072] È stato dimostrato che una proteina di fusione di Fc avente la sequenza extracellulare ActRIIB divulgata da Hilden et al. (Blood, 1994, 83(8):2163-70), che ha un'alanina nella posizione corrispondente all'amminoacido 64 della sequenza amminoacidica di precursore di ActRIIB, ossia SEQ ID NO:3 (cui nella presente si fa riferimento come "A64"), possiede un'affinità relativamente bassa per attivina e GDF-11. Al contrario, una proteina di fusione di Fc con un'arginina nella posizione 64 della sequenza amminoacidica di precursore di ActRIIB (nella presente vi si fa riferimento come "R64") ha un'affinità per attivina e GDF-11 nell'intervallo da basso nanomolare ad alto picomolare (si veda, ad esempio, la pubblicazione di domanda di brevetto statunitense n.

20100068215). Si veda anche la pubblicazione internazionale n. WO 2010/019261.

[0073] Una sequenza amminoacidica di precursore di ActRIIB con una arginina nella posizione 64 è presentata in SEQ ID NO:14. Di fatto, in certe forme di realizzazione, i polipeptidi di ActRIIB usati secondo le composizioni e i metodi descritti nella presente possono comprendere (i) un'alanina nella posizione corrispondente all'amminoacido 64 della sequenza amminoacidica di precursore di ActRIIB, ossia SEQ ID NO:3; o (ii) un'arginina nella posizione 64 della sequenza amminoacidica di precursore di ActRIIB, ossia SEQ ID NO:14. In altre forme di realizzazione, i polipeptidi di ActRIIB usati in conformità con le composizioni e i metodi descritti nella presente possono comprendere un amminoacido che non è alanina o arginina nella posizione corrispondente all'amminoacido 64 della sequenza amminoacidica di precursore di ActRIIB, ossia SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14.

[0074] È stato mostrato che una delezione del nodo di prolina al terminale C del dominio extracellulare di ActRIIB riduce l'affinità del recettore per attivina (si veda, ad esempio, Attisano et al., Cell, 1992, 68(1):97-108). Una proteina di fusione ActRIIB-Fc contenente gli amminoacidi 20-119 di SEQ ID NO:14 (ossia SEQ ID NO:18), "ActRIIB(20-119)-Fc", ha un legame ridotto a GDF-11 e attivina rispetto a una proteina di fusione ActRIIB-Fc contenente gli amminoacidi 20-134 di SEQ ID NO:14 (ossia SEQ ID NO:17), "ActRIIB(20-134)-Fc", che include la regione di nodo di prolina e il dominio juxtamembrana completo. Tuttavia,

una proteina di fusione ActRIIB-Fc contenente gli amminoacidi 20-129 di SEQ ID NO:14, "ActRIIB(20-129)-Fc", conserva un'attività simile ma leggermente ridotta rispetto al dominio extracellulare non tronco di ActRIIB, nonostante la regione del nodo di prolina sia interrotta. Perciò, ci si aspetta che polipeptidi di ActRIIB comprendenti domini extracellulari che si fermano agli amminoacidi 134, 133, 132, 131, 130 e 129 della SEQ ID NO:14 (o SEQ ID NO:3) siano tutti attivi, ma costrutti che si fermano agli amminoacidi 134 o 133 potrebbero essere massimamente attivi. Similmente, non ci si aspetta che mutazioni in qualsiasi dei residui 129-134 alterino l'affinità di legame a ligando con ampi margini, come indicato dal fatto che le mutazioni di P129 e P130 di SEQ ID NO:14 non diminuiscono sostanzialmente il legame a ligando. Pertanto, i polipeptidi di ActRIIB usati in conformità con i metodi e le composizioni descritti nella presente possono terminare già all'amminoacido 109 (ossia la cisteina finale) di SEQ ID NO: 14 (o SEQ ID NO:3); tuttavia, si prevede che forme che terminano alle, o tra le, posizioni amminoacidiche 109 e 119 di SEQ ID NO:14 (o SEQ ID NO:3) abbiano una ridotta capacità di legame a ligando.

[0075] L'amminoacido 29 di SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:14 rappresenta la cisteina iniziale nella sequenza di precursore di ActRIIB. Si prevede che un polipeptide di ActRIIB che inizia all'amminoacido 29 del terminale N di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14, o prima di queste posizioni amminoacidiche, conservi l'attività di legame a ligando. Una mutazione da alanina ad asparagina nella posizione 24 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 introduce una sequenza di glicosilazione N-collegata senza influenzare sostanzialmente il legame a

ligando. Ciò conferma che mutazioni nella regione tra il peptide di clivaggio segnale e la regione reticolata di cisteina, corrispondenti agli amminoacidi 20-29 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14, sono ben tollerate. In particolare, polipeptidi di ActRIIB che iniziano nelle posizioni amminoacidiche 20, 21, 22, 23 e 24 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 conserveranno l'attività, e ci si aspetta che anche polipeptidi di ActRIIB che iniziano nelle posizioni amminoacidiche 25, 26, 27, 28 e 29 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 conservino l'attività. Un polipeptide di ActRIIB che inizia nella posizione amminoacidica 22, 23, 24 o 25 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO: 14 avrà l'attività massima.

[0076] Nel loro insieme, le porzioni attive (ossia polipeptidi di ActRIIB) della proteina di precursore di ActRIIB (ossia SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14) da usarsi secondo i metodi e le composizioni descritti nella presente comprenderanno generalmente gli amminoacidi 29-109 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14, e tali polipeptidi di ActRIIB possono, ad esempio, iniziare in un residuo corrispondente a uno qualsiasi degli amminoacidi 19-29 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 e terminare in una posizione corrispondente a uno qualsiasi degli amminoacidi 109-134 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14. Esempi specifici di polipeptidi di ActRIIB racchiusi nella presente includono quelli che iniziano in una posizione amminoacidica da 19-29, 20-29 o 21-29 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 e terminano in una posizione amminoacidica da 119-134, 119-133 o 129-134, 129-133 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14. Altri esempi specifici di polipeptidi di ActRIIB racchiusi nella presente includono quelli che iniziano in una posizione di amminoacido da 20-24 (o 21-24, o 22-25) di SEQ

ID NO:3 o SEQ ID NO: 14 e terminano in una posizione amminoacidica da 109-134 (o 109-133), 119-134 (o 119-133) o 129-134 (o 129-133) di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14. Sono anche contemplati polipeptidi di ActRIIB varianti che rientrano in questi intervalli, particolarmente quelli aventi almeno 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% di identità di sequenza o omologia di sequenza con la corrispondente porzione di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14.

[0077] In certi casi, gli inibitori di segnalazione di ActRIIB usati nelle composizioni e nei metodi descritti nella presente comprendono una forma tronca di un dominio extracellulare di ActRIIB. Il troncamento può essere al terminale carbossilico e/o al terminale amminico del polipeptide di ActRIIB. In certi casi, il troncamento può essere di 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 amminoacidi rispetto al dominio extracellulare del polipeptide di ActRIIB maturo. In certi casi, il troncamento può essere di 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 amminoacidi N-terminali del dominio extracellulare del polipeptide di ActRIIB maturo. In certi casi, il troncamento può essere di 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 amminoacidi C-terminali del dominio extracellulare del polipeptide di ActRIIB maturo. Ad esempio, forme tronche di ActRIIB includono polipeptidi con amminoacidi 20-119; 20-128; 20-129; 20-130; 20-131; 20-132; 20-133; 20-134; 20-131; 21-131; 22-131; 23-131; 24-131; e 25-131, in cui le posizioni

amminoacidiche si riferiscono alle posizioni amminoacidiche in SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14.

[0078] Forme tronche di ActRIIB esemplificative aggiuntive includono (i) polipeptidi che iniziano in corrispondenza di amminoacidi tra qualsiasi degli amminoacidi 21-29 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 (facoltativamente che iniziano a 22-25 di SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO:14) e che terminano in corrispondenza di qualsiasi degli amminoacidi 109-134 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14; (ii) polipeptidi che iniziano in corrispondenza di qualsiasi degli amminoacidi 20-29 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 (facoltativamente che iniziano in corrispondenza di 22-25 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14) e che terminano in corrispondenza di qualsiasi degli amminoacidi 109-133 di SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO:14; (iii) polipeptidi che iniziano in corrispondenza di qualsiasi degli amminoacidi 20-24 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 (facoltativamente che iniziano in corrispondenza di 22-25 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14) e che terminano in corrispondenza di qualsiasi degli amminoacidi 109-133 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14; (iv) polipeptidi che iniziano in corrispondenza di qualsiasi degli amminoacidi 21-24 di SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO:14 e che terminano in corrispondenza di qualsiasi degli amminoacidi 109-134 di SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO:14; (v) polipeptidi che iniziano in corrispondenza di qualsiasi degli amminoacidi 20-24 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 e che terminano in corrispondenza di qualsiasi degli amminoacidi 118-133 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14; (vi) polipeptidi che iniziano in corrispondenza di qualsiasi degli amminoacidi 21-24 di SEQ ID NO:3

o SEQ ID NO:14 e che terminano in corrispondenza di qualsiasi degli amminoacidi 118-134 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14; (vii) polipeptidi che iniziano in corrispondenza di qualsiasi degli amminoacidi 20-24 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 e che terminano in corrispondenza di qualsiasi degli amminoacidi 128-133 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14; (viii) polipeptidi che iniziano in corrispondenza di qualsiasi degli amminoacidi 20-24 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 e che terminano in corrispondenza di qualsiasi degli amminoacidi 128-133 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14, (ix) polipeptidi che iniziano in corrispondenza di qualsiasi degli amminoacidi 21-29 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 e che terminano in corrispondenza di qualsiasi degli amminoacidi 118-134 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14; (x) polipeptidi che iniziano in corrispondenza di qualsiasi degli amminoacidi 20-29 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 e che terminano in corrispondenza di qualsiasi degli amminoacidi 118-133 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14; (xi) polipeptidi che iniziano in corrispondenza di qualsiasi degli amminoacidi 21-29 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 e che terminano in corrispondenza di qualsiasi degli amminoacidi 128-134 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14; e (xii) polipeptidi che iniziano in corrispondenza di qualsiasi degli amminoacidi 20-29 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 e che terminano in corrispondenza di qualsiasi degli amminoacidi 128-133 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14. In un caso specifico, un polipeptide di ActRIIB comprende, consiste essenzialmente in, o consiste in, una sequenza amminoacidica che inizia nella posizione amminoacidica 25 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 e termina nella posizione amminoacidica 131 di SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO:14. In un altro caso specifico, un polipeptide di

ActRIIB consiste, o consiste essenzialmente, nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:4, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, o 33.

[0079] Qualsiasi polipeptide di ActRIIB usato nelle composizioni e nei metodi descritti nella presente può essere prodotto come omodimero. Qualsiasi polipeptide di ActRIIB usato nelle composizioni e nei metodi descritti nella presente può essere formulato come una proteina di fusione avente una porzione eterologa che comprende una regione costante da una catena pesante di IgG, come un dominio Fc. Qualsiasi dei polipeptidi di ActRIIB usati nelle composizioni e nei metodi descritti nella presente può comprendere un amminoacido nella posizione corrispondente alla posizione 79 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14, facoltativamente in combinazione con una o più sostituzioni, delezioni o inserzioni amminoacidiche aggiuntive relative a SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14.

[0080] In casi specifici, gli inibitori di segnalazione di ActRIIB usati nelle composizioni e nei metodi descritti nella presente comprendono un dominio extracellulare di ActRIIB con una o più sostituzioni/mutazioni amminoacidiche. Tale sostituzione/mutazione di amminoacidi può essere, ad esempio, uno scambio dalla leucina nella posizione amminoacidica 79 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 a un amminoacido, come acido aspartico o acido glutammico. Ad esempio, posizione L79 di SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO:14 può essere alterata in polipeptidi di dominio extracellulare di ActRIIB per conferire proprietà di legame alterate ad attivina-miostatina (GDF-11). Le mutazioni L79A e L79P

riducono il legame a GDF-11 in misura maggiore rispetto al legame ad attivina. Le mutazioni L79E e L79D conservano il legame a GDF-11, mentre dimostrano un legame ad attivina notevolmente ridotto.

[0081] In certi casi, gli inibitori di segnalazione di ActRIIB usati nelle composizioni e nei metodi descritti nella presente comprendono una forma tronca di un dominio extracellulare di ActRIIB che porta anche una sostituzione amminoacidica, ad esempio uno scambio dalla leucina nella posizione amminoacidica 79 di o SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO:14 ad un amminoacido acido, come acido aspartico o acido glutammico. Secondo le rivendicazioni, la forma tronca di un dominio extracellulare di polipeptide di ActRIIB che porta anche una sostituzione amminoacidica usata nelle composizioni e nei metodi descritti nella presente è SEQ ID NO:9. Forme di ActRIIB che sono tronche e/o portano una o più sostituzioni amminoacidiche possono essere collegate a un dominio Fc di un anticorpo come discusso sopra.

[0082] Frammenti funzionalmente attivi di polipeptidi di ActRIIB possono essere ottenuti, ad esempio, mediante screening di polipeptidi prodotti in modo ricombinante dal frammento corrispondente dell'acido nucleico codificante un polipeptide di ActRIIB. In aggiunta, frammenti possono essere sintetizzati chimicamente usando tecniche note nell'arte come la convenzionale chimica Merrifield in fase solida f-Moc o t-Boc. I frammenti possono essere prodotti (in modo ricombinante o mediante sintesi chimica) e testati per identificare quei

frammenti peptidilici che possono funzionare come antagonisti (inibitori) di proteina ActRIIB o di segnalazione mediata da attivina.

[0083] In aggiunta, varianti funzionalmente attive di polipeptidi di ActRIIB possono essere ottenute, ad esempio, mediante screening di librerie di polipeptidi modificati prodotti in modo ricombinante dai corrispondenti acidi nucleici mutagenizzati codificanti un polipeptide di ActRIIB. Le varianti possono essere prodotte e testate per identificare quelle che possono funzionare come antagonisti (inibitori) di proteina ActRIIB o di segnalazione mediata da attivina. In certi casi, una variante funzionale dei polipeptidi di ActRIIB comprende una sequenza amminoacidica che è almeno al 75% identica a una sequenza amminoacidica selezionata tra SEQ ID NO:4, 5, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28, e 29. In certi casi, la variante funzionale ha una sequenza amminoacidica almeno all'80%, all'85%, al 90%, al 95%, al 96%, al 97%, al 98% o al 99% identica a una sequenza amminoacidica selezionata tra SEQ ID NO:4, 5, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28, e 29.

[0084] Varianti funzionali possono essere generate, ad esempio, modificando la struttura di un polipeptide di ActRIIB per finalità quali potenziare l'efficacia terapeutica o la stabilità (ad esempio durata di conservazione ex vivo e resistenza alla degradazione proteolitica in vivo). Tali polipeptidi di ActRIIB modificati, quando selezionati per conservare il legame ad attivina, sono considerati equivalenti funzionali dei polipeptidi di ActRIIB presenti in natura. Polipeptidi di ActRIIB modificati possono anche essere prodotti, ad esempio,

mediante sostituzione, delezione o addizione amminoacidica. Ad esempio, è ragionevole aspettarsi che un rimpiazzo isolato di una leucina con una isoleucina o una valina, di un aspartato con un glutammato, di una treonina con una serina, o un rimpiazzo simile di un amminoacido con un amminoacido strutturalmente correlato (ad esempio mutazioni conservative), non avrà un effetto importante sull'attività biologica della molecola risultante. Rimpiazzi conservativi sono quelli che avvengono all'interno di una famiglia di amminoacidi che sono correlati nelle loro catene laterali. Se un cambiamento nella sequenza amminoacidica di un polipeptide di ActRIIB risulta in un omologo funzionale può essere facilmente determinato giudicando la capacità del polipeptide di ActRIIB variante di produrre una risposta nelle cellule in modo simile al polipeptide di ActRIIB di tipo selvatico.

[0085] Mutanti del polipeptide di ActRIIB, particolarmente insieme di mutanti combinatoriali di un polipeptide di ActRIIB, nonché mutanti di troncamento, pool di mutanti combinatoriali, sono specialmente utili per identificare sequenze di varianti funzionali che possono essere usate nei metodi e nelle composizioni descritti nella presente. La finalità dello screening di tali librerie combinatoriali può essere quello di generare, ad esempio, varianti di polipeptide di ActRIIB che possano agire come agonisti o antagonisti o, in alternativa, che possiedano tutte insieme nuove attività.

[0086] È stato dimostrato che la tasca di legame a ligando di ActRIIB è definita dai residui Y31, N33, N35, L38 fino a T41, E47, E50, Q53 a K55, L57, H58,

Y60, S62, K74, W78 fino a N83, Y85, R87, A92, e E94 fino a F101 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO: 14. In queste posizioni, ci si aspetta che mutazioni conservative siano tollerate, sebbene una mutazione K74A sia ben tollerata, così come R40A, K55A, F82A e mutazioni in posizione L79. R40 è una K in *Xenopus*, indicando che gli amminoacidi basici in questa posizione saranno tollerati. Q53 è R in ActRIIB bovino e K in ActRIIB di *Xenopus*, e, pertanto, amminoacidi che includono R, K, Q, N e H saranno tollerati in questa posizione. Perciò, una formula generale per un polipeptide di ActRIIB per uso nei metodi e nelle composizioni descritti nella presente è quella che comprende gli amminoacidi 29-109 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO: 14, ma che, facoltativamente, inizia da una posizione amminoacidica variabile tra 20-24 o 22-25 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO: 14 e termina in una posizione amminoacidica variabile tra 129-134 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14, e che comprende non più di 1, 2, 5 o 15 cambiamento/i amminoacidico/i conservativo/i nella tasca di legame a ligando, e zero, una o più alterazione/i non conservativa/e nelle posizioni amminoacidiche 40, 53, 55, 74, 79 e/o 82 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 nella tasca di legame a ligando. Tale polipeptide di ActRIIB può conservare un'identità di sequenza o un'omologia di sequenza maggiore di 80%, 90%, 95% o 99% rispetto alla sequenza di amminoacidi 29-109 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14. Siti al di fuori della tasca di legame, in cui la variabilità può essere particolarmente ben tollerata, includono i terminali amminici e carbossilici del dominio extracellulare di ActRIIB, e le posizioni 42-46 e 65-73. Un'alterazione da asparagina ad alanina nella posizione 65 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 (N65A) migliora effettivamente il legame a ligando

nello sfondo A64, e perciò non ci si aspetta che abbia alcun effetto dannoso sul legame a ligando nello sfondo R64. Questo cambiamento probabilmente elimina la glicosilazione in N65 nello sfondo A64, dimostrando perciò che è probabile che sia tollerato un cambiamento significativo in questa regione. Mentre un cambiamento R64A è scarsamente tollerato, R64K è ben tollerato, e perciò un altro residuo basico, come H, può essere tollerato nella posizione 64.

