



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0808164-6 A2



(22) Data de Depósito: 04/02/2008
(43) Data da Publicação: 08/07/2014
(RPI 2270)

(51) Int.Cl.:
C07K 14/705
A61K 38/17

(54) Título: VARIANTES DERIVADAS DE ACTRIIB E SEUS USOS

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 02/02/2007 US 60/899.304, 01/05/2007 US 60/927.088, 25/05/2007 US 60/931.880, 02/02/2007 US 60/899.304, 02/02/2007 US 60/899.304, 01/05/2007 US 60/927.088

(73) Titular(es): Acceleron Pharma Inc.

(72) Inventor(es): Jasbir Seehra, John Knopf, Ravindra Kumar

(74) Procurador(es): NELLIE ANNE DAIEL-SHORES

(86) Pedido Internacional: PCT US2008001506 de 04/02/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/097541 de 14/08/2008

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
GC

WLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCBGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT

“VARIANTES DERIVADAS DE ACTRIIB E SEUS USOS”

REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório U.S. Série Nº 60/899.304, depositado em 2 de Fevereiro de 2007; 60/927.088 depositado em 1 de Maio de 2007; e
5 60/931.880, depositado em 25 de Maio de 2007. Todos os ensinamentos dos pedidos relatados acima são incorporados neste relatório como referência.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A superfamília do fator de crescimento de transformação beta (TGF-beta) contém uma variedade de fatores de crescimento que compartilham elementos de sequência e
10 motivos estruturais comuns. Estas proteínas são conhecidas pelo fato de que exercem efeitos biológicos em uma ampla variedade de tipos celulares tanto em vertebrados quanto em invertebrados. Membros da superfamília realizam funções importantes durante o desenvolvimento embrionário na formação padrão e especificação do tecido e podem influenciar em uma variedade de processos de diferenciação, incluindo adipogênese,
15 miogênese, condrogênese, cardiogênese, hematopoese, neurogênese, e diferenciação celular epitelial. A família é dividida em dois ramos gerais: os ramos BMP/GDF e TGF-beta/Activina/BMP10, cujos membros têm efeitos diversos e frequentemente complementares. Através da manipulação da atividade de um membro da família TGF-beta, é frequentemente possível causar mudanças fisiológicas significantes em um organismo.
20 Por exemplo, as raças de bovinos Piemontesa e Belgian Blue portam uma mutação com perda de função no gene GDF8 (também chamado miostatina) que causa um aumento marcado na massa muscular. Grobet *et al.*, Nat Genet. 1997, 17(I):71-4. Além disso, em seres humanos, os alelos inativos de GDF8 estão associados à massa muscular aumentada e, supostamente, força excepcional. Schuelke *et al.*, N Engl J Med 2004, 350: 2682-8.

25 Mudanças nos músculos, ossos, cartilagens e outros tecidos podem ser obtidas agonizando-se ou antagonizando-se o sinal que é mediado por um membro da família TGF-beta apropriado. Assim, há uma necessidade quanto a agentes que funcionam como reguladores potentes da sinalização de TGF-beta.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

30 Em certos aspectos, a presente divulgação fornece polipeptídeos de ActRIIB, particularmente variantes de ActRIIB, incluindo truncamentos nos terminais amino e carbóxi e alterações de sequência.

Tais polipeptídeos de ActRIIB podem ser usados para o tratamento de uma variedade de distúrbios ou condições, em particular, distúrbios musculares e
35 neuromusculares (por exemplo, distrofia muscular, esclerose lateral amiotrófica (ALS), e atrofia muscular), distúrbios do tecido adiposo (por exemplo, obesidade), distúrbios metabólicos (por exemplo, diabetes tipo 2), distúrbios neurodegenerativos, e perda muscular

associada ao envelhecimento (sarcopenia), terapia de câncer de próstata, e caquexia do câncer. Em modalidades específicas, polipeptídeos de ActRIIB (por exemplo, polipeptídeos de ActRIIB solúveis) podem antagonizar um receptor ActRIIB em qualquer processo associado à atividade de ActRIIB. Opcionalmente, polipeptídeos de ActRIIB da invenção

5 podem ser designados para antagonizar preferencialmente um ou mais ligantes de receptores ActRIIB, tais como GDF8 (também chamado miostatina), GDF11, activina A, activina B, activina AB, Nodal, e BMP7 (também chamado OP-1), e portanto, podem ser úteis no tratamento de distúrbios adicionais. Exemplos de polipeptídeos de ActRIIB incluem os polipeptídeos de ActRIIB que ocorrem naturalmente, assim como variantes funcionais

10 dos mesmos. A divulgação também fornece um conjunto de variantes derivadas de ActRIIB que têm afinidade altamente diminuída para activina retendo ligação ao GDF11. Estas variantes exibem efeitos desejáveis no músculo reduzindo os efeitos em outros tecidos.