[0087] Come esempio specifico di un polipeptide di ActRIIB con una mutazione nel dominio di legame a ligando, il residuo amminoacidico carico positivamente Asp (D80) del dominio di legame a ligando di ActRIIB può essere mutato in un differente residuo amminoacidico in modo che il polipeptide di ActRIIB variante si leghi preferenzialmente a GDF8, ma non ad attivina. In un caso specifico, il residuo D80 viene cambiato in un residuo amminoacidico selezionato dal gruppo consistente in: un residuo amminoacidico non carico, un residuo amminoacidico negativo, e un residuo amminoacidico idrofobo. Come ulteriore esempio specifico, il residuo idrofobo L79 può essere alterato negli amminoacidi acidi acido aspartico o acido glutammico per ridurre notevolmente il legame ad attivina pur conservando il legame a GDF11. Come sarà riconosciuto da un tecnico del ramo, la maggior parte delle mutazioni, delle varianti o delle modifiche descritte può essere realizzata a livello di acido nucleico o, in alcuni casi, mediante modifica post-traduzionale o sintesi chimica. Tali tecniche sono ben note nell'arte.

[0088] In casi specifici, gli inibitori di segnalazione di ActRIIB usati nelle composizioni e nei metodi descritti nella presente comprendono una proteina coniugata/di fusione comprendente un dominio extracellulare (ad esempio, un dominio di legame ad attivina) di un recettore ActRIIB collegato a una porzione Fc di un anticorpo. Tali coniugati/proteine di fusione possono comprendere qualsiasi dei polipeptidi di ActRIIB divulgati nella presente (ad esempio qualsiasi di SEQ ID NO: 17, 18, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33), qualsiasi polipeptide di ActRIIB noto nell'arte, o qualsiasi polipeptide di ActRIIB generato usando metodi noti nell'arte e/o forniti nella presente.

[0089] In certi casi, il dominio extracellulare è collegato a una porzione Fc di un anticorpo tramite un linker, ad esempio un linker peptidico. Linker esemplificativi includono brevi sequenze polipeptidiche come 2-10, 2-5, 2-4, 2-3 residui amminoacidici (ad esempio residui di glicina), come, ad esempio, un linker Gly-Gly-Gly. In un caso specifico, il linker comprende la sequenza amminoacidica Gly-Gly-Gly (GGG). In un altro caso specifico, il linker comprende la sequenza amminoacidica Thr-Gly-Gly-Gly (TGGG). Facoltativamente, il dominio Fc ha una o più mutazioni in residui come Asp-265, lisina 322, e Asn-434. In certi casi, il dominio Fc mutante avente una o più di queste mutazioni (ad esempio una mutazione Asp-265) ha una ridotta capacità di legarsi al recettore Fc γ rispetto a un dominio Fc di tipo selvatico. In altri casi, il dominio Fc mutante avente una o più di queste mutazioni (ad esempio una mutazione Asn-434) ha una aumentata capacità di legarsi al recettore Fc (FcRN) correlato all'MHC di classe I rispetto a un dominio Fc di tipo selvatico. Proteine di fusione esemplificative

comprendenti un dominio extracellulare solubile di ActRIIB fuso con un dominio Fc sono espresse in SEQ ID NO:20, 21, 24, 25, o 34.

[0090] In un caso specifico, gli inibitori di segnalazione di ActRIIB usati nelle composizioni e nei metodi descritti nella presente comprendono il dominio extracellulare di ActRIIB, o una sua porzione, collegato a una porzione Fc di un anticorpo, in cui detto inibitore di segnalazione di ActRIIB comprende una sequenza amminoacidica che è almeno al 75% identica a una sequenza amminoacidica selezionata tra SEQ ID NO:20, 21, 24, 25, 34. In un altro caso specifico, gli inibitori di segnalazione di ActRIIB usati nelle composizioni e nei metodi descritti nella presente comprendono il dominio extracellulare di ActRIIB, o una sua porzione, collegato a una porzione Fc di un anticorpo, in cui detto inibitore di segnalazione di ActRIIB comprende una sequenza amminoacidica che è almeno all'80%, all'85%, al 90%, al 95%, al 96%, al 97%, al 98% o al 99% identica a una sequenza amminoacidica selezionata tra SEQ ID NO: 20, 21, 24, 25, e 34.

[0091] In un caso specifico, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB da usarsi nelle composizioni e nei metodi descritti nella presente è una proteina di fusione tra il dominio extracellulare del recettore ActRIIB umano e la porzione Fc di IgG1. In un altro caso specifico, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB da usarsi nelle composizioni e nei metodi descritti nella presente è una proteina di fusione tra un dominio extracellulare tronco del recettore ActRIIB umano e la porzione Fc di IgG1. In un altro caso specifico, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB da usarsi

nelle composizioni e nei metodi descritti nella presente è una proteina di fusione tra un dominio extracellulare tronco del recettore ActRIIB umano e la porzione Fc di IgG1, in cui il dominio extracellulare tronco del recettore ActRIIB umano possiede una sostituzione amminoacidica nella posizione amminoacidica corrispondente all'amminoacido 79 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14. In una forma di realizzazione, la sostituzione amminoacidica nella posizione amminoacidica corrispondente all'amminoacido 79 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 è sostituzione di leucina con acido aspartico (ossia una mutazione L79D).

[0092] In una forma di realizzazione specifica, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB da usarsi nelle composizioni e nei metodi descritti nella presente è SEQ ID NO:10 o 11, che rappresenta una proteina di fusione tra il dominio extracellulare del recettore di ActRIIB umano e la porzione Fc di IgG1, in cui detto dominio extracellulare di ActRIIB comprende gli amminoacidi 25-131 di SEQ ID NO:14 con una mutazione L79D. La sequenza di acido nucleico codificante la proteina di fusione ActRIIB-Fc di SEQ ID NO:10 è presentata in SEQ ID NO:31.

[0093] In un altro caso specifico, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB da usarsi nelle composizioni e nei metodi descritti nella presente è SEQ ID NO:20 o 21, che rappresenta una proteina di fusione tra il dominio extracellulare del recettore di ActRIIB umano e la porzione Fc di IgG1, in cui detto dominio

extracellulare di ActRIIB comprende gli amminoacidi 25-131 di SEQ ID NO:3 con una mutazione L79D.

[0094] I siti di riconoscimento di glicosilazione collegati ad asparagina generalmente comprendono una sequenza tripeptidica, asparagina-X-treonina (o asparagina-X-serina) (dove "X" è qualsiasi amminoacido) che è specificatamente riconosciuta da opportuni enzimi di glicosilazione cellulare. L'alterazione può anche essere realizzata mediante l'aggiunta o la sostituzione di uno o più residui di serina o treonina nella sequenza del polipeptide di ActRIIB di tipo selvatico (per siti di glicosilazione O-collegati). Una varietà di sostituzioni o delezioni amminoacidiche in una o entrambe tra le posizioni amminoacidiche prima e terza di un sito di riconoscimento di glicosilazione (e/o delezioni amminoacidiche nella seconda posizione) risultano in non glicosilazione nella sequenza tripeptidica modificata. Un altro mezzo per aumentare il numero di porzioni funzionali carboidrato su un polipeptide di ActRIIB è mediante accoppiamento chimico o enzimatico di glicosidi al polipeptide di ActRIIB. A seconda della modalità di accoppiamento usata, lo/gli zucchero/i può/possono essere attaccato/i a (a) arginina e istidina; (b) gruppi carbossile liberi; (c) gruppi solfidrile liberi come quelli della cisteina; (d) gruppi idrossile liberi come quelli di serina, treonina o idrossiprolina; (e) residui aromatici come quelli di fenilalanina, tirosina o triptofano; o (f) il gruppo ammidico di glutammina. Questi metodi sono descritti nella domanda di brevetto internazionale WO 87/05330 pubblicata l'11 settembre 1987 e in Aplin e Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pagine 259-306. La rimozione di una o più

porzioni funzionali carboidrato presenti su un polipeptide di ActRIIB può essere assolta chimicamente e/o enzimaticamente. La deglicosilazione chimica può comportare, ad esempio, l'esposizione del polipeptide di ActRIIB al composto acido trifluorometansolfonico, o un composto equivalente. Questo trattamento risulta nel clivaggio della maggior parte degli, o di tutti gli, zuccheri tranne lo zucchero di collegamento (N-acetilglucosamina o N-acetilgalattosamina), lasciando intatta la sequenza amminoacidica. La deglicosilazione chimica è ulteriormente descritta da Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 e da Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131. Il clivaggio enzimatico di porzioni funzionali carboidrato su polipeptidi di ActRIIB può essere conseguito mediante l'uso di una varietà di endo- ed eso-glicosidasi come descritto da Thotakura et al. (1987) Met. Enzymol. 138:350. La sequenza di un polipeptide di ActRIIB può essere conseguente, a seconda dei casi, al tipo di sistema di espressione usato, poiché le cellule di mammiferi, lieviti, insetti e piante possono tutte introdurre pattern di glicosilazione differenti che possono essere influenzati dalla sequenza amminoacidica del peptide. In generale, proteine ActRIIB per uso negli esseri umani saranno espresse in una linea cellulare di mammifero che fornisce una glicosilazione adeguata, come linee cellulari HEK293 o CHO, sebbene ci si aspetti che anche altri sistemi di espressione, come altre linee cellulari di espressione di mammifero, linee cellulari di lievito con enzimi di glicosilazione ingegnerizzati, e anche cellule di insetto, siano utili.

[0095] In casi specifici, polipeptidi di ActRIIB mutati comprendenti l'aggiunta di un ulteriore sito di glicosilazione N-collegato (N-X-S/T) che aumenta l'emivita sierica di una proteina di fusione ActRIIB-Fc, rispetto alla forma ActRIIB(R64)-Fc, possono essere usati nei metodi e nelle composizioni descritti nella presente. In un caso specifico, l'introduzione di un'asparagina nella posizione 24 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14 (A24N) risulta nella creazione di una sequenza NXT che conferisce un'emivita più lunga. Altre sequenze NX(T/S) possono essere trovate in 42-44 (NQS) e 65-67 (NSS), sebbene quest'ultima potrebbe non essere glicosilata in modo efficiente con R nella posizione 64 (ossia in polipeptidi R64). Sequenze N-X-S/T possono essere generalmente introdotte in posizioni al di fuori della tasca di legame a ligando di ActRIIB, il che è descritto in dettaglio sopra. Siti particolarmente adatti per l'introduzione di sequenze N-X-S/T non endogene includono gli amminoacidi 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 o 129-134 di SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO: 14. Sequenze N-X-S/T possono anche essere introdotte nel linker tra la sequenza di ActRIIB e l'Fc o altro componente di fusione. Tale sito può essere introdotto con il minimo sforzo introducendo N nella posizione corretta rispetto a S o T preesistente, oppure introducendo S o T in una posizione corrispondente a N preesistente. Perciò, alterazioni desiderabili che creerebbero un sito di glicosilazione N-collegato sono: A24N, R64N, S67N (verosimilmente combinati con una alterazione N65A), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S e R112T (con tutte le posizioni amminoacidiche corrispondenti alle posizioni in cui si trovano in SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:14). Qualsiasi S che si prevede sia glicosilata può essere alterata in una T senza creare un sito

immunogeno, a causa della protezione offerta dalla glicosilazione. Allo stesso modo, qualsiasi T che si prevede sia glicosilata può essere alterata in una S. Perciò, le alterazioni S67T e S44T sono racchiuse nella presente. Allo stesso modo, in una variante A24N, può essere usata una alterazione S26T. Di conseguenza, un polipeptide di ActRIIB può includere una o più sequenze consenso di glicosilazione N-collegate aggiuntive non endogene.

[0096] Può essere usata una varietà di saggi di screening per valutare varianti di polipeptide di ActRIIB. Ad esempio, una variante di polipeptide di ActRIIB può essere sottoposta a screening per la capacità di legarsi a un ligando di ActRIIB, per impedire il legame di un ligando di ActRIIB a un polipeptide di ActRIIB o per interferire con la segnalazione causata da un ligando di ActRIIB. L'attività di un polipeptide di ActRIIB o sue varianti può anche essere testata in un saggio basato su cellule o in vivo.

[0097] Possono essere generate varianti derivate in modo combinatoriale che hanno una potenza selettiva o generalmente aumentata rispetto a un polipeptide di ActRIIB presente in natura. Allo stesso modo, una mutagenesi può dare origine a varianti che hanno emivite intracellulari notevolmente differenti dal corrispondente polipeptide di ActRIIB di tipo selvatico. Ad esempio, la proteina alterata può essere resa più stabile o meno stabile alla degradazione proteolitica o ad altri processi cellulari che risultano in distruzione, o altrimenti inattivazione, di un polipeptide di ActRIIB nativo. Tali varianti, e i geni che le codificano, possono essere utilizzati per alterare i livelli

di polipeptidi di ActRIIB modulando l'emivita dei polipeptidi di ActRIIB. Ad esempio, una breve emivita può dare origine a effetti biologici più transitori e può consentire un controllo più stretto dei livelli di polipeptide di ActRIIB ricombinante all'interno del soggetto. In una proteina di fusione di Fc, possono essere apportate mutazioni nel linker (se presente) e/o nella porzione Fc per alterare l'emivita della proteina.

[0098] Una libreria combinatoriale può essere prodotta mediante una libreria degenerata di geni codificanti una libreria di polipeptidi che includono ciascuno almeno una porzione di potenziali sequenze di polipeptide di ActRIIB. Ad esempio, una miscela di oligonucleotidi sintetici può essere ligata enzimaticamente in sequenze geniche in modo tale che l'insieme degenerato di potenziali sequenze nucleotidiche di polipeptide di ActRIIB sia esprimibile come polipeptidi individuali, in alternativa, come insieme di proteine di fusione più grandi (ad esempio per esposizione su fagi).

[0099] Vi sono molti modi in cui la libreria di potenziali omologhi può essere generata da una sequenza oligonucleotidica degenerata. La sintesi chimica di una sequenza genica degenerata può essere effettuata in un sintetizzatore automatico di DNA e i geni sintetici possono poi essere ligati in un vettore appropriato per l'espressione. La sintesi di oligonucleotidi degenerati è ben nota nell'arte (si vedano, ad esempio, Narang, S A (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al., (1981) *Recombinant DNA, Proc. 3° Cleveland Sympos. Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pagine 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). Tali tecniche sono state impiegate nell'evoluzione diretta di altre proteine (si vedano, esempio, 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; nonché il brevetto statunitense n. 5,223,409, 5,198,346, e 5,096,815).

[0100] In alternativa, altre forme di mutagenesi possono essere utilizzate per generare una libreria combinatoriale. Ad esempio, varianti di polipeptide di ActRIIB possono essere generate e isolate da una libreria mediante screening usando, ad esempio, mutagenesi a scansione di alanina e simili (Ruf et al., (1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang et al., (1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balint et al., (1993) *Gene* 137:109-118; Grodberg et al., (1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashima et al., (1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892; Lowman et al., (1991) *Biochemistry* 30:10832-10838; e Cunningham et al., (1989) *Science* 244:1081-1085), mediante mutagenesi a scansione di linker (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 mutagenesi di saturazione (Meyers et al., (1986) *Science* 232:613); mediante mutagenesi PCR (Leung et al., (1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19); o mediante mutagenesi casuale, inclusa la mutagenesi chimica, eccetera (Miller et al., (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; e Greener et al., (1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34). La

mutagenesi a scansione di linker, particolarmente in un contesto combinatoriale, è un metodo interessante per identificare forme tronche (bioattive) di polipeptidi di ActRIIB.

[0101] Nell'arte è nota un'ampia gamma di tecniche per lo screening di prodotti genici di librerie combinatoriali costituite da mutazioni puntiformi e troncamenti e, del resto, per lo screening di librerie di cDNA per prodotti genici aventi una certa proprietà. Tali tecniche saranno generalmente adattabili per un rapido screening delle librerie geniche generate mediante la mutagenesi combinatoriale di polipeptidi di ActRIIB. Le tecniche più ampiamente usate per lo screening di grandi librerie di geni comprendono tipicamente clonare la libreria di geni in vettori di espressione replicabili, trasformare cellule appropriate con la risultante libreria di vettori, ed esprimere i geni combinatoriali in condizioni in cui il rilevamento di un'attività desiderata facilita l'isolamento relativamente facile del vettore codificante il gene il cui prodotto è stato rilevato. Saggi preferiti includono saggi di legame di attivina e saggi di segnalazione cellulare mediata da attivina.

[0102] In certe forme di realizzazione, i polipeptidi di ActRIIB usati nei metodi e delle composizioni descritti nella presente possono comprendere inoltre modifiche post-traduzionali a quelle naturalmente presenti nei polipeptidi di ActRIIB. Tali modifiche includono, ma senza limitarvisi, acetilazione, carbossilazione, glicosilazione, fosforilazione, lipidazione, e acilazione. Conseguentemente, i polipeptidi di ActRIIB modificati possono contenere

elementi non amminoacidici, come glicoli di polietilene, lipidi, polisaccaridi o monosaccaridi, e fosfati. Gli effetti di tali elementi non amminoacidici sulla funzionalità di un polipeptide di ActRIIB possono essere testati mediante qualsiasi metodo noto al tecnico del ramo. Quando un polipeptide di ActRIIB viene prodotto in cellule clivando una forma nascente del polipeptide di ActRIIB, anche l'elaborazione post-traduzionale può essere importante per il corretto ripiegamento e/o la corretta funzione della proteina. Cellule differenti (come CHO, HeLa, MDCK, 293, W138, NIH-3T3 o HEK293) hanno un macchinario cellulare specifico e meccanismi caratteristici per tali attività post-traduzionali e possono essere scelte per garantire la modifica e l'elaborazione corrette dei polipeptidi di ActRIIB.

[0103] In certi aspetti, varianti funzionali o forme modificate dei polipeptidi di ActRIIB includono proteine di fusione aventi almeno una porzione dei polipeptidi di ActRIIB e uno o più domini di fusione. Esempi ben noti di tali domini di fusione includono, ma senza limitarvisi, poliistidina, Glu-Glu, glutatione S transferasi (GST), tioredossina, proteina A, proteina G, una regione costante di catena pesante di immunoglobulina (Fc), proteina legante il maltosio (MBP), o albumina sierica umana. Un dominio di fusione può essere selezionato in modo da conferire una proprietà desiderata. Ad esempio, alcuni domini di fusione sono particolarmente utili per isolamento delle proteine di fusione mediante cromatografia di affinità. Per finalità di purificazione per affinità, vengono usate matrici pertinenti per cromatografia di affinità, come resine coniugate a glutatione, amilasi e nichel o cobalto. Molte di queste matrici

sono disponibili in forma di "kit", come il sistema di purificazione Pharmacia GST e il sistema QIAexpress™ (Qiagen) utile con partner di fusione (HIS6). Come altro esempio, un dominio di fusione può essere selezionato in modo da facilitare il rilevamento dei polipeptidi di ActRIIB. Esempi di tali domini di rilevamento includono le varie proteine fluorescenti (ad esempio GFP) nonché "tag epitopo", che di solito sono brevi sequenze peptidiche per le quali è disponibile un anticorpo specifico. Tag epitopo ben noti per i quali sono prontamente disponibili anticorpi monoclonali specifici includono FLAG, emoagglutinina di influenzavirus (HA) e tag c-myc. In alcuni casi, i domini di fusione hanno un sito di clivaggio di proteasi, come per Fattore Xa o trombina, che consente alla proteasi pertinente di digerire parzialmente le proteine di fusione e di liberare così da esse le proteine ricombinanti. Le proteine liberate possono poi essere isolate dal dominio di fusione mediante successiva separazione cromatografica. In certi casi, un polipeptide di ActRIIB è fuso con un dominio che stabilizza il polipeptide di ActRIIB in vivo (un dominio "stabilizzatore"). Per "stabilizzante" si intende tutto ciò che aumenta l'emivita sierica, indipendentemente dal fatto che ciò sia dovuto a distruzione diminuita, a clearance diminuita da parte del rene, o ad altri effetti farmacocinetici. È noto che fusioni con la porzione Fc di un'immunoglobulina conferiscono proprietà farmacocinetiche desiderabili a un'ampia gamma di proteine. Allo stesso modo, fusioni con albumina sierica umana possono conferire proprietà desiderabili. Altri tipi di domini di fusione che possono essere selezionati includono domini di multimerizzazione (ad esempio dimerizzazione, tetramerizzazione) e domini funzionali (che conferiscono una funzione biologica aggiuntiva, come

un'ulteriore stimolazione della crescita ossea o della crescita muscolare, come desiderato).