Em certos aspectos, a divulgação fornece preparações farmacêuticas compreendendo um polipeptídeo de ActRIIB solúvel que se liga a um ligante de ActRIIB tal

15 como GDF8, GDF11, activina, BMP7 ou nodal, e um portador farmacêuticamente aceitável. Opcionalmente, o polipeptídeo de ActRIIB solúvel se liga a um ligante de ActRIIB com uma Kd menor do que 10 micromolar ou menor do que 1 micromolar, 100, 10 ou 1 nanomolar. Opcionalmente, o polipeptídeo de ActRIIB solúvel inibe a sinalização de ActRIIB, tal como eventos de transdução de sinal intracelular ativados por um ligante de ActRIIB. Um

20 polipeptídeo de ActRIIB solúvel para o uso em uma tal preparação pode ser qualquer um divulgado neste relatório, tal como um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácidos selecionada da SEQ ID NOs: 1, 2, 5, 6 e 12, ou tendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % ou 99 % idêntica a uma sequência de aminoácidos selecionada da SEQ ID NOs: 1, 2, 5, 6 e 12. Um polipeptídeo de ActRIIB

25 solúvel pode incluir um fragmento funcional de um polipeptídeo de ActRIIB natural, tal como um compreendendo pelo menos 10, 20 ou 30 aminoácidos de uma sequência selecionada da SEQ ID NOs: 1, 2, 5, 6 e 12 ou uma sequência da SEQ ID NO: 1, faltando os aminoácidos 1, 2, 3, 4, 5 ou 10 a 15 do C-terminal e faltando os aminoácidos 1, 2, 3, 4 ou 5 no N-terminal. Um polipeptídeo preferido compreenderá um truncamento em relação à SEQ

30 ID NO: 1 entre 2 e 5 aminoácidos no N-terminal e não mais do que 3 aminoácidos no C-terminal. Um outro polipeptídeo preferido é aquele apresentado como SEQ ID NO: 12. Um polipeptídeo de ActRIIB solúvel pode incluir uma ou mais alterações na sequência de aminoácidos (por exemplo, no domínio de ligação ao ligante) em relação a um polipeptídeo de ActRIIB que ocorre naturalmente. A alteração na sequência de aminoácidos pode alterar,

35 por exemplo, a glicosilação do polipeptídeo quando produzida em um mamífero, inseto ou outra célula eucariótica ou alterar a clivagem proteolítica do polipeptídeo em relação ao polipeptídeo de ActRIIB que ocorre naturalmente. Um polipeptídeo de ActRIIB solúvel pode

ser uma proteína de fusão que tem, como um domínio, um polipeptídeo de ActRIIB (por exemplo, um domínio de ligação ao ligante de um ActRIIB ou uma variante do mesmo) e um ou mais domínios adicionais que fornecem uma propriedade desejável, tal como farmacocinética melhorada, purificação mais fácil, alveijamento de tecidos particulares, etc.

5 Por exemplo, um domínio de uma proteína de fusão pode realçar uma ou mais entre estabilidade *in vivo*, meia vida *in vivo*, absorção/administração, localização ou distribuição do tecido, formação de complexos de proteína, multimerização da proteína de fusão, e/ou purificação. Uma proteína de fusão de ActRIIB solúvel pode incluir um domínio Fc de imunoglobulina (tipo selvagem ou mutante) ou uma albumina sérica. Em certas

10 modalidades, uma fusão de ActRIIB-Fc compreende um ligador relativamente não estruturado posicionado entre o domínio Fc e o domínio extracelular de ActRIIB. Este ligador não estruturado pode corresponder à região não estruturada próxima ao aminoácido 15 na extremidade C-terminal do domínio extracelular de ActRIIB (a "cauda"), ou ele pode ser uma sequência artificial entre 5 e 15, 20, 30, 50 ou mais aminoácidos que estão relativamente