[0104] Resta inteso che differenti elementi delle proteine di fusione possono essere disposti in qualsiasi modo coerente con la funzionalità desiderata. Ad esempio, un polipeptide di ActRIIB può essere posto in modo C-terminale rispetto a un dominio eterologo o, in alternativa, un dominio eterologo può essere posto in modo C-terminale rispetto a un polipeptide di ActRIIB. Non è necessario che il dominio di polipeptide di ActRIIB e il dominio eterologo siano adiacenti in una proteina di fusione, e domini o sequenze amminoacidiche aggiuntivi possono essere inclusi in modo C- o N-terminale in entrambi i domini o tra i domini.

[0105] In certi casi, i polipeptidi di ActRIIB usati nei metodi e delle composizioni descritti nella presente contengono una o più modifiche che sono in grado di stabilizzare i polipeptidi di ActRIIB. Ad esempio, tali modifiche potenziano l'emivita in vitro dei polipeptidi di ActRIIB, potenziano l'emivita in circolo dei polipeptidi di ActRIIB o riducono la degradazione proteolitica dei polipeptidi di ActRIIB. Tali modifiche stabilizzanti includono, ma senza limitarsi, proteine di fusione (incluse, ad esempio, proteine di fusione comprendenti un polipeptide di ActRIIB e un dominio stabilizzatore), modifiche di un sito di glicosilazione (inclusa, ad esempio, aggiunta di un sito di glicosilazione a un polipeptide di ActRIIB) e modifiche di porzione funzionale carboidrato (inclusa, ad esempio, rimozione di porzioni funzionali carboidrato da un polipeptide di ActRIIB). Nel

caso di proteine di fusione, un polipeptide di ActRIIB è fuso con un dominio stabilizzatore come una molecola di IgG (ad esempio un dominio Fc). Secondo l'uso fattone nella presente, il termine "dominio stabilizzatore" non si riferisce solo a un dominio di fusione (ad esempio Fc) come nel caso di proteine di fusione, ma include anche modifiche non proteiche come una porzione funzionale carboidrato, o un polimero non proteico, come glicole di polietilene.

[0106] In certi casi, i metodi e le composizioni descritti nella presente usano polipeptidi di ActRIIB isolati o purificati; ossia, polipeptidi di ActRIIB che sono isolati da, o altrimenti sostanzialmente privi di, altre proteine possono essere usati con i metodi e le composizioni descritti nella presente. Polipeptidi di ActRIIB saranno generalmente prodotti mediante espressione da acidi nucleici ricombinanti.

[0107] In certi aspetti, i polipeptidi di ActRIIB usati nei metodi e nelle composizioni descritti nella presente sono codificati da acidi nucleici isolati e/o ricombinanti, inclusi frammenti, varianti funzionali e proteine di fusione divulgati nella presente. Ad esempio, SEQ ID NO:6 codifica il polipeptide precursore di ActRIIB umano presente in natura. Gli acidi nucleici in oggetto possono essere a singolo filamento o a doppio filamento. Tali acidi nucleici possono essere molecole di DNA o RNA. Questi acidi nucleici possono essere usati, ad esempio, in metodi per realizzare polipeptidi di ActRIIB o come agenti terapeutici diretti (ad esempio in un approccio di terapia genica).

[0108] In certi aspetti, è inoltre da intendersi che gli acidi nucleici che possono essere usati per produrre polipeptidi di ActRIIB adatti per uso nei metodi e nelle composizioni descritti nella presente includono acidi nucleici che sono varianti di SEQ ID NO:6, così come varianti di quelle sequenze di acido nucleico che codificano polipeptidi di ActRIIB solubile (ad esempio acidi nucleici che codificano SEQ ID NO: 4, 5, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28, e 29). Sequenze nucleotidiche varianti includono sequenze che differiscono per una o più sostituzioni, aggiunte o delezioni nucleotidiche, come le varianti alleliche.

[0109] In certi casi, le sequenze di acido nucleico isolato o ricombinante che possono essere usate per produrre polipeptidi di ActRIIB adatti per uso nei metodi e nelle composizioni descritti nella presente sono almeno all'80%, all'85%, al 90%, al 95%, al 97%, al 98%, al 99% o al 100% identiche a SEQ ID NO:6 o a quelle sequenze di acido nucleico che codificano polipeptidi di ActRIIB solubile (ad esempio acidi nucleici che codificano SEQ ID NO: 4, 5, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28, e 29). Un tecnico del ramo apprezzerà che sequenze di acido nucleico complementari a SEQ ID NO:6 o quelle sequenze di acido nucleico che codificano polipeptidi di ActRIIB solubile (ad esempio gli acidi nucleici che codificano SEQ ID NO: 4, 5, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28 e 29) e varianti di SEQ ID NO:6 o quelle sequenze di acido nucleico che codificano polipeptidi di ActRIIB solubile (ad esempio acidi nucleici che codificano SEQ ID NO: 4, 5, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28 e 29) possono essere usate con i metodi e le composizioni descritti nella presente. In ulteriori forme di realizzazione, le sequenze di acido nucleico possono essere

isolate, ricombinanti, e/o fuse con una sequenza nucleotidica eterologa, o in una libreria di DNA.

[0110] In altri esempi, acidi nucleici che possono essere usati per produrre polipeptidi di ActRIIB adatti per uso nei metodi e nelle composizioni descritti nella presente includono sequenze nucleotidiche che si ibridano in condizioni altamente stringenti alla sequenza nucleotidica designata in SEQ ID NO:6 o quelle sequenze di acido nucleico che codificano polipeptidi di ActRIIB solubile (ad esempio acidi nucleici che codificano SEQ ID NO: 4, 5, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28 e 29), sequenza complementare di SEQ ID NO:6 o quelle sequenze di acido nucleico che codificano polipeptidi di ActRIIB solubile (ad esempio acidi nucleici che codificano SEQ ID NO: 4, 5, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28 e 29), o loro frammenti. Un tecnico del ramo di ordinarie competenze comprenderà che condizioni di stringenza appropriate che promuovono l'ibridazione di DNA possono essere variate. Ad esempio, si può eseguire l'ibridazione a 6,0 volte cloruro di sodio/citrato di sodio (SSC) a circa 45 °C cui fa seguito un lavaggio di 2,0 volte SSC a 50 °C. Ad esempio, la concentrazione di sale nel passaggio di lavaggio può essere selezionata da una bassa stringenza di circa 2,0 volte SSC a 50 °C a un'alta stringenza di circa 0,2 volte SSC a 50 °C. In aggiunta, la temperatura nel passaggio di lavaggio può essere aumentata da condizioni di bassa stringenza a temperatura ambiente, circa 22 °C, a condizioni di alta stringenza a circa 65 °C. Sia la temperatura che il sale possono essere variati, oppure la temperatura o la concentrazione di sale può essere tenuta costante mentre l'altra variabile viene

cambiata. In una forma di realizzazione, acidi nucleici che si ibridano in condizioni di bassa stringenza di 6 volte SSC a temperatura ambiente, cui fa seguito un lavaggio a 2 volte SSC a temperatura ambiente, possono essere usati con i metodi e le composizioni descritti nella presente.

[0111] Possono anche essere usati acidi nucleici isolati che differiscono dagli acidi nucleici come esposti in SEQ ID NO:6 o quelle sequenze di acido nucleico che codificano polipeptidi di ActRIIB solubile (ad esempio acidi nucleici che codificano SEQ ID NO: 4, 5, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28 e 29) a causa della degenerazione del codice genetico possono anche essere usati per produrre polipeptidi di ActRIIB adatti per uso nei metodi e nelle composizioni descritti nella presente. Ad esempio, diversi amminoacidi sono designati da più di una tripletta. Codoni che specificano lo stesso amminoacido, o sinonimi (ad esempio, CAU e CAC sono sinonimi di istidina) possono risultare in mutazioni "silenti" che non influenzano la sequenza amminoacidica della proteina. Tuttavia, si prevede che tra le cellule di mammifero esistano polimorfismi di sequenza di DNA che portano a cambiamenti nelle sequenze amminoacidiche delle proteine in oggetto. Un tecnico del ramo apprezzerà che queste variazioni in uno o più nucleotidi (fino a circa il 3-5% dei nucleotidi) degli acidi nucleici codificanti una particolare proteina possono esistere tra individui di una data specie a causa di variazione allelica naturale. Qualsiasi e tutte tali variazioni nucleotidiche e risultanti polimorfismi amminoacidici possono essere usati con i metodi e le composizioni descritti nella presente.

[0112] In certi casi, gli acidi nucleici ricombinanti che possono essere usati per produrre polipeptidi di ActRIIB adatti per uso nei metodi e nelle composizioni descritti nella presente possono essere collegati operativamente a una o più sequenze nucleotidiche regolatrici in un costrutto di espressione. Sequenze nucleotidiche regolatrici saranno generalmente appropriate per la cellula ospite usata per l'espressione. Numerosi tipi di vettori di espressione appropriati e sequenze regolatrici adatte sono noti nell'arte per una varietà di cellule ospiti. Tipicamente, dette una o più sequenze nucleotidiche regolatrici possono includere, ma senza limitarsi, sequenze di promotore, sequenze leader o segnale, siti di legame ribosomiale, sequenze di inizio e di terminazione trascrizionali, sequenze di inizio e di terminazione traduzionali, e sequenze di potenziatore o attivatore. Promotori costitutivi o inducibili come noti nell'arte possono essere usati con i metodi e le composizioni descritti nella presente. I promotori possono essere promotori presenti in natura o promotori ibridi che combinano elementi di più di un promotore. Un costrutto di espressione può essere presente in una cellula su un episoma, come un plasmide, oppure il costrutto di espressione può essere inserito in un cromosoma. In una forma di realizzazione preferita, il vettore di espressione contiene un gene marcatore selezionabile per consentire la selezione di cellule ospiti trasformate. Geni marcatori selezionabili sono ben noti nell'arte e varieranno con la cellula ospite usata.

[0113] In certi aspetti, gli acidi nucleici che possono essere usati per produrre polipeptidi di ActRIIB adatti per uso nei metodi e nelle composizioni descritti

nella presente sono forniti in un vettore di espressione comprendente una sequenza nucleotidica codificante un polipeptide di ActRIIB e collegata operativamente ad almeno una sequenza regolatrice. Sequenze regolatrici sono riconosciute nell'arte e sono selezionate per dirigere l'espressione del polipeptide di ActRIIB. Di conseguenza, il termine sequenza regolatrice include promotori, potenziatori, e altri elementi di controllo di espressione. Sequenze regolatrici esemplificative sono descritte in Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Ad esempio, qualsiasi di un'ampia varietà di sequenze di controllo di espressione che controllano l'espressione di una sequenza di DNA, quando collegate operativamente ad essa, può essere usata in questi vettori per esprimere sequenze di DNA codificanti un polipeptide di ActRIIB. Tali utili sequenze di controllo di espressione includono, ad esempio, i promotori precoci e tardivi di SV40, il promotore tet, il promotore immediato precoce di adenovirus o citomegalovirus, promotori di RSV, il sistema lac, il sistema trp, il sistema TAC o TRC, promotore T7 la cui espressione è diretta dalla T7 RNA polimerasi, le principali regioni operatore e promotore di fago lambda, le regioni di controllo per proteina di rivestimento fd, il promotore per 3-fosfoglicerato chinasi o altri enzimi glicolitici, i promotori di fosfatasi acida, ad esempio Pho5, i promotori dei fattori di accoppiamento alfa di lievito, il promotore polyhedron del sistema di baculovirus e altre sequenze note per controllare l'espressione di geni di cellule procariotiche o eucariotiche o loro virus, e varie loro combinazioni. Dovrebbe essere chiaro che il disegno del vettore di espressione può dipendere da fattori quali la scelta della cellula ospite da trasformare e/o il tipo di proteina che si

desidera esprimere. Oltretutto, dovrebbero essere considerati anche il numero di copie di vettore, la capacità di controllare quel numero di copie e l'espressione di qualsiasi altra proteina codificata dal vettore, come marcatori antibiotici.

[0114] Un acido nucleico ricombinante può essere prodotto ligando il gene clonato, o una sua porzione, in un vettore adatto per espressione in cellule procariotiche, cellule eucariotiche (lievito, uccelli, insetti o mammiferi), o entrambi. Veicoli di espressione per produzione di un polipeptide di ActRIIB ricombinante includono plasmidi e altri vettori. Ad esempio, vettori adatti includono plasmidi dei tipi: plasmidi derivati da pBR322, plasmidi derivati da pEMBL, plasmidi derivati da pEX, plasmidi derivati da pBTac e plasmidi derivati da pUC per espressione in cellule procariotiche, come E. coli.

[0115] Alcuni vettori di espressione di mammifero contengono sia sequenze procariotiche, per facilitare la propagazione del vettore nei batteri, sia una o più unità di trascrizione eucariotiche espresse in cellule eucariotiche. I vettori derivati pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo e pHyg sono esempi di vettori di espressione di mammifero adatti per trasfezione di cellule eucariotiche. Alcuni di questi vettori sono modificati con sequenze di plasmidi batterici, come pBR322, per facilitare la replicazione e la selezione della resistenza ai farmaci sia in cellule procariotiche che eucariotiche. In alternativa, derivati di virus come il papillomavirus bovino (BPV-1) o il virus di Epstein-Barr (pHEBo, derivato da

pREP e p205) possono essere usati per espressione transitoria di proteine in cellule eucariotiche. Esempi di altri sistemi di espressione virale (inclusi quelli retrovirali) possono essere trovati di seguito nella descrizione dei sistemi di erogazione di terapia genica. I vari metodi impiegati nella preparazione dei plasmidi e nella trasformazione di organismi ospiti sono ben noti nell'arte. Per altri sistemi di espressione adatti sia per cellule procariotiche che eucariotiche, nonché procedure ricombinanti generali, si veda *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3a ed., curato da Sambrook, Fritsch e Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). In alcuni casi, può essere desiderabile esprimere i polipeptidi ricombinanti mediante l'uso di un sistema di espressione di baculovirus. Esempi di tali sistemi di espressione di baculovirus includono vettori derivati da pVL (come pVL1392, pVL1393 e pVL941), vettori derivati da pAcUW (come pAcUW1) e vettori derivati da pBlueBac (come il pBlueBac III contenente beta-gal).

[0116] In una forma di realizzazione, un vettore può essere progettato per la produzione dei polipeptidi di ActRIIB usati nei metodi e nelle composizioni descritti nella presente in cellule CHO, come un vettore pCMV-Script (Stratagene, La Jolla, California), vettori pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, California) e vettori pCI-neo (Promega, Madison, Wis.). Come risulterà evidente, i costrutti genici in oggetto possono essere usati per causare espressione dei polipeptidi di ActRIIB in oggetto in cellule propagate in coltura, ad esempio per produrre proteine, incluse proteine di fusione o proteine varianti, per la purificazione.

[0117] Cellule ospiti trasfettate con un gene ricombinante includente una sequenza codificante (ad esempio SEQ ID NO:6 o quelle sequenze di acido nucleico che codificano polipeptidi di ActRIIB solubile (ad esempio acidi nucleici che codificano SEQ ID NO: 4, 5, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28 e 29)) uno o più dei polipeptidi di ActRIIB in oggetto possono essere usate per produrre polipeptidi di ActRIIB adatti per uso nei metodi e nelle composizioni descritti nella presente. La cellula ospite può essere qualsiasi cellula procariotica o eucariotica. Ad esempio, un polipeptide di ActRIIB può essere espresso in cellule batteriche come E. coli, cellule di insetto (ad esempio usando un sistema di espressione di baculovirus), lievito, o cellule di mammifero. Altre cellule ospiti adatte sono note ai tecnici del ramo.

[0118] Di conseguenza, nella presente vengono forniti metodi per produrre i polipeptidi di ActRIIB usati nei metodi e nelle composizioni descritti nella presente. Ad esempio, una cellula ospite trasfettata con un vettore di espressione codificante un polipeptide di ActRIIB può essere coltivata in condizioni appropriate per consentire l'espressione del polipeptide di ActRIIB. Il polipeptide di ActRIIB può essere secreto e isolato da una miscela di cellule e terreno contenente il polipeptide di ActRIIB. In alternativa, il polipeptide di ActRIIB può essere trattenuto a livello citoplasmatico o in una frazione di membrana e le cellule possono essere raccolte e lisate e la proteina può essere isolata. Una coltura cellulare include cellule ospiti, terreno e altri sottoprodotti. Terreni adatti per coltura cellulare sono ben noti nell'arte. I polipeptidi di ActRIIB

in oggetto possono essere isolati da terreno di coltura cellulare, cellule ospiti, o entrambi, usando tecniche note nell'arte per la purificazione delle proteine, tra cui cromatografia a scambio ionico, cromatografia per filtrazione su gel, ultrafiltrazione, elettroforesi, purificazione per immunoaffinità con anticorpi specifici per particolari epitopi dei polipeptidi di ActRIIB, e purificazione per affinità con un agente che si lega a un dominio fuso al polipeptide di ActRIIB (ad esempio una colonna di proteina A può essere usata per purificare una fusione ActRIIB-Fc). In un caso preferito, il polipeptide di ActRIIB è una proteina di fusione contenente un dominio che ne facilita la purificazione. In un caso preferito, una purificazione viene conseguita mediante una serie di passaggi di cromatografia su colonna, includenti, ad esempio, tre o più dei seguenti, in qualsiasi ordine: cromatografia con proteina A, cromatografia con Q-Sepharose, cromatografia con fenil-Sepharose, cromatografia ad esclusione dimensionale, e cromatografia a scambio cationico. La purificazione potrebbe essere completata con filtrazione virale e scambio di tampone. Come dimostrato nella presente, una proteina ActRIIB-hFc è stata purificata a una purezza >98% come determinato mediante cromatografia ad esclusione dimensionale e >95% come determinato mediante SDS-PAGE. Questo livello di purezza era sufficiente per conseguire effetti desiderabili sull'osso nei topi e un profilo di sicurezza accettabile in topi, ratti e primati non umani.