15 livres de estrutura secundária. Um ligador pode ser rico em resíduos de glicina e prolina e pode conter, por exemplo, sequências de repetição de treonina/serina e glicinas (por exemplo, repetições de TG₄ ou SG₄). Uma proteína de fusão pode incluir uma subsequência de purificação, tal como uma tag de epítipo, uma tag FLAG, uma sequência de poliistidina, e uma fusão com GST. Opcionalmente, um polipeptídeo de ActRIIB solúvel inclui um ou

20 mais resíduos de aminoácidos modificados selecionados de: um aminoácido glicosilado, um aminoácido PEGilado, um aminoácido farnesilado, um aminoácido acetilado, um aminoácido biotinilado, um aminoácido conjugado a uma porção lipídica, e um aminoácido conjugado a um agente derivatizante orgânico. Uma preparação farmacêutica também pode incluir um ou mais compostos adicionais, tais como um composto que é usado para tratar um distúrbio

25 associado a ActRIIB. Preferivelmente, uma preparação farmacêutica é substancialmente livre de pirogênio. No geral, é preferível que uma proteína de ActRIIB seja expressada em uma linhagem celular de mamífero que promove a mediação adequada da glicosilação natural da proteína de ActRIIB de modo a diminuir a probabilidade de uma resposta imune não favorável em um paciente. Linhagens celulares humanas e de CHO foram usadas com

30 êxito, e espera-se que outros vetores de expressão em mamíferos comuns sejam úteis.

Em certos aspectos, a divulgação fornece produtos farmacêuticos empacotados compreendendo uma preparação farmacêutica descrita neste relatório e marcados para o uso na promoção do crescimento de um tecido ou diminuição ou prevenção de uma perda de um tecido em um ser humano. Tecidos exemplares incluem tecido de ossos, cartilagens,

35 músculos, gorduras e neurônios. Em certos aspectos, a divulgação fornece polipeptídeos de ActRIIB solúveis compreendendo um domínio de ligação ao ligante alterado (por exemplo, ligação ao GDF8). Tais domínios de ligação ao ligante alterados de um receptor ActRIIB

compreendem uma ou mais mutações nos resíduos de aminoácidos, tais como E37, E39, R40, K55, R56, Y60, A64, K74, W78, L79, D80, F82 e F101 de ActRIIB humano. (A numeração está relacionada à SEQ ID NO: 2). Opcionalmente, o domínio de ligação ao ligante alterado pode ter seletividade aumentada para um ligante, tal como GDF8/GDF11 em relação a um domínio de ligação ao ligante do tipo selvagem de um receptor ActRIIB. Para ilustrar, estas mutações são demonstradas neste relatório por aumentar a seletividade do domínio de ligação ao ligante alterado para GDF11 (e portanto, presumivelmente, GDF8) sobre a activina (apresentada com respeito a ActRIIB): K74Y, K74F, K74I e D80I. As mutações seguintes têm o efeito reverso, aumentando a razão de ligação de activina sobre GDF11: D54A, K55A, L79A e F82A. A atividade de ligação global (GDF11 e activina) pode ser aumentada pela inclusão da região da “cauda” ou, presumivelmente, uma região ligadora não estruturada, e também pelo uso de uma mutação K74A. Outras mutações que causaram uma diminuição global na afinidade de ligação ao ligante, incluem: R40A, E37A, R56A, W78A, D80K, D80R, D80A, D80G, D80F, D80M e D80N. As mutações podem ser combinadas para obter os efeitos desejados. Por exemplo, muitas das mutações que afetam a razão de ligação de GDF11:Activina têm um efeito global negativo sobre a ligação ao ligante, e portanto, estas podem ser combinadas com mutações que geralmente aumentam a ligação ao ligante para produzir uma proteína de ligação aperfeiçoada com seletividade do ligante.

Opcionalmente, o domínio de ligação ao ligante alterado tem uma razão de K_d quanto à ligação de activina para K_d quanto à ligação de GDF8 que é pelo menos 2, 5, 10, ou ainda 100 vezes maior em relação à razão para o domínio de ligação ao ligante do tipo selvagem. Opcionalmente, o domínio de ligação ao ligante alterado tem uma razão de IC_{50} quanto à inibição de activina para IC_{50} quanto à inibição de GDF8/GDF11 que é pelo menos 2, 5, 10, ou ainda 100 vezes maior em relação ao domínio de ligação ao ligante do tipo selvagem. Opcionalmente, o domínio de ligação ao ligante alterado inibe GDF8/GDF11 com uma IC_{50} de pelo menos 2, 5, 10, ou ainda 100 vezes menor do que a IC_{50} para inibir activina. Estes polipeptídeos de ActRIIB solúveis podem ser proteínas de fusão que incluem um domínio Fc de imunoglobulina (tipo selvagem ou mutante). Em certos casos, os polipeptídeos de ActRIIB solúveis objeto são antagonistas (inibidores) de GDF8/GDF11.