[0119] In un altro caso, un gene di fusione codificante una sequenza leader di purificazione, come una sequenza di sito di clivaggio poli-(His)/enterochinasi al terminale N della porzione desiderata del polipeptide di ActRIIB ricombinante,

può consentire una purificazione della proteina di fusione espressa mediante cromatografia di affinità usando una resina di metallo Ni²⁺. La sequenza leader di purificazione può poi essere successivamente rimossa mediante trattamento con enterochinasi per fornire il polipeptide di ActRIIB purificato (ad esempio, si vedano Hochuli et al., (1987) *J. Chromatography* 411:177; e Janknecht et al., *PNAS USA* 88:8972).

[0120] Le tecniche per creare geni di fusione sono ben note. Essenzialmente, l'unione di vari frammenti di DNA codificanti per differenti sequenze polipeptidiche viene eseguita in conformità con tecniche convenzionali, impiegando terminali con estremità piatte o con estremità sfalsate per ligazione, digestione con enzimi di restrizione per fornire terminali appropriati, riempimento di estremità coesive come appropriato, trattamento con fosfatasi alcalina per evitare unioni indesiderate, e ligazione enzimatica. In un'altra forma di realizzazione, il gene di fusione può essere sintetizzato mediante tecniche convenzionali, inclusi sintetizzatori di DNA automatizzati. In alternativa, un'amplificazione PCR di frammenti genici può essere effettuata usando primer di ancoraggio che danno origine a sporgenze complementari tra due frammenti genici consecutivi che possono essere successivamente appaiati per generare una sequenza genica chimerica (si veda, ad esempio, *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

[0121] Una proteina di fusione ActRIIB-Fc può essere espressa in cellule CHO-DUKX BI 1 trasfettate stabilmente da un vettore pAID4 (SV40 ori/potenziatore,

promotore di CMV), usando una sequenza leader di plasminogeno tissutale di SEQ ID NO:2. La porzione Fc può comprendere una sequenza Fc di IgG1 umana, come mostrata in SEQ ID NO: 1. In certi casi, in seguito ad espressione, la proteina contenuta ha, in media, tra circa 1,5 e 2,5 moli di acido sialico per molecola di proteina di fusione ActRIIB-Fc.

[0122] In certi casi, la lunga emivita sierica di una fusione ActRIIB-Fc può essere di 25-32 giorni in soggetti umani. In aggiunta, il materiale espresso da cellule CHO può avere un'affinità più alta per un ligando attivina B rispetto a quella riportata per una proteina di fusione ActRIIB-hFc espressa in cellule 293 umane (del Re et al., J Biol Chem. 17 dicembre 2004; 279(51):53126-35). In aggiunta, senza essere vincolati alla teoria, l'uso della sequenza leader di TPA ha fornito una produzione maggiore rispetto ad altre sequenze leader e, a differenza di ActRIIB-Fc espressa con un leader nativo, può fornire una sequenza N-terminale altamente pura. L'uso della sequenza leader nativa può risultare in due specie principali di ActRIIB-Fc, ciascuna avente una differente sequenza N-terminale.

[0123] In una forma di realizzazione preferita, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è luspatercept (*si veda* International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances (INN), WHO Drug Information, vol. 27, n. 4, 2013, Proposed INN: List 110-458, 422).

5.5 COMPOSIZIONI

[0124] In certe forme di realizzazione, inibitori di segnalazione di ActRIIB sono formulati con un trasportatore farmaceuticamente accettabile per uso con i metodi descritti nella presente. Ad esempio, un inibitore di segnalazione di ActRIIB può essere somministrato da solo o come componente di una formulazione farmaceutica (composizione terapeutica). I composti in oggetto possono essere formulati per somministrazione in qualsiasi modo conveniente per uso in medicina umana o veterinaria.

[0125] In una forma di realizzazione preferita, l'inibitore di segnalazione di ActRII è formulato per somministrazione sottocutanea.

[0126] In un'altra forma di realizzazione preferita, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è confezionato in un contenitore come polvere o pannello liofilizzato/o sterile priva/o di conservanti. In certe forme di realizzazione, il contenitore comprende 25 mg dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB. In certe forme di realizzazione, il contenitore comprendente 25 mg dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB comprende un totale di 37,5 mg di proteina. In certe forme di realizzazione, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB nel contenitore comprendente 25 mg dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene ricostituito con 0,68 ml di acqua per preparazioni iniettabili. In certe forme di realizzazione, il contenitore comprende 75 mg dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB. In certe forme di realizzazione, il contenitore comprendente 75 mg dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB comprende un totale di 87,5 mg di proteina. In certe forme di realizzazione, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB nel contenitore

comprendente 75 mg dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene ricostituito con 1,6 ml di acqua per preparazioni iniettabili. In certe forme di realizzazione, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB nel contenitore viene ricostituito con un volume di acqua per preparazioni iniettabili di modo che la concentrazione finale dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB ricostituito nell'acqua per preparazioni iniettabili sia di 50 mg/ml con un pH di approssimativamente 6,5. In certe forme di realizzazione, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato ad un soggetto entro 10 ore dalla ricostituzione. In certe forme di realizzazione, il contenitore comprende l'inibitore di segnalazione di ActRIIB a una concentrazione di 50 mg/ml in una soluzione a base di tampone citrato 10 mM, in cui la soluzione a base di tampone citrato 10 mM comprende citrato 10 mM, pH 6,5, saccarosio 9% e polisorbato 80 0,02%. In certe forme di realizzazione, il contenitore viene conservato tra 2 °C e 8 °C. In certe forme di realizzazione, il contenitore viene conservato tra 2 °C e 8 °C per 18 mesi. In certe forme di realizzazione, il contenitore è una fiala di vetro da 3 ml con un tappo rivestito in butile grigio. In certe forme di realizzazione, il contenitore è una fiala di vetro da 3 ml con un tappo in gomma grigio. In certe forme di realizzazione, il tappo in gomma è fissato in posizione da un cappuccio apribile in alluminio serrato con un pulsante in plastica colorata. In certe forme di realizzazione, la fiala di vetro da 3 ml comprende 25 mg dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB e il pulsante di plastica colorata è rosso. In certe forme di realizzazione, la fiala di vetro da 3 ml comprende 75 mg dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB e il pulsante di plastica colorata è bianco. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide

comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica consistente nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide consistente nella sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO:11.

[0127] In una forma di realizzazione specifica, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è confezionato in un contenitore come polvere o pannello liofilizzata/o sterile priva/o di conservanti. In una forma di realizzazione specifica, il contenitore comprende 50 mg/ml di inibitore di segnalazione di ActRIIB in tampone citrato 10 mM pH 6,5. In una forma di realizzazione specifica, il contenitore comprende 56 mg di inibitore di segnalazione di ActRIIB, 0,19 mg di acido citrico monoidrato, 3,03 mg di citrato trisodico diidrato, 0,24 mg di polisorbato 80 e 100,80 mg di saccarosio. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica consistente nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide consistente nella sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO:11.

[0128] In certe forme di realizzazione, i metodi terapeutici forniti nella presente includono somministrare la composizione (comprendente un inibitore di segnalazione di ActRIIB) per via sistemica o per via locale come un impianto o un dispositivo. Quando somministrata, la composizione terapeutica per usi forniti nella presente è in una forma fisiologicamente accettabile apirogena. Agenti terapeuticamente utili diversi dagli inibitori di segnalazione di ActRII che possono anche facoltativamente essere inclusi nella composizione come descritta sopra, possono essere somministrati simultaneamente o in sequenza con i composti in oggetto (ad esempio polipeptidi di ActRII, come polipeptidi di ActRIIA e/o ActRIIB).

[0129] Tipicamente, inibitori di segnalazione di ActRIIB verranno somministrati per via parenterale. In una forma di realizzazione preferita, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB verrà somministrato per via sottocutanea. Composizioni farmaceutiche adatte per somministrazione parenterale possono comprendere uno o più polipeptidi di ActRIIB in combinazione con una o più soluzioni, dispersioni, sospensioni o emulsioni sterili, isotoniche acquose o non acquose farmaceuticamente accettabili, o polveri sterili che possono essere ricostituite in soluzioni o dispersioni iniettabili sterili subito prima dell'uso, che possono contenere antiossidanti, tamponi, batteriostatici, soluti che rendono la formulazione isotonica rispetto al sangue del ricevente previsto o agenti di sospensione o addensanti. Esempi di trasportatori acquosi e non acquosi adatti che possono essere impiegati nelle composizioni farmaceutiche per uso nei metodi descritti nella presente includono acqua, etanolo, polioli (come glicerolo,

glicole di propilene, glicole di polietilene e simili) e loro miscele adatte, oli vegetali, come olio di oliva, ed esteri organici iniettabili come oleato di etile. Una corretta fluidità può essere mantenuta, ad esempio, mediante l'uso di materiali di rivestimento, quale lecitina, mediante il mantenimento della dimensione particellare richiesta nel caso di dispersioni e mediante l'uso di tensioattivi.

[0130] Le composizioni descritte nella presente possono contenere anche adiuvanti come conservanti, agenti bagnanti, agenti emulsionanti e agenti disperdenti. La prevenzione dell'azione dei microrganismi può essere assicurata dall'inclusione di vari agenti antibatterici e antimicotici, ad esempio parabeni, clorobutanolo, acido fenolsorbico, e simili. Può anche essere desiderabile includere nelle composizioni agenti isotonici come zuccheri, cloruro di sodio e simili. In aggiunta, l'assorbimento prolungato della forma farmaceutica iniettabile può essere indotto dall'inclusione di agenti che ritardano l'assorbimento come monostearato di alluminio e gelatina.

[0131] In certe forme di realizzazione, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è sostanzialmente puro in una composizione farmaceutica. Specificamente, al massimo il 20%, il 10%, il 5%, il 2,5%, l'1%, lo 0,1%, o al massimo lo 0,05% dei composti nella composizione farmaceutica sono composti diversi dall'inibitore di segnalazione di ActRIIB e dal trasportatore farmaceutico accettabile.

[0132] In certe forme di realizzazione, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato a temperatura ambiente a un paziente secondo un metodo fornito nella presente.

5.6 DOSI E VIE DI SOMMINISTRAZIONE

[0133] Nella presente sono inoltre fornite dosi di un inibitore di segnalazione di ActRIIB da somministrare a un soggetto in relazione a un metodo di trattamento descritto nella presente (si veda, ad esempio, la Sezione 5.2). In certe forme di realizzazione, la dose è una dose farmaceuticamente efficace.

[0134] In certe forme di realizzazione, la dose farmaceuticamente efficace dell'inibitore di segnalazione di ActRII è una dose sufficiente a ridurre o alleviare uno o più sintomi di mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa. In certe forme di realizzazione, la dose farmaceuticamente efficace dell'inibitore di segnalazione di ActRII è una dose sufficiente a prevenire il peggioramento di almeno un sintomo di mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa. Esempi non limitanti di mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa includono affaticamento, sudorazione notturna, prurito, disturbi addominali, dolore sotto le costole sul lato sinistro, sazietà precoce, o dolore osseo.

[0135] In certe forme di realizzazione, la dose farmaceuticamente efficace dell'inibitore di segnalazione di ActRII è una dose sufficiente a ridurre o alleviare uno o più sintomi di anemia causati da, o associati a, mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa. In certe forme di realizzazione, la dose

farmaceuticamente efficace dell'inibitore di segnalazione di ActRII è una dose sufficiente a prevenire il peggioramento di almeno un sintomo di anemia. Esempi non limitativi di anemia includono affaticamento, perdita di energia, battito cardiaco accelerato, mancanza di respiro, mal di testa, difficoltà di concentrazione, vertigini, pelle pallida, crampi alle gambe, e insonnia.

[0136] In certe forme di realizzazione, la dose farmaceuticamente efficace dell'inibitore di segnalazione di ActRII è una dose sufficiente a ridurre o alleviare uno o più sintomi di anemia e uno o più sintomi di mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa. In certe forme di realizzazione, la dose farmaceuticamente efficace dell'inibitore di segnalazione di ActRII è una dose sufficiente a prevenire il peggioramento di almeno un sintomo di anemia e il peggioramento di almeno un sintomo di mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa. Esempi non limitativi di anemia includono affaticamento, perdita di energia, battito cardiaco accelerato, mancanza di respiro, mal di testa, difficoltà di concentrazione, vertigini, pelle pallida, crampi alle gambe, e insonnia. Esempi non limitanti di mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa includono affaticamento, sudorazione notturna, prurito, disturbi addominali, dolore sotto le costole sul lato sinistro, sazietà precoce, o dolore osseo.

[0137] In certe forme di realizzazione, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene dosato a intervalli e quantità sufficienti per conseguire concentrazioni sieriche di 0,2 mg/kg o superiori, ad esempio livelli sierici di 1 mg/kg o 2 mg/kg

o superiori. I regimi di dosaggio possono essere progettati per raggiungere concentrazioni sieriche tra 0,2 e 15 mg/kg, e facoltativamente tra 1 e 5 mg/kg. Nell'uomo, livelli sierici di 0,2 mg/kg possono essere conseguiti con una singola dose di 0,1 mg/kg o superiore, e livelli sierici di 1 mg/kg possono essere conseguiti con una singola dose di 0,3 mg/kg o superiore. L'emivita sierica osservata della molecola è tra circa 20 e 30 giorni, sostanzialmente più lunga della maggior parte delle proteine di fusione di Fc, e perciò è possibile conseguire un livello sierico efficace prolungato, ad esempio, dosando 0,2-0,4 mg/kg su base settimanale o bisettimanale, oppure possono essere usate dosi più alte con intervalli più lunghi tra le somministrazioni. Ad esempio, dosi di 1-3 mg/kg potrebbero essere usate su base mensile o bimestrale, e l'effetto sull'osso potrebbe essere sufficientemente duraturo da rendere necessaria la somministrazione solo una volta ogni 3, 4, 5, 6, 9, 12 o più mesi. I livelli sierici dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB possono essere misurati con qualsiasi mezzo noto al tecnico del ramo. Ad esempio, anticorpi contro l'inibitore di segnalazione di ActRIIB possono essere usati per determinare i livelli sierici dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB usando, ad esempio, un ELISA. In una forma di realizzazione specifica, il metodo fornito nella presente consegue anche effetti significativi sulla densità e sulla forza ossea.

[0138] In certe forme di realizzazione, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è circa 0,1 mg/kg, circa 0,3 mg/kg, circa 0,45 mg/kg, circa 0,5 mg/kg, circa 0,6 mg/kg, 0,75 mg/kg, circa 0,8 mg/kg, circa 1,0 mg/kg, circa 1,25 mg/kg, circa 1,33 mg/kg, circa 1,5 mg/kg, circa 1,75 mg/kg, circa 2,0 mg/kg, o circa

2,25 mg/kg. In certe forme di realizzazione, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è tra 0,1 mg/kg e 2,25 mg/kg. In certe forme di realizzazione, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è tra 0,1 mg/kg e 1 mg/kg. In certe forme di realizzazione, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è tra 0,3 mg/kg e 1,25 mg/kg. In certe forme di realizzazione, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è tra 0,5 mg/kg e 1,5 mg/kg. In certe forme di realizzazione, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è tra 0,1 mg/kg e 2,0 mg/kg. In certe forme di realizzazione, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è tra 0,33 mg/kg e 2,0 mg/kg. In certe forme di realizzazione, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è tra 0,75 mg/kg e 1,0 mg/kg, tra 1,0 mg/kg e 1,25 mg/kg, tra 1,25 mg/kg e 1,5 mg/kg, tra 1,5 mg/kg e 1,75 mg/kg, o tra 1,75 mg/kg e 2,0 mg/kg. In certe forme di realizzazione, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è una dose farmaceuticamente efficace. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 0,33 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 0,45 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 0,6 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 0,8 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 1,0 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 1,33 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 1,75 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 2,00

mg/kg. Quando usata unitamente a una dose fornita nella presente (ad esempio una dose di un inibitore di segnalazione di ActRIIB o una dose di un secondo agente attivo), la parola "circa" si riferisce a qualsiasi numero entro 1, 5 o 10% del numero di riferimento.

[0139] In certe forme di realizzazione, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è una dose farmaceuticamente efficace. In certe forme di realizzazione, la dose farmaceuticamente efficace dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è circa 0,1 mg/kg, circa 0,3 mg/kg, circa 0,45 mg/kg, circa 0,5 mg/kg, circa 0,6 mg/kg, 0,75 mg/kg, circa 0,8 mg/kg, circa 1,0 mg/kg, circa 1,25 mg/kg, circa 1,33 mg/kg, circa 1,5 mg/kg, circa 1,75 mg/kg, circa 2,0 mg/kg, o circa 2,25 mg/kg. In certe forme di realizzazione, la dose farmaceuticamente efficace dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è tra 0,1 mg/kg e 2,25 mg/kg. In certe forme di realizzazione, la dose farmaceuticamente efficace dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è tra 0,1 mg/kg e 1 mg/kg. In certe forme di realizzazione, la dose farmaceuticamente efficace dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è tra 0,3 mg/kg e 1,25 mg/kg. In certe forme di realizzazione, la dose farmaceuticamente efficace dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è tra 0,5 mg/kg e 1,5 mg/kg. In certe forme di realizzazione, la dose farmaceuticamente efficace dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è tra 0,1 mg/kg e 2,0 mg/kg. In certe forme di realizzazione, la dose farmaceuticamente efficace dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è tra 0,33 mg/kg e 2,0 mg/kg. In certe forme di realizzazione, la dose farmaceuticamente efficace dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è tra 0,75 mg/kg e 1,0 mg/kg, tra 1,0 mg/kg e 1,25 mg/kg, tra 1,25

mg/kg e 1,5 mg/kg, tra 1,5 mg/kg e 1,75 mg/kg, o tra 1,75 mg/kg e 2,0 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 0,33 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 0,45 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 0,6 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 0,8 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 1,0 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 1,33 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 1,75 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 2,00 mg/kg.