Outras variantes de ActRIIB são consideradas, tais como as seguintes. Uma proteína de fusão de ActRIIB variante compreendendo uma porção derivada da sequência de ActRIIB da SEQ ID NO: 2 e uma segunda porção polipeptídica, em que a porção derivada de ActRIIB corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 21 a 29 da SEQ ID NO: 2 (opcionalmente iniciando em 22 a 25 da SEQ ID NO: 2) e terminando em qualquer um dos aminoácidos 109 a 134 da SEQ ID NO: 2, e em que a proteína de fusão de ActRIIB inibe a sinalização por activina, miostatina e/ou GDF11 em um

ensaio de base celular. A proteína de fusão de ActRIIB variante acima, em que a porção derivada de ActRIIB corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 20 a 29 da SEQ ID NO: 2 (opcionalmente iniciando em 22 a 25 da SEQ ID NO: 2) e terminado em qualquer um dos aminoácidos 109 a 133 da SEQ ID NO: 2. A proteína de fusão de ActRIIB variante acima, em que a porção derivada de ActRIIB corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 20 a 24 da SEQ ID NO: 2 (opcionalmente iniciando em 22 a 25 da SEQ ID NO: 2) e terminado em qualquer um dos aminoácidos 109 a 133 da SEQ ID NO: 2. A proteína de fusão de ActRIIB variante acima, em que a porção derivada de ActRIIB corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 21 a 24 da SEQ ID NO: 2 e terminado em qualquer um dos aminoácidos 109 a 134 da SEQ ID NO: 2. A proteína de fusão de ActRIIB variante acima, em que a porção derivada de ActRIIB corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 20 a 24 da SEQ ID NO: 2 e terminado em qualquer um dos aminoácidos 118 a 133 da SEQ ID NO: 2. A proteína de fusão de ActRIIB variante acima, em que a porção derivada de ActRIIB corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 21 a 24 da SEQ ID NO: 2 e terminado em qualquer um dos aminoácidos 118 a 134 da SEQ ID NO: 2. A proteína de fusão de ActRIIB variante acima, em que a porção derivada de ActRIIB corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 20 a 24 da SEQ ID NO: 2 e terminado em qualquer um dos aminoácidos 128 a 133 da SEQ ID NO: 2. A proteína de fusão de ActRIIB variante acima, em que a porção derivada de ActRIIB corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 20 a 24 da SEQ ID NO: 2 e terminado em qualquer um dos aminoácidos 128 a 133 da SEQ ID NO: 2. A proteína de fusão de ActRIIB variante acima, em que a porção derivada de ActRIIB corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 21 a 29 da SEQ ID NO: 2 e terminado em qualquer um dos aminoácidos 118 a 134 da SEQ ID NO: 2. A proteína de fusão de ActRIIB variante acima, em que a porção derivada de ActRIIB corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 20 a 29 da SEQ ID NO: 2 e terminado em qualquer um dos aminoácidos 118 a 133 da SEQ ID NO: 4. A proteína de fusão de ActRIIB variante acima, em que a porção derivada de ActRIIB corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 21 a 29 da SEQ ID NO: 2 e terminado em qualquer um dos aminoácidos 128 a 134 da SEQ ID NO: 2. A proteína de fusão de ActRIIB variante acima, em que a porção derivada de ActRIIB corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 20 a 29 da SEQ BD NO: 2 e terminado em qualquer um dos aminoácidos 128 a 133 da SEQ ID NO: 2. Surpreendentemente, constructos iniciando em 22 a 25 da SEQ ID NO: 2 têm níveis de atividade maiores do que as proteínas tendo o domínio extracelular total de ActRIIB humano. Qualquer proteína de fusão de ActRIIB variante acima

pode ser produzida como um homodímero. Qualquer uma das proteínas de fusão de ActRIIB acima pode ter uma porção heteróloga que compreende uma região constante de uma cadeia pesada de IgG, tal como um domínio Fc.

Outras proteínas de ActRIIB variantes são consideradas, tais como as seguintes.

- 5 Uma proteína de ActRIIB variante compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80 % idêntica à sequência de aminoácidos 29 a 109 da SEQ ID NO: 2, em que a posição correspondente a 64 da SEQ ID NO: 2 é R ou K, e em que a proteína de ActRIIB variante inibe a sinalização por activina, miostatina e/ou GDF11 em um ensaio de base celular. A proteína de ActRIIB variante acima, em que pelo menos uma alteração com
10 respeito à sequência da SEQ ID NO: 2 está posicionada fora do sítio de ligação ao ligante. A proteína de ActRIIB variante acima, em que pelo menos uma alteração com respeito à sequência da SEQ ID NO: 2 é uma alteração conservativa posicionada dentro do sítio de ligação ao ligante. A proteína de ActRIIB variante acima, em que pelo menos uma alteração com respeito à sequência da SEQ ID NO: 2 é uma alteração em uma ou mais posições
15 selecionadas do grupo que consiste de K74, R40, Q53, K55, F82 e L79. A proteína de ActRIIB variante acima, em que a proteína compreende pelo menos uma sequência N-X-S/T em uma posição, a não ser uma sequência N-X-S/T endógena de ActRIIB, e em uma posição fora do sítio de ligação ao ligante.

Outras proteínas de ActRIIB variantes são consideradas, tais como as seguintes.

- 20 Uma proteína de ActRIIB compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80 % idêntica à sequência de aminoácidos 29 a 109 da SEQ ID NO: 2, e em que a proteína compreende pelo menos uma sequência N-X-S/T em uma posição, a não ser uma sequência N-X-S/T endógena de ActRIIB, e em uma posição fora do sítio de ligação ao ligante. A proteína de ActRIIB variante acima, em que a proteína compreende um N na
25 posição correspondente à posição 24 da SEQ ID NO: 2 e um S ou T na posição correspondente à posição 26 da SEQ ID NO: 2, e em que a proteína de ActRIIB variante inibe a sinalização por activina, miostatina e/ou GDF11 em um ensaio de base celular. A proteína de ActRIIB variante acima, em que a proteína compreende um R ou K na posição correspondente à posição 64 da SEQ ID NO: 2. A proteína de ActRIIB variante acima, em
30 que pelo menos uma alteração com respeito à sequência da SEQ ID NO: 2 é uma alteração conservativa posicionada dentro do sítio de ligação ao ligante. A proteína de ActRIIB variante acima, em que pelo menos uma alteração com respeito à sequência da SEQ ID NO: 2 é uma alteração em uma ou mais posições selecionadas do grupo que consiste de K74, R40, Q53, K55, F82 e L79. A proteína de ActRIIB variante acima, em que a proteína é
35 uma proteína de fusão compreendendo ainda uma porção heteróloga. Qualquer proteína de fusão de ActRIIB variante acima pode ser produzida como um homodímero. Qualquer uma das proteínas de fusão de ActRIIB acima pode ter uma porção heteróloga que compreende

uma região constante de uma cadeia pesada de IgG, tal como um domínio Fc.

Em certos aspectos, a divulgação fornece ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo de ActRIIB solúvel, que não codificam um polipeptídeo de ActRIIB completo. Um polinucleotídeo isolado pode compreender uma sequência de codificação para um polipeptídeo de ActRIIB solúvel, tal como descrito acima. Por exemplo, um ácido nucleico isolado pode incluir uma codificação de sequência para um domínio extracelular (por exemplo, domínio de ligação ao ligante) de um ActRIIB e uma sequência que codificaria parte ou todo o domínio transmembranar e/ou o domínio citoplásmico de um ActRIIB, porém um códon de parada posicionado dentro do domínio transmembranar ou do domínio citoplásmico, ou posicionado entre o domínio extracelular e o domínio transmembranar ou domínio citoplásmico. Por exemplo, um polinucleotídeo isolado pode compreender uma sequência de polinucleotídeo de ActRIIB de comprimento total, tal como a SEQ ID NO: 4, ou uma versão parcialmente truncada, o dito polinucleotídeo isolado compreendendo ainda um códon de terminação de transcrição de pelo menos seiscentos nucleotídeos antes do terminal 3' ou de outro modo posicionado tal que a tradução do polinucleotídeo dá origem a um domínio extracelular opcionalmente fundido a uma porção truncada de um ActRIIB de comprimento total. Os ácidos nucleicos divulgados neste relatório podem ser operavelmente ligados a um promotor para expressão, e a divulgação fornece células transformadas com tais polinucleotídeos recombinantes. Preferivelmente, a célula é uma célula de mamífero, tal como uma célula de CHO.