[0140] In certe forme di realizzazione, la dose di un inibitore di segnalazione di ActRIIB somministrata a un soggetto secondo i metodi forniti nella presente è sufficiente ad aumentare il livello di emoglobina nel soggetto rispetto al livello di emoglobina nel soggetto al basale. Nel contesto della valutazione dell'aumento del livello di emoglobina nel soggetto, "basale" si riferisce al momento immediatamente precedente alla prima somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. In certe forme di realizzazione, la dose di un inibitore di segnalazione di ActRIIB somministrata a un soggetto secondo i metodi forniti nella presente è sufficiente ad aumentare il livello di emoglobina nel soggetto di almeno il 5%, almeno il 10%, almeno il 15%, almeno il 20%, almeno il 25%, almeno il 30%, almeno il 35%, almeno il

40%, almeno il 45%, almeno il 50%, almeno il 55%, almeno il 60%, almeno il 65%, almeno il 70%, almeno il 75%, almeno l'80%, almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 95% o almeno il 100% in qualsiasi periodo consecutivo di 84 giorni dopo che al soggetto è stata somministrata una prima dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB, in cui al soggetto sono state trasfuse 0 unità di unità di globuli rossi durante il periodo consecutivo di 84 giorni, rispetto al livello di emoglobina nel soggetto al basale. In certe forme di realizzazione, la dose di un inibitore di segnalazione di ActRIIB somministrata a un soggetto secondo i metodi forniti nella presente è sufficiente ad aumentare il livello di emoglobina nel soggetto di al massimo il 5%, al massimo il 10%, al massimo il 15%, al massimo il 20%, al massimo il 25%, al massimo il 30%, al massimo il 35%, al massimo il 40%, al massimo il 45%, al massimo il 50%, al massimo il 55%, al massimo il 60%, al massimo il 65%, al massimo il 70%, al massimo il 75%, al massimo l'80%, al massimo l'85%, al massimo il 90%, al massimo il 95% o al massimo il 100% in qualsiasi periodo consecutivo di 84 giorni dopo che al soggetto è stata somministrata una prima dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB, in cui al soggetto sono state trasfuse 0 unità di unità di globuli rossi durante il periodo consecutivo di 84 giorni, rispetto al livello di emoglobina nel soggetto al basale. In certe forme di realizzazione, la dose di un inibitore di segnalazione di ActRIIB somministrata a un soggetto secondo i metodi forniti nella presente è sufficiente ad aumentare il livello di emoglobina di almeno 1,5 g/dl, almeno 1,8 g/dl, almeno 2,0 g/dl, almeno 2,2 g/dl, almeno 2,4 g/dl, almeno 2,6 g/dl, almeno 2,8 g/dl, almeno 3,0 g/dl, almeno 3,2 g/dl, almeno 3,4 g/dl, almeno 3,6 g/dl, almeno 3,8 g/dl, almeno 4,0 g/dl, almeno 5,0 g/dl o almeno 6,0

g/dl in qualsiasi periodo consecutivo di 84 giorni dopo che al soggetto è stata somministrata una prima dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB, in cui al soggetto sono state trasfuse 0 unità di unità di globuli rossi durante il periodo consecutivo di 84 giorni, rispetto al livello di emoglobina nel soggetto al basale. In certe forme di realizzazione, la dose di un inibitore di segnalazione di ActRIIB somministrata a un soggetto secondo i metodi forniti nella presente è sufficiente ad aumentare il livello di emoglobina di al massimo 1,5 g/dl, al massimo 1,8 g/dl, al massimo 2,0 g/dl, al massimo 2,2 g/dl, al massimo 2,4 g/dl, al massimo 2,6 g/dl, al massimo 2,8 g/dl, al massimo 3,0 g/dl, al massimo 3,2 g/dl, al massimo 3,4 g/dl, al massimo 3,6 g/dl, al massimo 3,8 g/dl, al massimo 4,0 g/dl, al massimo 5,0 g/dl o al massimo 6,0 g/dl in qualsiasi periodo consecutivo di 84 giorni dopo che al soggetto è stata somministrata una prima dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB, in cui al soggetto sono state trasfuse 0 unità di unità di globuli rossi durante il periodo consecutivo di 84 giorni, rispetto al livello di emoglobina nel soggetto al basale. In certe forme di realizzazione, la dose di un inibitore di segnalazione di ActRIIB somministrata a un soggetto secondo i metodi forniti nella presente è sufficiente a risultare nell'aumento del livello di emoglobina nel soggetto per almeno 3, almeno 4, almeno 5, almeno 6, almeno 12, almeno 18, almeno 24 o almeno 48 mesi dopo la somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB. In certe forme di realizzazione, la dose di un inibitore di segnalazione di ActRIIB somministrata a un soggetto secondo i metodi forniti nella presente è sufficiente per risultare indefinitamente nell'aumento del livello di emoglobina nel soggetto dopo somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB. In certe forme di

realizzazione, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è tra 0,33 mg/kg e 2,0 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 0,33 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 0,45 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 0,6 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 0,8 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 1,0 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 1,33 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 1,75 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 2,00 mg/kg. In certe forme di realizzazione, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un inibitore di segnalazione di ActRIIB descritto nella Sezione 5.4. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica consistente nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide consistente nella sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO:11. In una forma di realizzazione preferita, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è luspatercept.

[0141] In certe forme di realizzazione in cui il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi, la dose di un inibitore di segnalazione di ActRIIB somministrata a un soggetto secondo i metodi forniti nella presente è sufficiente a risultare in indipendenza da trasfusioni di globuli rossi nel soggetto per qualsiasi periodo consecutivo di 84 giorni dopo che al soggetto è stata somministrata una prima dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB. In certe forme di realizzazione, un soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi se ha ricevuto 0 unità di globuli rossi durante un qualsiasi periodo consecutivo di 60 giorni, 61 giorni, 62 giorni, 63 giorni, 64 giorni, 65 giorni, 66 giorni, 67 giorni, 68 giorni, 69 giorni, 70 giorni, 71 giorni, 72 giorni, 73 giorni, 74 giorni, 75 giorni, 76 giorni, 77 giorni, 78 giorni, 79 giorni, 80 giorni, 81 giorni, 82 giorni, 83 giorni, 84 giorni, 85 giorni, 86 giorni, 87 giorni, 88 giorni, 89 giorni o 90 giorni. In certe forme di realizzazione, un soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi se ha ricevuto una frequenza media di trasfusione di globuli rossi da 2 a 4 unità di globuli rossi ogni 28 giorni durante un periodo di tempo di almeno 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 giorni prima di una prima somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. In certe forme di realizzazione, la dose di un inibitore di segnalazione di ActRIIB somministrata a un soggetto secondo i metodi forniti nella presente è sufficiente a risultare in indipendenza da trasfusioni di globuli rossi nel soggetto per almeno 3, almeno 4, almeno 5, almeno 6, almeno 12, almeno 18, almeno 24 o almeno 48 mesi dopo la somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB. In certe forme di realizzazione, la dose di un inibitore di segnalazione

di ActRIIB somministrata a un soggetto secondo i metodi forniti nella presente è sufficiente per risultare indefinitamente in indipendenza da trasfusioni di globuli rossi nel soggetto dopo somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB. In certe forme di realizzazione, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è tra 0,33 mg/kg e 2,0 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 0,33 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 0,45 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 0,6 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 0,8 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 1,0 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 1,33 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 1,75 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 2,00 mg/kg. In certe forme di realizzazione, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un inibitore di segnalazione di ActRIIB descritto nella Sezione 5.4. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica consistente nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide consistente nella sequenza

amminoacidica esposta in SEQ ID NO:11. In una forma di realizzazione preferita, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è luspatercept.

[0142] In certe forme di realizzazione, la dose di un inibitore di segnalazione di ActRIIB somministrata a un soggetto secondo i metodi forniti nella presente è sufficiente a diminuire la frequenza di trasfusione di globuli rossi nel soggetto rispetto alla frequenza di trasfusione di globuli rossi nel soggetto al basale. Nel contesto della valutazione della diminuzione della frequenza di trasfusione di globuli rossi nel soggetto, "basale" si riferisce al momento immediatamente precedente alla prima somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. Per valutare la diminuzione della frequenza di trasfusione di globuli rossi nel soggetto rispetto alla frequenza di trasfusione di globuli rossi nel soggetto al basale, il numero medio di unità di globuli rossi trasfuse nel soggetto in un periodo di quattro settimane dopo che al soggetto è stata somministrata una prima dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene confrontato con il numero medio di unità di globuli rossi trasfuse nel soggetto in un periodo di quattro settimane al basale. In certe forme di realizzazione, la dose di un inibitore di segnalazione di ActRIIB somministrata a un soggetto trattato secondo i metodi forniti nella presente è sufficiente a ridurre il numero medio di unità di globuli rossi trasfuse nel soggetto per un periodo di quattro settimane dopo che al soggetto è stata somministrata una prima dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB di almeno il 10%, almeno il 20%, almeno il 30%, almeno il 40%, almeno il 50%, almeno il 60%, almeno il 70%, almeno l'80%, almeno il 90% o almeno il 100% rispetto al numero medio di unità di globuli

rossi trasfuse nel soggetto per un periodo di quattro settimane al basale. In certe forme di realizzazione, la dose di un inibitore di segnalazione di ActRIIB somministrata a un soggetto trattato secondo i metodi forniti nella presente è sufficiente a ridurre il numero medio di unità di globuli rossi trasfuse nel soggetto per un periodo di quattro settimane dopo che al soggetto è stata somministrata una prima dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB di al massimo il 10%, al massimo il 20%, al massimo il 30%, al massimo il 40%, al massimo il 50%, al massimo il 60%, al massimo il 70%, al massimo l'80%, al massimo il 90% o al massimo il 100% rispetto al numero medio di unità di globuli rossi trasfuse nel soggetto per un periodo di quattro settimane al basale.

In certe forme di realizzazione, la dose di un inibitore di segnalazione di ActRIIB somministrata a un soggetto trattato secondo i metodi forniti nella presente è sufficiente a ridurre il numero medio di unità di globuli rossi trasfuse nel soggetto per un periodo di quattro settimane dopo che al soggetto è stata somministrata una prima dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB di almeno 1, almeno 2, almeno 3, almeno 4, almeno 5, almeno 6, almeno 7 o almeno 8 unità rispetto al numero medio di unità di globuli rossi trasfuse nel soggetto per un periodo di quattro settimane al basale.

In certe forme di realizzazione, la dose di un inibitore di segnalazione di ActRIIB somministrata a un soggetto trattato secondo i metodi forniti nella presente è sufficiente a ridurre il numero medio di unità di globuli rossi trasfuse nel soggetto per un periodo di quattro settimane dopo che al soggetto è stata somministrata una prima dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB di al massimo 1, al massimo 2, al massimo 3, al massimo 4, al massimo 5, al massimo 6, al massimo 7 o al

massimo 8 unità rispetto al numero medio di unità di globuli rossi trasfuse nel soggetto per un periodo di quattro settimane al basale. In certe forme di realizzazione, un'unità di RBC si riferisce a circa 150 ml, 200 ml, 250 ml, 300 ml, 350 ml, 100-200 ml, 150-250 ml, 200-300 ml, 250-300 ml, o 250-350 ml di RBC. In certe forme di realizzazione, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è tra 0,33 mg/kg e 2,0 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 0,33 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 0,45 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 0,6 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 0,8 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 1,0 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 1,33 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 1,75 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 2,00 mg/kg. In certe forme di realizzazione, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un inibitore di segnalazione di ActRIIB descritto nella Sezione 5.4. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica consistente nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide consistente nella sequenza

amminoacidica esposta in SEQ ID NO:11. In una forma di realizzazione preferita, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è luspatercept.

[0143] In certe forme di realizzazione, la dose di un inibitore di segnalazione di ActRIIB somministrata a un soggetto secondo i metodi forniti nella presente è sufficiente a diminuire il carico trasfusionale nel soggetto di almeno il 5%, almeno il 10%, almeno il 15%, almeno il 20%, almeno il 25%, almeno il 30%, almeno il 35%, almeno il 40%, almeno il 45%, almeno il 50%, almeno il 55%, almeno il 60%, almeno il 65%, almeno il 70%, almeno il 75%, almeno l'80%, almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 95% o almeno il 100% in qualsiasi periodo di tempo dopo che al soggetto è stata somministrata una prima dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB rispetto al carico trasfusionale nel soggetto al basale. Nel contesto della valutazione della diminuzione del carico trasfusionale nel soggetto, "basale" si riferisce al momento immediatamente precedente alla prima somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto. In certe forme di realizzazione, la dose di un inibitore di segnalazione di ActRIIB somministrata a un soggetto secondo i metodi forniti nella presente è sufficiente a diminuire il carico trasfusionale nel soggetto di al massimo il 5%, al massimo il 10%, al massimo il 15%, al massimo il 20%, al massimo il 25%, al massimo il 30%, al massimo il 35%, al massimo il 40%, al massimo il 45%, al massimo il 50%, al massimo il 55%, al massimo il 60%, al massimo il 65%, al massimo il 70%, al massimo il 75%, al massimo l'80%, al massimo l'85%, al massimo il 90%, al massimo il 95% o al massimo il 100% in qualsiasi periodo di tempo dopo che al soggetto è stata somministrata una

prima dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB rispetto al carico trasfusionale nel soggetto al basale. In certe forme di realizzazione, il periodo di tempo durante il quale il carico trasfusionale viene diminuito nel soggetto è di almeno 4, almeno 5, almeno 6, almeno 7, almeno 8, almeno 9, almeno 10, almeno 11 o almeno 12 settimane. In certe forme di realizzazione, il periodo di tempo durante il quale il carico trasfusionale viene diminuito nel soggetto è di 12 settimane (ossia 84 giorni). In certe forme di realizzazione, la dose di un inibitore di segnalazione di ActRIIB somministrata a un soggetto secondo i metodi forniti nella presente è sufficiente a diminuire il carico trasfusionale nel soggetto di almeno il 50% in qualsiasi periodo consecutivo di 84 giorni dopo che al soggetto è stata somministrata una prima dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB rispetto al carico trasfusionale nel soggetto al basale. In certe forme di realizzazione, la dose di un inibitore di segnalazione di ActRIIB somministrata a un soggetto secondo i metodi forniti nella presente è sufficiente a diminuire il carico trasfusionale nel soggetto per almeno 3, almeno 4, almeno 5, almeno 6, almeno 12, almeno 18, almeno 24 o almeno 48 mesi dopo somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB. In certe forme di realizzazione, la dose di un inibitore di segnalazione di ActRIIB somministrata a un soggetto secondo i metodi forniti nella presente è sufficiente a diminuire indefinitamente il carico trasfusionale nel soggetto dopo somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB. In certe forme di realizzazione, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è tra 0,33 mg/kg e 2,0 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 0,33 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di

segnalazione di ActRIIB è 0,45 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 0,6 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 0,8 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 1,0 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 1,33 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 1,75 mg/kg. In una forma di realizzazione specifica, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB è 2,00 mg/kg. In certe forme di realizzazione, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un inibitore di segnalazione di ActRIIB descritto nella Sezione 5.4. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica consistente nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide consistente nella sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO:11. In una forma di realizzazione preferita, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è luspatercept.

[0144] In certe forme di realizzazione viene misurata una risposta dell'anemia. In alcune forme di realizzazione, una risposta dell'anemia viene misurata in relazione ad un aumento di emoglobina (Hgb), ad esempio proporzione di soggetti che conseguono un aumento di emoglobina $\geq 1,5$ g/dl rispetto al basale

in qualsiasi periodo consecutivo di 84 giorni senza una trasfusione di RBC (ad esempio in soggetti che ricevono luspatercept). In alcune forme di realizzazione, una risposta dell'anemia viene misurata in relazione ad un'aumentata indipendenza da trasfusioni di globuli rossi (RBC), ad esempio proporzione di soggetti che diventano liberi da trasfusioni di globuli rossi in un periodo consecutivo di 84 giorni (ad esempio in soggetti che ricevono luspatercept). In alcune forme di realizzazione, una risposta dell'anemia viene misurata in relazione al tempo di risposta dell'anemia, ad esempio tempo dalla prima dose di luspatercept alla prima insorgenza della risposta dell'anemia (ad esempio in soggetti che ricevono luspatercept). In alcune forme di realizzazione, una risposta dell'anemia viene misurata in relazione alla durata di risposta dell'anemia, ad esempio la durata massima di risposta dell'anemia in soggetti (ad esempio in soggetti che ricevono luspatercept). In alcune forme di realizzazione, una risposta dell'anemia viene misurata in relazione alla frequenza di trasfusioni di RBC, ad esempio il numero medio di unità di RBC trasfuse per soggetto ogni quattro settimane (ad esempio in soggetti che ricevono luspatercept). In alcune forme di realizzazione, una risposta dell'anemia viene misurata in relazione alla frequenza di dipendenza da trasfusioni di globuli rossi, ad esempio proporzione di soggetti dipendenti da trasfusioni di RBC che riducono il loro carico trasfusionale di $\geq 50\%$ rispetto al basale in qualsiasi periodo consecutivo di 84 giorni (ad esempio in soggetti che ricevono luspatercept). In alcune forme di realizzazione, una risposta dell'anemia viene misurata in relazione alla proporzione di soggetti che conseguono una riduzione del sintomo di affaticamento, registrato e giudicato

tramite il modulo di valutazione dei sintomi di neoplasia mieloproliferativa (Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form, MPN-SAF) modificato, (si veda Emanuel et al. "Myeloproliferative Neoplasm (MPN) Symptom Assessment Form Total Symptom Score: Prospective International Assessment of an Abbreviated Symptom Burden Scoring System Among Patients With MPNs", J. Clin. Oncol. 30(33):4098-4103 (2012)), ad esempio misurando affaticamento, sudorazione notturna, prurito, disturbi addominali, dolore sotto le costole sul lato sinistro, sazietà precoce, e dolore osseo (ad esempio in soggetti che ricevono luspatercept; ad esempio in soggetti che conseguono una riduzione $\geq 50\%$ dei sintomi di affaticamento misurati mediante MPN-SAF. In alcune forme di realizzazione, una risposta dell'anemia viene misurata in relazione alla proporzione di soggetti che conseguono una riduzione $\geq 50\%$ nel punteggio totale dei sintomi (TSS), registrato e giudicato tramite il modulo di valutazione dei sintomi di neoplasia mieloproliferativa (MPN-SAF) modificato, (si veda Emanuel et al., "Emanuel et al., "Myeloproliferative Neoplasm (MPN) Symptom Assessment Form Total Symptom Score: Prospective International Assessment of an Abbreviated Symptom Burden Scoring System Among Patients With MPNs", J. Clin. Oncol. 30(33):4098-4103 (2012), ad esempio misurando affaticamento, sudorazioni notturne, prurito, disturbi addominali, dolore sotto le costole sul lato sinistro, sazietà precoce e dolore osseo (ad esempio in soggetti che ricevono luspatercept). In alcune forme di realizzazione, una risposta dell'anemia viene misurata in relazione a misure della qualità della vita correlata alla salute (HRQoL), ad esempio cambiamenti medi di misura nei punteggi del dominio

del questionario HRQoL rispetto ai punteggi basali (ad esempio in soggetti che ricevono luspatercept). In alcune forme di realizzazione, una risposta dell'anemia viene misurata in relazione ai punteggi dei questionari EQ-5D-5L (EuroQol, Rotterdam, Paesi Bassi), ad esempio misurando cambiamenti medi nei punteggi del dominio del questionario EQ-5D-5L rispetto ai punteggi basali (ad esempio in soggetti che ricevono luspatercept). In alcune forme di realizzazione, una risposta dell'anemia viene misurata in relazione ad eventi avversi (EA), ad esempio il tipo, la frequenza e la gravità di eventi avversi (ad esempio in soggetti che ricevono luspatercept). In alcune forme di realizzazione, una risposta dell'anemia viene misurata usando anticorpi anti-farmaco (ADA) (ad esempio frequenza di anticorpi anti-farmaco ed effetti su efficacia, sicurezza o farmacocinetica in soggetti che ricevono luspatercept). In alcune forme di realizzazione, una risposta dell'anemia viene misurata usando parametri farmacocinetici, ad esempio curva concentrazione plasmatica-tempo, area sotto la curva (AUC), Cmax (ad esempio per soggetti che ricevono luspatercept).

[0145] In certe forme di realizzazione, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrata tramite iniezione. In certe forme di realizzazione, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrata per via sottocutanea. In certe forme di realizzazione, la dose dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrata una volta ogni 3 settimane. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In

forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica consistente nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11. In forme di realizzazione specifiche, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è un polipeptide consistente nella sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO:11. In una forma di realizzazione preferita, l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è luspatercept.