Em certos aspectos, a divulgação fornece métodos para fabricar um polipeptídeo de ActRIIB solúvel. Um tal método pode incluir expressar qualquer um dos ácidos nucleicos (por exemplo, SEQ ID NO: 3) divulgados neste relatório em uma célula adequada, tal como uma célula de ovário de hamster chinês (CHO). Um tal método pode compreender: a) cultivar uma célula sob condições adequadas para a expressão do polipeptídeo de ActRIIB solúvel, em que a dita célula é transformada com um constructo de expressão de ActRIIB solúvel; e b) recuperar o polipeptídeo de ActRIIB solúvel assim expressado. Polipeptídeos de ActRIIB solúveis podem ser recuperados como frações brutas, parcialmente purificadas ou altamente purificadas usando qualquer uma das técnicas bem conhecidas para se obter proteínas a partir de culturas celulares.

Em certos aspectos, um polipeptídeo de ActRIIB solúvel divulgado neste relatório pode ser usado em um método para tratar um paciente tendo um distúrbio associado à perda muscular ou crescimento insuficiente do músculo. Tais distúrbios incluem atrofia muscular, distrofia muscular, esclerose lateral amiotrófica (ALS), e um distúrbio de perda muscular (por exemplo, caquexia, anorexia, síndrome DMD, síndrome BMD, síndrome de perda pela AIDS, distrofias musculares, doenças neuromusculares, doenças neuromotoras, doenças da junção neuromuscular, e miopatias inflamatórias). Um método pode

compreender administrar a um paciente em necessidade do mesmo uma quantidade eficaz de um polipeptídeo de ActRIIB solúvel.

Em certos aspectos, um polipeptídeo de ActRIIB solúvel divulgado neste relatório pode ser usado em um método para diminuir o teor de gordura corporal ou reduzir a taxa de aumento no teor de gordura corporal, e para tratar um distúrbio associado ao ganho de peso corporal indesejável, tal como obesidade, diabetes melitus não insulino-dependente (NIDDM), doença cardiovascular, câncer, hipertensão, osteoartrite, acidente vascular cerebral, problemas respiratórios, e doença da vesícula biliar. Estes métodos podem compreender administrar a um paciente em necessidade do mesmo uma quantidade eficaz de um polipeptídeo de ActRIIB solúvel.

Em certos aspectos específicos, um polipeptídeo de ActRIIB solúvel divulgado neste relatório pode ser usado em um método para tratar um distúrbio associado à atividade anormal de GDF8. Tais distúrbios incluem distúrbios metabólicos, tais como diabetes tipo 2, tolerância à glicose prejudicada, síndrome metabólica (por exemplo, síndrome X), e resistência à insulina induzida por trauma (por exemplo, queimaduras ou desequilíbrio de nitrogênio); distúrbios do tecido adiposo (por exemplo, obesidade); distrofia muscular (incluindo distrofia muscular de Duchenne); esclerose lateral amiotrófica (ALS); atrofia muscular; atrofia do órgão; fraqueza; síndrome do túnel carpal; doença pulmonar obstrutiva congestiva; sarcopenia, caquexia e outras síndromes de perda muscular; osteoporose; osteoporose induzida por glucocorticóides; osteopenia; osteoartrite; fraturas relacionadas à osteoporose; massa óssea inferior devido à terapia de glucocorticóide crônica, insuficiência gonadal prematura, supressão de andrógeno, deficiência de vitamina D, hiperparatireoidismo secundário, deficiências nutricionais e anorexia nervosa. O método pode compreender administrar a um paciente em necessidade do mesmo uma quantidade eficaz de um polipeptídeo de ActRIIB solúvel.

Em certos aspectos, a divulgação fornece um método para identificar um agente que estimula o crescimento de um tecido, tal como ossos, cartilagens, músculos e gorduras. O método compreende: a) identificar um agente de teste que se liga a um domínio de ligação ao ligante de um polipeptídeo de ActRIIB competitivamente com um polipeptídeo de ActRIIB solúvel; e b) avaliar o efeito do agente no crescimento do tecido.