Saggi

[0146] Varie varianti di polipeptide di ActRIIB, o varianti di polipeptide di ActRIIB solubile, possono essere testate per la loro capacità di inibire la segnalazione di ActRIIB. In aggiunta, composti possono essere testati per la loro capacità di inibire la segnalazione di ActRIIB. Una volta confermata un'attività di inibitori di segnalazione di ActRIIB, questi composti possono essere usati con i metodi forniti nella presente. I saggi seguenti sono descritti per ActRIIA ma possono essere eseguiti in modo analogo per ActRIIB.

[0147] Ad esempio, può essere giudicato l'effetto di una variante di polipeptide di ActRIIA sull'espressione di geni coinvolti nella produzione ossea o nella distruzione ossea. Se necessario, ciò può essere eseguito in presenza di una o più proteine ligando di ActRIIA ricombinanti (ad esempio attivina), e le cellule possono essere trasfettate in modo da produrre un polipeptide di ActRIIA e/o sue varianti e, facoltativamente, un ligando di ActRIIA. Allo stesso modo, un polipeptide di ActRIIA può essere somministrato a un topo o altro animale, e possono essere giudicate una o più proprietà dell'osso, come la densità o il

volume. Può anche essere giudicato il tasso di guarigione di fratture ossee. L'assorbimetria a raggi X a doppia energia (DEXA) è una tecnica quantitativa consolidata, non invasiva per giudicare la densità ossea in un animale. Negli esseri umani, i sistemi DEXA centrali possono essere usati per giudicare la densità ossea nella colonna vertebrale e nel bacino. Questi sono i migliori predittori della densità ossea complessiva. I sistemi DEXA periferici possono essere usati per valutare la densità ossea nelle ossa periferiche, incluse, ad esempio, le ossa della mano, del polso, della caviglia e del piede. I tradizionali sistemi di imaging a raggi X, incluse le scansioni CAT, possono essere usati per giudicare la crescita ossea e la guarigione delle fratture. In aggiunta, la densità ossea può essere misurata usando la tomografia computerizzata quantitativa (qCT). Può anche essere valutata la resistenza meccanica dell'osso.

[0148] In certi aspetti, nella presente viene fornito l'uso di polipeptidi di ActRIIA (ad esempio polipeptidi di ActRIIA solubile) e polipeptidi di attivina per identificare composti (agenti) che sono agonisti o antagonisti della via di segnalazione attivina-ActRIIA. I composti identificati attraverso questo screening possono essere testati per giudicare la loro capacità di modulare la crescita o la mineralizzazione ossea in vitro. Facoltativamente, questi composti possono essere ulteriormente testati in modelli animali per giudicare la loro capacità di modulare la crescita dei tessuti in vivo.

[0149] Vi sono numerosi approcci allo screening di agenti terapeutici per la modulazione della crescita dei tessuti prendendo come bersaglio attivina e polipeptidi di ActRIIA. In certe forme di realizzazione, può essere effettuato uno screening ad alto rendimento di composti per identificare agenti che perturbano gli effetti mediati da attivina o ActRIIA sull'osso. In certe forme di realizzazione, il saggio viene effettuato per eseguire uno screening di, e identificare, composti che inibiscono o riducono specificamente il legame di un polipeptide di ActRIIA ad attivina. In alternativa, il saggio può essere usato per identificare composti che potenziano il legame di un polipeptide di ActRIIA ad attivina. In un'ulteriore forma di realizzazione, i composti possono essere identificati dalla loro capacità di interagire con un polipeptide di attivina o ActRIIA.

[0150] Sarà sufficiente una varietà di formati di saggio e, alla luce della presente divulgazione, quelli non espressamente descritti nella presente saranno comunque compresi da un comune tecnico del ramo. Come descritto nella presente, i composti di test (agenti) usati nella presente possono essere creati mediante qualsiasi metodo chimico combinatoriale. In alternativa, i composti in oggetto possono essere biomolecole presenti in natura sintetizzate in vivo o in vitro. I composti (agenti) da testare per la loro capacità di agire come modulatori di crescita tissutale possono essere prodotti, ad esempio, da batteri, lieviti, piante o altri organismi (ad esempio prodotti naturali), prodotti chimicamente (ad esempio piccole molecole, inclusi peptidomimetici) o prodotti in modo ricombinante. Composti di test contemplati nella presente includono molecole organiche non peptidiliche, peptidi, polipeptidi, peptidomimetici,

zuccheri, ormoni, e molecole di acido nucleico. In una forma di realizzazione specifica, l'agente di test è una piccola molecola organica avente un peso molecolare inferiore a circa 2.000 dalton.

[0151] I composti di test possono essere forniti come singole entità discrete o forniti in librerie di maggiore complessità, come quelle realizzate mediante chimica combinatoriale. Queste librerie possono comprendere, ad esempio, alcoli, alogenuri di alchile, ammine, ammidi, esteri, aldeidi, eteri e altre classi di composti organici. La presentazione di composti di test al sistema di test può essere in forma isolata o come miscele di composti, specialmente nei passaggi iniziali di screening. Facoltativamente, i composti possono essere derivatizzati con altri composti e avere gruppi derivatizzanti che facilitano l'isolamento dei composti. Esempi non limitativi di gruppi derivatizzanti includono biotina, fluoresceina, digossigenina, proteina fluorescente verde, isotopi, polistidina, biglie magnetiche, glutatione S transferasi (GST), reticolanti fotoattivabili o qualsiasi loro combinazione.

[0152] In molti programmi di screening di farmaci che testano librerie di composti ed estratti naturali, sono desiderabili saggi ad alto rendimento al fine di massimizzare il numero di composti esaminati in un dato periodo di tempo. Saggi che vengono eseguiti in sistemi privi di cellule, come quelli che possono essere derivati con proteine purificate o semi-purificate, sono spesso preferiti come screening "primari" in quanto possono essere generati in modo da permettere uno sviluppo rapido e un rilevamento relativamente facile di

un'alterazione in un bersaglio molecolare che è mediata da un composto di test. Oltretutto, gli effetti di tossicità cellulare o biodisponibilità del composto di test possono essere generalmente ignorati nel sistema in vitro, il saggio essendo invece focalizzato principalmente sull'effetto del farmaco sul bersaglio molecolare come può manifestarsi in un'alterazione dell'affinità di legame tra un polipeptide di ActRIIA e attivina.

[0153] Semplicemente per illustrare, in un saggio di screening esemplificativo, il composto di interesse viene messo a contatto con un polipeptide di ActRIIA isolato e purificato che è normalmente in grado di legarsi ad attivina. Alla miscela del composto e del polipeptide di ActRIIA viene quindi aggiunta una composizione contenente un ligando di ActRIIA. Il rilevamento e la quantificazione dei complessi ActRIIA/attivina fornisce un mezzo per determinare l'efficacia del composto nell'inibire (o intensificare) la formazione di complessi tra il polipeptide di ActRIIA e attivina. L'efficacia del composto può essere giudicata generando curve dose-risposta dai dati ottenuti usando varie concentrazioni del composto di test. Oltretutto, è anche possibile eseguire un saggio di controllo per fornire un basale per il confronto. Ad esempio, in un saggio di controllo, attivina isolata e purificata viene aggiunta a una composizione contenente il polipeptide di ActRIIA, e la formazione di complesso ActRIIA/attivina viene quantificata in assenza del composto di test. Si comprenderà che, in generale, l'ordine in cui i reagenti substrato possono essere miscelati può essere variato, e che possono essere miscelati simultaneamente. Oltretutto, al posto di proteine purificate, possono essere

usati estratti cellulari e lisati a rendere un sistema di saggio privo di cellule adatto.

[0154] La formazione di complessi tra il polipeptide di ActRIIA e attivina può essere rilevata mediante una varietà di tecniche. Ad esempio, la modulazione della formazione di complessi può essere quantificata usando, ad esempio, proteine marcate in modo rilevabile, ad esempio radiomarcate (ad esempio ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C o ^3H), con marcatura fluorescente (ad esempio FITC), o polipeptide di ActRIIA o di attivina marcato enzimaticamente, mediante saggio immunologico o rilevamento cromatografico.

[0155] In certi casi, nella presente è contemplato l'uso di saggi di polarizzazione di fluorescenza e saggi di trasferimento di energia per risonanza di fluorescenza (FRET) nel misurare, direttamente o indirettamente, il grado di interazione tra un polipeptide di ActRIIA e una sua proteina di legame. Inoltre, altre modalità di rilevamento, come quelle basate su guide d'onda ottiche (pubblicazione PCT WO 96/26432 e brevetto statunitense n. 5,677,196), risonanza plasmonica di superficie (SPR), sensori di carica superficiale e sensori di forza superficiale, sono compatibili con molte forme di realizzazione descritte nella presente.

[0156] Oltretutto, un saggio di trappola di interazione, noto anche come "saggio a due ibridi", può essere usato per identificare agenti che interrompono o intensificano l'interazione tra un polipeptide di ActRIIA e una sua proteina di

legame. Si vedano, ad esempio, il brevetto statunitense 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). In una forma di realizzazione specifica, nella presente è contemplato l'uso di sistemi a due ibridi inversi per identificare composti (ad esempio piccole molecole o peptidi) che dissociano le interazioni tra un polipeptide di ActRIIA e una sua proteina di legame. Si vedano, ad esempio, Vidal e Legrain, (1999) *Nucleic Acids Res* 27:919-29; Vidal e Legrain, (1999) *Trends Biotechnol* 17:374-81; e il brevetto statunitense n. 5,525,490; 5,955,280; e 5,965,368.

[0157] In certi casi, i composti in oggetto sono identificati dalla loro capacità di interagire con un polipeptide di ActRIIA o di attivina. L'interazione tra il composto e il polipeptide di ActRIIA o di attivina può essere covalente o non covalente. Ad esempio, tale interazione può essere identificata a livello di proteina usando metodi biochimici in vitro, tra cui fotoreticolazione, legame a ligando radiomarcato e cromatografia di affinità (Jakoby W B et al., 1974, *Methods in Enzymology* 46: 1). In certi casi, i composti possono essere sottoposti a screening in un saggio basato su meccanismo, come un saggio per rilevare composti che si legano a un polipeptide di attivina o ActRIIA. Ciò può includere un evento di legame in fase solida o in fase fluida. In alternativa, il gene codificante un polipeptide di attivina o ActRIIA può essere trasfettato con un sistema reporter (ad esempio β -galattosidasi, luciferasi, o proteina fluorescente verde) in una cellula e sottoposto a screening rispetto alla libreria,

preferibilmente mediante screening ad alto rendimento o con singoli membri della libreria. Possono essere usati altri saggi di legame basati su meccanismo, ad esempio saggi di legame che rilevano cambiamenti nell'energia libera. I saggi di legame possono essere eseguiti con il bersaglio fissato a un pozzetto, una biglia o un chip, o catturato da un anticorpo immobilizzato o risolto mediante elettroforesi capillare. I composti legati possono essere rilevati di solito usando colorimetria o fluorescenza o risonanza plasmonica di superficie.

6. ESEMPI

6.1 ESEMPIO 1: STUDIO MULTICENTRICO DI FASE 2, IN APERTO, PER LA VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA E DELLA SICUREZZA DI LUSPATERCEPT IN SOGGETTI CON MIELOFIBROSI ASSOCIATA A NEOPLASIA MIELOPROLIFERATIVA E ANEMIA CON E SENZA DIPENDENZA DA TRASFUSIONE DI GLOBULI ROSSI

[0158] Questo esempio riguarda uno studio multicentrico di fase 2, in aperto, per la valutazione di luspatercept, un inibitore di segnalazione di ActRIIB, in soggetti con mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa che hanno anemia con e senza dipendenza da trasfusioni di globuli rossi. Lo studio è suddiviso in un periodo di screening, un periodo di trattamento (consistente in una fase primaria, un giudizio sulla risposta della malattia al giorno 169 e una fase di estensione), cui fa seguito un periodo di follow-up post-trattamento. La finalità di questo studio di fase 2 è valutare se vi sia un segnale di efficacia con luspatercept in pazienti con MF associata a MPN che sono anemici e che

possono essere o meno dipendenti da trasfusioni di RBC correggendo l'eritropoiesi inefficace e attenuando così l'anemia, una condizione che si sviluppa in quasi tutti i pazienti con MF associata a MPN (di cui l'affaticamento è un sintomo).

[0159] I soggetti che soddisfano i criteri di ammissibilità vengono assegnati a 1 delle seguenti coorti (con arruolamento in parallelo) in base alla loro ammissibilità: (I) Coorte 1: contiene fino a 20 soggetti con solamente anemia che non stanno attualmente ricevendo trasfusioni di RBC (a questi soggetti si fa riferimento come "solamente anemia" in tutto questo esempio, definiti come coloro che hanno ricevuto 0 unità di globuli rossi/84 giorni immediatamente precedenti la data Giorno 1 del Ciclo 1 (C1D1)); (II) Coorte 2: contiene fino a 20 soggetti che sono dipendenti da trasfusioni di RBC (a questi soggetti si fa riferimento come "dipendenti da trasfusioni di RBC" in tutto questo esempio, definiti come coloro che hanno ricevuto una frequenza media di trasfusioni di RBC da 2 a 4 unità di RBC/28 giorni per almeno gli 84 giorni immediatamente precedenti la data C1D1); (III) Coorte 3A: contiene ≥ 10 soggetti (la Coorte 3 contiene 30 soggetti in totale) che soddisfano i criteri di ammissibilità per la Coorte 1 (solamente anemia) mentre assumono una dose stabile di ruxolitinib per almeno 112 giorni immediatamente prima della data di arruolamento; e (IV) Coorte 3B: contiene ≥ 10 soggetti (la Coorte 3 contiene 30 soggetti in totale) che soddisfano i criteri di ammissibilità per la Coorte 2 (dipendenti da trasfusione di RBC) mentre assumono una dose stabile di ruxolitinib per almeno 112 giorni immediatamente prima della data di arruolamento.

Complessivamente, lo studio arruolerà approssimativamente 70 soggetti in tutto il mondo.

6.1.1 Misure di esito primarie

[0160] Di seguito sono riportate le misure di esito primarie per la sperimentazione di Fase 2: (i) risposta dell'anemia in relazione ad un aumento di emoglobina (Hgb) (proporzione di soggetti delle coorti 1 e 3A che conseguono un aumento di emoglobina $\geq 1,5$ g/dl rispetto al basale in qualsiasi periodo consecutivo di 84 giorni senza una trasfusione di RBC; l'intervallo di tempo delle misurazioni è approssimativamente fino al giorno 168); (ii) risposta dell'anemia in relazione ad un aumento di indipendenza da trasfusioni di globuli rossi (RBC) (proporzione di soggetti delle coorti 2 e 3B che diventano liberi da trasfusioni di RBC in qualsiasi periodo consecutivo di 84 giorni; l'intervallo di tempo delle misurazioni è approssimativamente fino al giorno 168); (iii) tempo di risposta dell'anemia (tempo dalla prima dose di luspatercept al primo esordio di risposta dell'anemia in ciascuna delle coorti; l'intervallo di tempo delle misurazioni è approssimativamente fino a 2 anni). (iv) durata di risposta dell'anemia (la durata massima di risposta dell'anemia in ciascuna delle coorti; l'intervallo di tempo delle misurazioni è approssimativamente fino a 2 anni); (v) frequenza di trasfusioni di RBC (il numero medio di unità di RBC trasfuse per soggetto ogni quattro settimane; l'intervallo di tempo delle misurazioni è approssimativamente fino a 2 anni); (vi) frequenza di dipendenza da trasfusioni di RBC (proporzione di soggetti dipendenti da trasfusioni di RBC che riducono il loro carico trasfusionale di $\geq 50\%$ rispetto al basale in qualsiasi periodo

consecutivo di 84 giorni; l'intervallo di tempo delle misurazioni è approssimativamente fino a 2 anni); (vii) proporzione di soggetti che conseguono una riduzione $\geq 50\%$ del sintomo di affaticamento, un sintomo comune tra i pazienti con mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa che hanno anemia, registrato e giudicato tramite il modulo di valutazione dei sintomi di neoplasia mieloproliferativa (MPN-SAF) modificato, (*si veda* Emanuel et al., "Myeloproliferative Neoplasm (MPN) Symptom Assessment Form Total Symptom Score: Prospective International Assessment of an Abbreviated Symptom Burden Scoring System Among Patients With MPNs", J. Clin. Oncol. 30(33):4098-4103 (2012); l'intervallo di tempo delle misurazioni è di approssimativamente 2 anni); (viii) la proporzione di soggetti che conseguono una riduzione $\geq 50\%$ nel punteggio totale dei sintomi (TSS). Sintomi correlati a mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa (MPN) (affaticamento, sudorazioni notturne, prurito, disturbi addominali, dolore sotto le costole sul lato sinistro, sazietà precoce e dolore osseo) registrati e giudicati tramite il modulo di valutazione dei sintomi di neoplasia mieloproliferativa (MPN-SAF) modificato, (*si veda* Emanuel et al., "Myeloproliferative Neoplasm (MPN) Symptom Assessment Form Total Symptom Score: Prospective International Assessment of an Abbreviated Symptom Burden Scoring System Among Patients With MPNs", J. Clin. Oncol. 30(33):4098-4103 (2012); (ix) Qualità della vita correlata alla salute (HRQoL): misurazione di cambiamenti medi nei punteggi del dominio del questionario HRQoL nel corso dello studio vengono confrontati con i punteggi al basale (l'intervallo di tempo delle misurazioni è approssimativamente fino a 2 anni); (x) Questionari EQ-5D-5L

(EuroQol, Rotterdam, Paesi Bassi): cambiamenti medi di misura nei punteggi del dominio del questionario EQ-5D-5L nel corso dello studio vengono confrontati con i punteggi al basale (l'intervallo di tempo delle misurazioni è approssimativamente fino a 2 anni); (xi) eventi avversi (EA) (inclusi il tipo, la frequenza e la gravità, vengono valutati; l'intervallo di tempo delle misurazioni è approssimativamente fino a 2 anni); (xii) anticorpi anti-farmaco (ADA) (frequenza di anticorpi anti-farmaco ed effetti su efficacia, sicurezza o farmacocinetica; l'intervallo di tempo delle misurazioni è approssimativamente fino a 2 anni); (xiii) farmacocinetica (area sotto la curva (AUC) e Cmax; l'intervallo di tempo delle misurazioni è approssimativamente fino a 2 anni); e (xiv) Giudizio funzionale su terapia anticancro - anemia (FACT-An): misurazione di cambiamenti medi nei punteggi del dominio del questionario FACT-An durante lo studio vengono confrontati con i punteggi al basale (l'intervallo di tempo delle misurazioni è approssimativamente fino a 2 anni).

6.1.2 Criteri di inclusione

[0161] I soggetti devono soddisfare i criteri indicati in questa sezione per essere arruolati nello studio (la data di arruolamento essendo definita come la data in cui al soggetto viene assegnata una coorte in Integrated Response Technology [IRT]) e riceve la prima dose di luspatercept.

[0162] Il soggetto deve avere ≥ 18 anni al momento della firma del modulo di consenso informato (ICF).

[0163] Il soggetto ha mielofibrosi associata a MPN (PMF, MF post-PV e/o MF post-ET), come confermato dal referto patologico locale.

[0164] Il soggetto ha anemia definita come: (I) Coorti 1 e 3A: (a) il soggetto ha ≥ 3 livelli di Hgb $\leq 9,5$ g/dl registrati in ≥ 3 giorni differenti, incluso il giorno della somministrazione, nel periodo di 84 giorni immediatamente precedente la data C1D1; non sono arruolati soggetti con un intervallo ≥ 42 giorni tra misurazioni di emoglobina; e (b) non devono esserci trasfusioni di RBC entro il periodo di 84 giorni immediatamente precedenti la data C1D1; e (11) Coorti 2 e 3B: (a) il soggetto ha una frequenza media di trasfusioni di RBC da 2 a 4 unità di RBC/28 giorni per almeno gli 84 giorni immediatamente precedenti la data C1D1; non deve esserci alcun intervallo > 42 giorni senza ≥ 1 trasfusione di RBC; (b) i soggetti devono avere un valore di Hgb ≤ 13 g/dl a C1D1 prima della somministrazione di luspatercept; (c) solo le trasfusioni di RBC date quando l'Hgb era $\leq 9,5$ g/dl vengono conteggiate per determinare l'ammissibilità; e (d) le trasfusioni di RBC date a causa di emorragia, infezione o anemia indotta da chemioterapia non vengono conteggiate per determinare l'ammissibilità.

[0165] Il soggetto ha un punteggio di validità ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) ≤ 2 . *Si veda*, ad esempio, Oken et al. (1982). "Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group". Am. J. Clin. Oncol. 5 (6): 649-55, in merito al punteggio di validità dell'ECOG. Un soggetto con un punteggio di validità dell'ECOG pari a 0 è asintomatico (ossia completamente attivo, in grado di svolgere tutte le attività precedenti alla

malattia senza restrizioni). Un soggetto con un punteggio di validità dell'ECOG pari a 1 è sintomatico ma completamente deambulante (ossia limitato nelle attività fisiche faticose ma deambulante e in grado di svolgere lavori di natura leggera o sedentaria, ad esempio lavori domestici leggeri, lavoro d'ufficio). Un soggetto con un punteggio di validità dell'ECOG pari a 2 è sintomatico, è a letto <50% del tempo durante il giorno (ossia è deambulante e in grado di prendersi cura di sé, ma non è in grado di svolgere alcuna attività lavorativa; fino al, e per circa più del, 50% delle ore di veglia). Un soggetto con un punteggio di validità dell'ECOG pari a 3 è sintomatico, è a letto >50% del tempo, ma non è costretto a letto (ossia è in grado di prendersi cura di sé solo in modo limitato, è costretto a letto o su una sedia per il 50% o più delle ore di veglia). Un soggetto con un punteggio di validità dell'ECOG pari a 4 è costretto a letto (ossia completamente disabile; incapace di prendersi cura di sé; totalmente costretto a letto o su una sedia). Un soggetto avente un punteggio di validità dell'ECOG pari a 5 è morto.

[0166] Non è previsto che il soggetto riceva un trapianto di cellule emopoietiche durante i 6 mesi successivi alla data C1D1.

[0167] Per questo studio, una donna in età fertile (FCBP) è definita come una donna che: (1) ha raggiunto il menarca ad un certo punto; e (2) non ha subito un'isterectomia o una terapia bilaterale (non esclude la possibilità di avere figli) per almeno 24 mesi consecutivi (ossia ha avuto le mestruazioni in qualsiasi momento nei precedenti 24 mesi consecutivi). Una FCBP che partecipa allo studio deve: (a) avere 2 test di gravidanza negativi verificati dal Ricercatore

prima di iniziare la terapia in studio; deve accettare di continuare a sottoporsi a test di gravidanza durante il corso dello studio e dopo la fine del trattamento in studio, anche se il soggetto pratica una vera astinenza dai contatti eterosessuali; e (b) impegnarsi a una vera astinenza dai contatti eterosessuali (che deve essere riesaminata mensilmente e la cui fonte deve essere documentata) o accettare di usare, ed essere in grado di rispettare, una contraccezione efficace senza interruzione 28 giorni prima di iniziare il prodotto sperimentale, durante la terapia in studio (incluse le interruzioni della dose) e per 12 settimane (approssimativamente 5 volte l'emivita terminale media di luspatercept sulla base dei dati di farmacocinetica [PK] per dosi multiple) dopo l'interruzione della terapia in studio.

[0168] I soggetti di sesso maschile devono: (a) praticare una vera astinenza (che deve essere riesaminata mensilmente) o accettare di usare un preservativo durante i rapporti sessuali con una donna incinta o una donna in età fertile durante la partecipazione allo studio, durante le interruzioni della dose e per almeno 12 settimane (circa 5 volte l'emivita terminale media di luspatercept sulla base dei dati di farmacocinetica per dosi multiple) dopo l'interruzione del prodotto sperimentale, anche se si è sottoposto con successo a una vasectomia.

[0169] Il soggetto deve comprendere e firmare volontariamente un modulo di consenso informato prima che venga condotta qualsiasi valutazione/procedura correlata allo studio.

[0170] Il soggetto è disposto e in grado di aderire al programma di visite dello studio e ad altri requisiti del protocollo.

6.1.3 Metodo di trattamento

[0171] La dose di luspatercept è di 1,75 mg/kg.

[0172] Luspatercept viene somministrato al soggetto per via sottocutanea una volta ogni 21 giorni per un massimo di 2 anni.

6.2 ESEMPIO 2

6.2.1 Contesto

[0173] La mielofibrosi (MF) associata a neoplasia mieloproliferativa (MPN) è una neoplasia mieloide clonale caratterizzata da fibrosi del midollo osseo, funzionalità midollare difettosa, emopoiesi extramidollare, una propensione alla trasformazione alla fase blastica e infiammazione (Mesa RA, et al. *Leuk Res.* 2011;35(1):12-13). L'anemia e la dipendenza da trasfusioni (TD) di globuli rossi (RBC) sono variabili prognostiche e predittive avverse indipendenti per la sopravvivenza tra questi pazienti (Passamonti F, et al. *Blood.* 2010;115(9): 1703-1708; Elena C, et al. *Haematologica.* 2011;96(1): 167-170).

[0174] Luspatercept è una proteina di fusione ricombinante consistente in un recettore per attivina di tipo IIB modificato collegato al dominio Fc di

immunoglobulina G1 umana (IgG1) (Figura 1) (Attie KM, et al. Am J Hematol. 2014;89(7):766-770; Suragani RN, et al. Nat Med. 2014;20(4):408-414). Luspatercept agisce come agente di maturazione eritroide legando specifici ligandi della superfamiglia del fattore di crescita trasformante- β (TGF- β) come il fattore di crescita e differenziazione-11 (GDF11), bloccando il loro effetto inibitorio e portando a una aumentata produzione di RBC (Suragani RN, et al. Nat Med. 2014;20(4):408-414). In un recente studio di Fase 2, è stato mostrato che luspatercept è efficace e ben tollerato per il trattamento dell'anemia nei pazienti con sindromi mielodisplastiche a basso rischio (Platzbecker U, et al. Lancet Oncol. 2017;18(10):1338-1347).

[0175] L'obiettivo di questa sperimentazione clinica è valutare l'efficacia e la sicurezza del luspatercept per il trattamento dell'anemia in pazienti con MF associata a MPN con o senza RBC-TD.

6.2.2 Dettagli dello studio

[0176] Questo esempio riguarda uno studio di Fase 2 multicentrico, in aperto, in corso.

6.2.3 Popolazione dello studio

[0177] I criteri di inclusione per questo studio sono: (i) età \geq 18 anni; (ii) MF associata a MPN (MF primaria, MF post-policitemia vera o MF post-trombocitemia essenziale); (iii) Anemia, definita come: (a) Coorti 1 e 3a: \geq 3 livelli di emoglobina (Hb) \leq 9,5 g/dl in \geq 3 giorni (incluso il giorno della

somministrazione), senza trasfusioni di RBC negli 84 giorni prima del giorno 1 ciclo 1 (C1D1); saranno esclusi ≥ 42 giorni tra le misurazioni; (b) Coorti 2 e 3b: frequenza media di trasfusioni di RBC di 2-4 unità di globuli rossi/28 giorni in ≥ 84 giorni prima di C1D1, senza intervallo > 42 giorni senza ≥ 1 trasfusione di RBC; Hb < 13 g/dl a C1D1 prima della somministrazione di luspatercept; e (iv) stato di validità dell'Eastern Cooperative Oncology Group ≤ 2 .

6.2.4 Disegno dello studio e trattamento:

[0178] Lo studio comprende 3 periodi (Figura 2): (i) Periodo di screening; (ii) Periodo di trattamento (fase primaria, giudizio sulla risposta della malattia al giorno 169 e fase di estensione); e (iii) Periodo di follow-up post-trattamento.

(a) Periodo di screening

[0179] Tutte le procedure di screening vengono condotte ≤ 28 giorni prima dell'arruolamento.

(b) Periodo di trattamento

[0180] Tutti i pazienti riceveranno luspatercept 1 mg/kg per via sottocutanea il giorno 1 di ciascun ciclo di 21 giorni. I pazienti saranno arruolati in coorti in base al requisito di trasfusione di RBC: (i) Coorti 1 e 3a (solamente anemia); e (ii) Coorti 2 e 3b (RBC-TD). In combinazione al trattamento in studio, potrà essere usata la migliore terapia di supporto. Il giudizio sulla risposta della malattia deve essere completato al giorno 169 dopo la somministrazione della prima dose del

trattamento in studio. I soggetti con risposta possono proseguire il trattamento per altri 1,5 anni. I soggetti senza risposta interromperanno il trattamento.

(c) Periodo di follow-up post-trattamento

[0181] Dopo l'interruzione del trattamento, i dati di follow-up sulla sicurezza saranno raccolti fino a 42 giorni dopo l'ultima dose del trattamento in studio. I dati sulla sicurezza saranno poi raccolti ogni 3 mesi per un massimo di 3 anni dopo l'ultima dose del trattamento in studio o fino al decesso, alla revoca del consenso o alla perdita al follow-up.

6.2.5 Endpoint

[0182] Gli endpoint primari e secondari sono elencati nella Tabella 1 (sotto). Gli endpoint esplorativi includono risposta all'esposizione al trattamento, biomarcatori e analisi mutazionali. Tutte le analisi di efficacia saranno eseguite principalmente sulla popolazione con intenzione di trattamento, definita come tutti i pazienti arruolati. Le analisi di efficacia confermative saranno eseguite sulla popolazione valutabile per l'efficacia, definita come tutti i pazienti che: (i) hanno ricevuto ≥ 3 cicli di trattamento in studio e sono rimasti in studio per ≥ 21 giorni dopo la terza dose in studio; o (ii) hanno raggiunto Hb > 13 g/dl in < 3 cicli. Le analisi di sicurezza saranno eseguite su tutti i pazienti che riceveranno ≥ 1 dose del trattamento in studio. Gli eventi avversi e le anomalie di laboratorio sono classificati secondo la versione 4.03 di NCI-CTCAE. Le analisi di farmacocinetica si baseranno su tutti i pazienti con dati di concentrazione valutabili per determinare i parametri farmacocinetici.

6.2.6 Analisi statistiche

[0183] Verranno usate principalmente analisi statistiche descrittive. Per stimare la durata della risposta dell'anemia può essere usato il metodo Kaplan-Meier. Non verranno eseguiti confronti inferenziali tra le coorti.

6.2.7 Stato dello studio

[0184] L'arruolamento è iniziato nel novembre 2017. L'obiettivo di arruolamento è di 70 pazienti con MF associata a MPN e anemia, con o senza RBC-TD. Al 9 aprile 2018, in 24 centri clinici, sono stati arruolati nello studio 12 pazienti.

Tabella 1. Endpoint dello studio

Endpoint	Coorti 1 e 3a (solamente anemia)	Coorti 2 e 3b (RBC-TD)
Primari	Aumento $\geq 1,5$ g/dl di Hb rispetto al basale in qualsiasi periodo consecutivo di 84 giorni senza una trasfusione di RBC	RBC-TI in qualsiasi periodo consecutivo di 84 giorni
Secondari	• Tempo di risposta dell'anemia	• Tempo di risposta dell'anemia
	• Durata di risposta dell'anemia	• Durata di risposta dell'anemia
	• Miglioramento della risposta dei sintomi (definito come riduzione $\geq 50\%$ dei sintomi di	• Frequenza di trasfusioni di RBC (unità medie di RBC/4 settimane)

Endpoint	Coorti 1 e 3a (solamente anemia)	Coorti 2 e 3b (RBC-TD)
	<p>affaticamento o riduzione $\geq 50\%$ del punteggio totale dei sintomi mediante MF-SAF o MPN-SAF)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Miglioramento di HRQoL • Sicurezza • Farmacocinetica • Anticorpi anti-farmaco 	<ul style="list-style-type: none"> • Frequenza di RBC-TD (definita come riduzione del carico trasfusionale $\geq 50\%$ rispetto al basale in qualsiasi periodo consecutivo di 84 giorni) • Miglioramento della risposta dei sintomi (definito come riduzione $\geq 50\%$ dei sintomi di affaticamento o riduzione $\geq 50\%$ del punteggio totale dei sintomi mediante MF-SAF o MPN-SAF) • Miglioramento di HRQoL • Sicurezza • Farmacocinetica • Anticorpi anti-farmaco
<p>Hb, emoglobina; HRQoL, qualità della vita correlata alla salute; MF-SAF, modulo di valutazione dei sintomi di mielofibrosi; MPN-SAF, modulo di valutazione dei sintomi di neoplasia mieloproliferativa; RBC, globuli rossi; TD, dipendenza da trasfusioni; TI, indipendenza da trasfusioni.</p>		

7. INFORMAZIONI SULLA SEQUENZA

[0185]

Tabella 2.

SEQ ID NO:	Descrizione	Sequenza
1	Dominio extracellulare di ActRIIA umano fuso con un dominio Fc umano	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDK DKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDR TDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEV TQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSV FLFPPKPKDILMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NYYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVIIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT YDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLS PGK
2	Sequenza leader di mellitina di api mellifere (HBML)	MKFLVNVALVFMVVYISYIYA
3	sequenza di proteina precursore di ActRIIB umano (A64)	

SEQ ID NO:	Descrizione	Sequenza
		MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAETRECIYYN ANWELERTNQSLGERCEGEQDKRLHCYASWANS SGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT LLTVLAYSLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGH VDIHEDPGPPPSPLVGLKPLQLEIKARGRFQCV WKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPG MKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGS LTDYLKGNITWNELCHVAETMSRGLSYLHEDVP WCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADF GLAVRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAI NFORDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPV DEYMLPFEEEIGQHPSSLEELQEVVHKKMRPTIKD HWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVE ERVSLIRRSVNGTTSCLVSLVTSVTNVDLPPKES SI
4	ActRIIB umano solubile (extracellulare), sequenza polipeptidica elaborata (amminoacidi 19-134 di SEQ ID NO:3)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLGERCEGE QDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEVTYEPPTAPT
5	ActRIIB umano solubile (extracellulare), sequenza polipeptidica elaborata con	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLGERCEGE QDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCY
	delezione dei 15 amminoacidi C-terminali (amminoacidi 19-119 di SEQ ID NO:3)	DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA

SEQ ID NO:	Descrizione	Sequenza
6	sequenza di acido nucleico codificante una proteina precursore di ActRIIB umano (A64)	<p> ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTC TGGGGATCGCTGTGGCCCGGCTCTGGGCGTGGG GAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAA CGCCAACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGA GCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGGCGAGCAGGAC AAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAAC AGCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGG CTGCTGGCTAGATGACTTCAACTGCTACGATAG GCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCG AGGTGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCT GCAACGAGCGCTTCACTCATTGCCAGAGGCTG GGGGCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCG ACAGCCCCACCCTGCTACGGTGTGGCCTAC TCACTGCTGCCATCGGGGGCCTTCCCTCATC GTCTGTGGCCTTTTGGATGTACCGGCATCGC AAGCCCCCTACGGTCATGTGGACATCCATGAG GACCCTGGGCCTCCACCACCATCCCCTCTGGTG GGCCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAA GGCTCGGGGGCGCTTTGGCTGTGTCTGGAAGGC CCAGCTCATGAATGACTTTGTAGCTGTCAAGAT CTTCCCACTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAG TGAACGGGAGATCTTACAGCACACCTGGCATGAA GCACGAGAACCCTGCTACAGTTCAATGCTGCCGA GAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAGCTGT GGCTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCC TCACGGATTACCTCAAGGGGAACATCATCAT GGAACGAACTGTGTCATGTAGCAGAGACGATG TCACGAGGCCTTCATACCTGCATGAGGATGTG CCCTGGTGCCGTGGCGAGGGCCACAAGCCGTCT ATTGCCACAGGGACTTTAAAAGTAAGAATGTA TTGCTGAAGAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCT GACTTTGGCTTGGCTGTTTCGATTTGAGCCAGGG AAACCTCCAGGGGACACCCACGGACAGGTAGG CACGAGACGGTACATGGCTCCTGAGGTGCTCGA GGGAGCCATCAACTTCCAGAGAGATGCCTTCCCT GCGCATTGACATGTATGCCATGGGGTTGGTGCT GTGGGAGCTTGTGTCTCGCTGCAAGGCTGCAGA CGGACCCGTGGATGAGTACATGCTGCCCTTTGA GGAAGAGATTGGCCAGCACCCCTTCGTTGGAGG </p>

SEQ ID NO:	Descrizione	Sequenza
		AGCTGCAGGAGGTGGTGGTGCACAAGAAGATG AGGCCACCATTAAAGATCACTGGTTGAAACAC CCGGGCCTGGCCAGCTTTGTGTGACCATCGAG GAGTGTGGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTG TCCGCGGGCTGTGTGGAGGAGCGGGTGTCCCTG ATTCGGAGGTCGGTCAACGGCACTACCTCGGAC TGTCCTGTTCCCTGGTGACCTCTGTCACCAATG TGGACCTGCCCCCTAAAGAGTCAAGCATCTAA
7	proteina di fusione comprendente un dominio extracellulare solubile di ActRIIB (A64; SEQ ID NO: 17) fuso con un dominio Fc	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGE QDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQKSLSL SPGK
8	proteina di fusione comprendente un dominio extracellulare solubile di ActRIIB (A64) con delezione dei 15 amminoacidi C-terminali (SEQ ID NO: 5) fuso con un dominio Fc	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGE QDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPVPPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:	Descrizione	Sequenza
9	ActRIIB umano solubile (extracellulare), sequenza polipeptidica elaborata con delezione dei 6 amminoacidi N-terminali del dominio EC e delezione dei 3 amminoacidi C-terminali del dominio EC (amminoacidi 25-131 di SEQ ID NO:14) e con una mutazione L79D	ETRECIYYNANWELERTNQGLERCEGEQDKRLH CYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVT YEPPPT
10	Proteina di fusione ActRIIB-Fc non elaborata	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAETRECIYY
	con delezione dei 6 amminoacidi N-terminali del dominio EC e delezione dei 3 amminoacidi C-terminali	NANWELERTNQGLERCEGEQDKRLHCYASWRN SSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTGGG THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCS VMHEALHNHYTQKSLSPGK*

SEQ ID NO:	Descrizione	Sequenza
	del dominio EC (amminoacidi 25-131 di SEQ ID NO:14) e con una mutazione L79D e con sequenza leader TPA	
11	Proteina di fusione ActRIIB-Fc elaborata con delezione dei 6 amminoacidi N-terminali del dominio EC e delezione dei 3 amminoacidi C-terminali del dominio EC (amminoacidi 25-131 di SEQ ID NO:14) e con una mutazione L79D (ossia luspatercept)	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLH CYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVT YEPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
12	ActRIIB umano solubile (extracellulare), sequenza polipeptidica elaborata	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQ DKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEVTYEPPTAPT

SEQ ID NO:	Descrizione	Sequenza
	(amminoacidi 20-134 di SEQ ID NO:3)	
13	ActRIIB umano solubile (extracellulare), sequenza polipeptidica elaborata con delezione dei 15 amminoacidi C-terminali (amminoacidi 20-119 di SEQ ID NO:3)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQ DKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE A
14	sequenza di proteina precursore di ActRIIB umano (R64)	MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAETRECIYYN ANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNS SGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHI.PEAGGPFTYFPPPTAPT LLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGH VDIHEDPGPPPSPLVGLKPLQLEIKARGRFGCV WKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPG MKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGS LTDYLKGNITWNECHVAETMSRGLSYLHEDVP WCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADF
		GLAVRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAI NFQDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPV DEYMLPFEEEIGQHPSEELQEVVHKKMRPTIKD IWLKIIPGLAQLCVTIEECWDIIDAEARLSAGCVE ERVSLIRRSVNGTTSCLVSLVTSVTNVDLPPKES SI

SEQ ID NO:	Descrizione	Sequenza
15	ActRIIB umano solubile (extracellulare), sequenza polipeptidica elaborata (amminoacidi 19-134 di SEQ ID NO: 14)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGE QDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEVTYEPPTAPT
16	ActRIIB umano solubile (extracellulare), sequenza polipeptidica elaborata con delezione dei 15 amminoacidi C-terminali (amminoacidi 19-119 di SEQ ID NO:14)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGE QDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA
17	ActRIIB umano solubile (extracellulare), sequenza polipeptidica elaborata (amminoacidi 20-134 di SEQ ID NO:14)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEVTYEPPTAPT
18	ActRIIB umano solubile (extracellulare), sequenza polipeptidica elaborata con	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA

SEQ ID NO:	Descrizione	Sequenza
	<p>delezione dei 15 amminoacidi C-terminali (amminoacidi 20-119 di SEQ ID NO:14)</p>	
19	<p>ActRIIB umano solubile (extracellulare), sequenza polipeptidica elaborata con delezione dei 6 amminoacidi N-terminali del dominio EC e delezione dei 3 amminoacidi C-terminali del dominio EC (amminoacidi 25-131 di SEQ ID NO:3) e con una mutazione L79D</p>	<p>ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLH CYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTIILPEAGGPEVT YEPPT</p>
20	<p>Proteina di fusione ActRIIB-Fc non elaborata con delezione dei 6 amminoacidi N-terminali</p>	

SEQ ID NO:	Descrizione	Sequenza
	<p>del dominio EC e delezione dei 3 amminoacidi C-terminali del dominio EC (amminoacidi 25-131 di SEQ ID NO:3) e con una mutazione L79D e con sequenza leader TPA</p>	<p>MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAETRECIYY NANWELERTNQGLERCEGEQDKRLHCYASWAN SSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTGGG THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEFWEVSNQGPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*</p>
21	<p>Proteina di fusione ActRIIB-Fc elaborata con delezione dei 6 amminoacidi N-terminali del dominio EC e delezione dei 3 amminoacidi C-terminali del dominio EC (amminoacidi 25-131 di SEQ ID NO:3) e con una mutazione L79D</p>	<p>ETRECIYYNANWELERTNQGLERCEGEQDKRLH CYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVT YEPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*</p>

SEQ ID NO:	Descrizione	Sequenza
22	ActRIIB umano solubile (extracellulare), sequenza polipeptidica elaborata (amminoacidi 20-134 di SEQ ID NO: 14) con mutazione L79D	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEVTYEPPTAPT
23	ActRIIB umano solubile (extracellulare), sequenza polipeptidica elaborata (amminoacidi 20-134 di SEQ ID NO:3) con mutazione L79D	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQ DKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEVTYEPPTAPT
24	ActRIIB umano solubile (extracellulare), sequenza polipeptidica elaborata (amminoacidi 20-134 di SEQ ID NO: 14) con mutazione L79D fusa a un dominio Fc con un linker GGG	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTILPEAG GPEVTYEPPTAPTGGGTHCPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT

SEQ ID NO:	Descrizione	Sequenza
		VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
25	ActRIIB umano solubile (extracellulare), sequenza polipeptidica elaborata (amminoacidi 20-134 di SEQ ID NO:3) con mutazione L79D fusa a un dominio Fc	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGPLEVTYLEPPPTAPTGGGTIIICPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
26	ActRIIB umano solubile (extracellulare), sequenza polipeptidica elaborata (amminoacidi 20-134 di SEQ ID NO: 14) con mutazione L79D fusa a un dominio Fc e con sequenza leader TPA	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
27	ActRIIB umano solubile (extracellulare), sequenza	

SEQ ID NO:	Descrizione	Sequenza
	<p>polipeptidica elaborata (amminoacidi 20-134 di SEQ ID NO:3) con mutazione L79D fusa a un dominio Fc e con sequenza leader TPA</p>	<p>MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETR ECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCY ASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVAT EENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEP PPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPFENNYK TTPPVLDSDGSFFI.YSKI.TVDKSRWQQ GNVFSCSYMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*</p>
28	<p>ActRIIB umano solubile (extracellulare), sequenza polipeptidica elaborata avente una sequenza C-terminale variante (divulgata in WO2007/053775)</p>	<p>GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQ DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQGS GALWLCL EGPAHE</p>
29	<p>ActRIIB umano solubile</p>	<p>GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQ</p>
	<p>(extracellulare), sequenza polipeptidica elaborata avente una sequenza C-terminale variante</p>	<p>DKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQGS GALWLCL EGPAHE</p>

SEQ ID NO:	Descrizione	Sequenza
	(divulgata in WO2007/053775) avente una mutazione L79D	
30	ActRIIB umano solubile (extracellulare), sequenza polipeptidica elaborata avente una sequenza C-terminale variante (divulgata in WO2007/053775) avente una mutazione L79D fusa a un dominio Fc con un linker TGGG	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQ DKRLIICYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYD RQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG GPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQGS GALWLCL EGPAHETGGGTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
31	Sequenza di acido nucleico codificante SEQ ID NO:10	

SEQ ID NO:	Descrizione	Sequenza
		<p>ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTG CTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCC GGCGCCGCCGAAACCCGCGAATGTATTTATTAC AATGCTAATTGGGAACTCGAACGGACGAACCA ATCCGGGCTCGAACGGTGTGAGGGGGAACAGG ATAAACGCCTCCATTGCTATGCGTCGTGGAGGA ACTCCTCCGGGACGATTGAACTGGTCAAGAAAG GGTGTGGGACGACGATTCAATTGTTATGACC GCCAGGAATGTGTGCGACCGAAGAGAATCCG CAGGTCTATTTCTGTTGTTGCGAGGGGAATTCT GTAATGAACGGTTTACCCACCTCCCCGAAGCCG GCGGGCCCGAGGTGACCTATGAACCCCGCCC ACCGGTGGTGGAACTCACACATGCCACCGTGC CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTC TTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC CTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA CACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCA</p>
		<p>AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAG ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAA TGA</p>
32	<p>proteina di fusione comprendente un dominio extracellulare solubile di</p>	

SEQ ID NO:	Descrizione	Sequenza
	ActRIIB (R64; SEQ ID NO: 15) fuso con un dominio Fc	<p>SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGE QDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK</p>
33	<p>proteina di fusione comprendente un dominio extracellulare solubile di ActRIIB (R64) con delezione dei 15 amminoacidi C-terminali (SEQ ID NO: 16) fuso con un dominio Fc</p>	<p>SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGE QDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCY DRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
34	Dominio extracellulare di ActRIIA umano fuso con un dominio Fc umano	<p>ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDK DKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDR TDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEV TQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL PGK</p>

RIVENDICAZIONI

1. Inibitore di segnalazione di ActRIIB per uso in un metodo per trattare anemia in un soggetto avente mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa, in cui il soggetto è stato precedentemente trattato con ruxolitinib, in cui il metodo comprende somministrare al soggetto una quantità farmaceuticamente efficace dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB, in cui l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è una proteina di fusione comprendente: (a) un frammento del dominio extracellulare di ActRIIB, in cui il frammento comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 9; (b) un linker; e (c) un Fc di una IgG.

2. Inibitore di segnalazione di ActRIIB per uso della rivendicazione 1, in cui il trattare riduce o allevia uno o più sintomi della mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa nel soggetto.

3. Inibitore di segnalazione di ActRIIB per uso della rivendicazione 2, in cui il sintomo è uno o più tra affaticamento, sudorazioni notturne, prurito, disturbi addominali, dolore sotto le costole sul lato sinistro, sazietà precoce, o dolore osseo.

4. Inibitore di segnalazione di ActRIIB per uso di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, in cui il soggetto ha assunto una dose stabile di ruxolitinib per almeno 112 giorni immediatamente prima della somministrazione al soggetto dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB.

5. Inibitore di segnalazione di ActRIIB per uso di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui la mielofibrosi associata a neoplasia mieloproliferativa è

- (i) mielofibrosi primaria;
- (ii) mielofibrosi post-policitemia vera; o
- (iii) mielofibrosi post-trombocitemia essenziale.

6. Inibitore di segnalazione di ActRIIB per uso di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui il soggetto è:

- (i) indipendente da trasfusioni di globuli rossi; o
- (ii) dipendente da trasfusioni di globuli rossi.

7. Inibitore di segnalazione di ActRIIB per uso della rivendicazione 6, in cui:

- (i) il soggetto è indipendente da trasfusioni di globuli rossi se il soggetto ha ricevuto 0 unità di globuli rossi durante un periodo di tempo di 84 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto; o
- (ii) il soggetto è dipendente da trasfusioni di globuli rossi se il soggetto ha ricevuto una frequenza media di trasfusioni di globuli rossi da 2 a 4 unità di globuli rossi ogni 28 giorni durante un periodo di tempo di almeno 84 giorni prima della somministrazione dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB al soggetto.

8. Inibitore di segnalazione di ActRIIB per uso di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, in cui la quantità farmaceuticamente efficace è 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg, o 2,0 mg/kg, in cui facoltativamente la quantità farmaceuticamente efficace è 1,0 mg/kg.

9. Inibitore di segnalazione di ActRIIB per uso di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 8, in cui l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto:

- (i) una volta ogni 21 giorni, una volta ogni 28 giorni, o una volta ogni 48 giorni;
- (ii) per via endovenosa o per via sottocutanea; o
- (iii) per via sottocutanea una volta ogni 21 giorni.

10. Inibitore di segnalazione di ActRIIB per uso di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, in cui la IgG è una IgG1.

11. Inibitore di segnalazione di ActRIIB per uso di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, in cui l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è

- (i) un polipeptide comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11;
- (ii) un polipeptide comprendente una sequenza amminoacidica consistente in SEQ ID NO:11; o

(iii) un polipeptide consistente nella sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO:11.

12. Inibitore di segnalazione di ActRIIB per uso di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 11, in cui il soggetto è un essere umano.

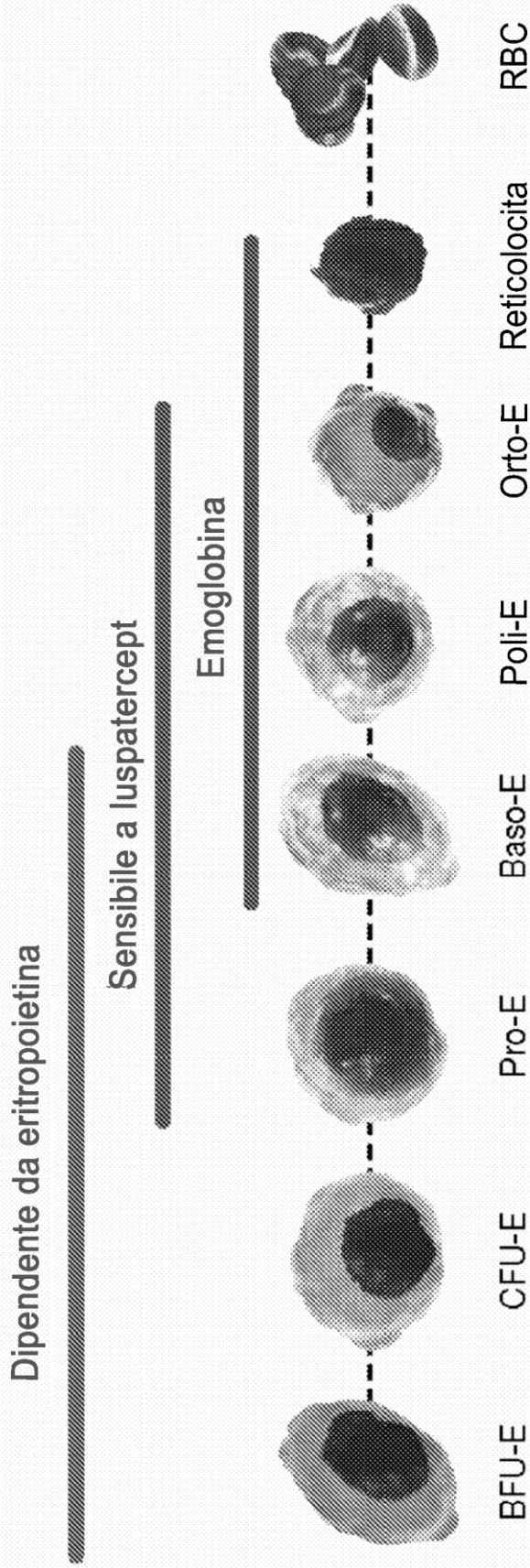
13. Inibitore di segnalazione di ActRIIB per uso di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, in cui il metodo comprende somministrare al soggetto una dose di 0,33 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,8 mg/kg, 1 mg/kg, 1,33 mg/kg, 1,75 mg/kg, o 2,0 mg/kg dell'inibitore di segnalazione di ActRIIB, in cui l'inibitore di segnalazione di ActRIIB viene somministrato al soggetto per via sottocutanea una volta ogni 21 giorni, e in cui l'inibitore di segnalazione di ActRIIB:

- (i) comprende la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11;
- (ii) comprende una sequenza amminoacidica consistente nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11; o
- (iii) consiste nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:11.

14. Inibitore di segnalazione di ActRIIB per uso di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 13, in cui l'inibitore di segnalazione di ActRIIB è formulato con un trasportatore farmaceuticamente accettabile come una composizione farmaceutica.

15. Inibitore di segnalazione di ActRIIB per uso di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 14, in cui il frammento consiste nella sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 9.

Figura 1. Meccanismo d'azione di luspatercept



Baso-E, eritroblasto basofilo; BFU-E, unità formante esplosione-eritroide; CFU-E, unità formante colonia-eritroide; Ortho-E, eritroblasto ortocromatico; Poly-E, eritroblasto policromatofilo; Pro-E, proeritroblasto; RBC, globulo rosso

Figura 1

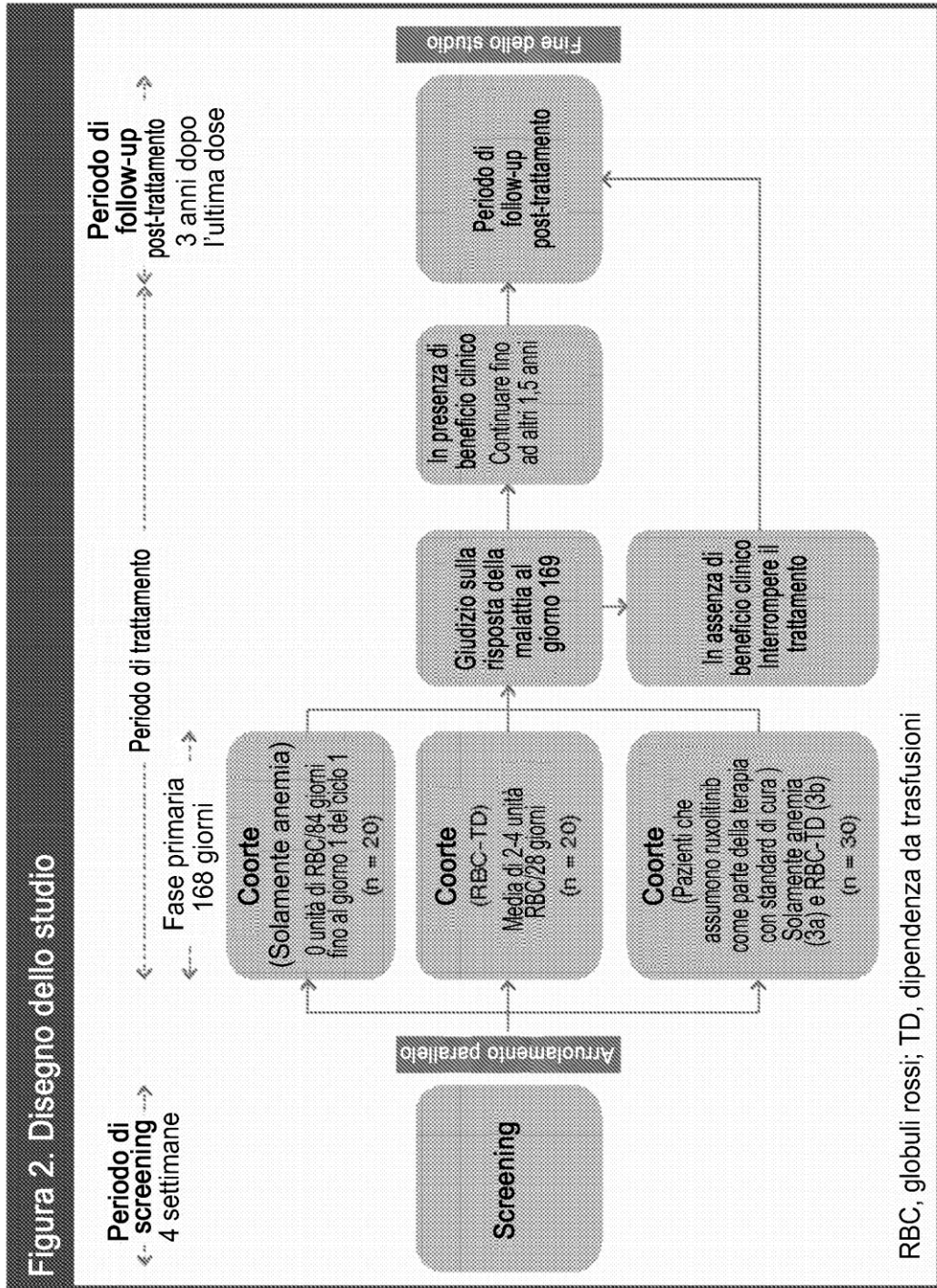


Figura 2