Em certos aspectos, a divulgação fornece métodos para antagonizar a atividade de um polipeptídeo de ActRIIB ou um ligante de ActRIIB (por exemplo, GDF8, GDF11, activina, BMP7, e Nodal) em uma célula. Os métodos compreendem contatar a célula com um polipeptídeo de ActRIIB solúvel. Opcionalmente, a atividade do polipeptídeo de ActRIIB ou do ligante de ActRIIB é monitorada por uma transdução da sinalização mediada pelo complexo de ActRIIB/ligante de ActRIIB, por exemplo, monitorando-se a proliferação celular. As células dos métodos incluem um osteoblasto, um condrócito, um miócito, um adipócito e

uma célula muscular.

Em certos aspectos, a divulgação fornece usos de um polipeptídeo de ActRIIB solúvel para fabricar um medicamento para o tratamento de um distúrbio ou condição, conforme descrito neste relatório.

5 BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra uma sequência de polipeptídeo de ActRIIB solúvel humano (extracelular) (SEQ ID NO: 1). A “cauda” C-terminal está sublinhada.

A Figura 2 mostra uma sequência de proteína precursora de ActRIIB humano (SEQ ID NO: 2). O peptídeo sinal está sublinhado; o domínio extracelular está em negrito (também referido como SEQ ID NO: 1); e os sítios de glicosilação N-ligados potenciais estão em caixa.

A Figura 3 mostra uma sequência de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo de ActRIIB solúvel humano (extracelular), designada como SEQ ID NO: 3.

A Figura 4 mostra uma sequência de ácido nucléico que codifica a proteína precursora de ActRIIB humano, designada como SEQ ID NO: 4.

A Figura 5 mostra aumentos de peso corporal em camundongos tratados com veículo (losangos), ActRIIB(R64 20 a 134)-mFc (quadrados) ou a forma de meia vida longa, ActRIIB(R64 A24N 20 a 134) (triângulos).

A Figura 6 mostra pesos de músculos dissecados no fim do estudo. Veículo: coluna esquerda (sombreado claro) de cada agrupamento; ActRIIB(R64 20 a 134)-mFc: coluna do meio (sombreado médio) de cada agrupamento; ActRIIB(R64 A24N 20 a 134): coluna direita (sombreado escuro) de cada agrupamento.

A Figura 7 mostra medições da força e preensão para camundongos SOD tratados com PBS e ActRIIB (R64 K74A 20 a 134)-mFc murino (ou “cauda K74A+15”) (barras brancas e pretas, respectivamente). A figura ilustra a força aumentada do grupo de ActRIIB murino (R64 K74A 20 a 134)-mFc em comparação ao grupo PBS durante os estágios iniciais (dia 117) e tardios (dia 149) da doença. * $P < 0,05$, test t de Student com duas caudas.

A Figura 8 mostra a comparação de sobrevivência de Kaplan-Meier de camundongos SOD tratados com PBS e ActRIIB (R64 K74A 20 a 134)-mFc (linhas brancas e pretas, respectivamente). O grupo tratado com ActRIIB (R64 K74A 20 a 134)-mFc tem o número médio de dias de sobrevivência aumentado em comparação ao grupo PBS.

A Figura 9 mostra a porcentagem da mudança da composição corporal em camundongos alimentados com HFD e tratados com PBS e ActRIIB(R64 20 a 134)-mFc (barras brancas e pretas, respectivamente). O tratamento com proteína de ActRIIB(R64 20 a 134)-Fc murino reduz significativamente a massa de gordura e aumenta o tecido magro.

A Figura 10 mostra seções transversais musculares do músculo femoral (ampliação 4 x) de camundongos velhos (A) ou camundongos velhos tratados com ActRIIB(R64 20 a

134)-mFc (B).

A Figura 11 mostra os pesos corporais médios de camundongos em um experimento de caquexia do câncer usando células de câncer de cólon CT26. Losangos: sem tumor, animais tratados com solução salina; Quadrados: sem tumor, camundongos tratados com ActRIIB(R64 20 a 134)-mFc; Triângulos: com tumor, animais tratados com solução salina; “x”: com tumor, camundongos tratados com ActRIIB(R64 20 a 134)-mFc (10 mg/kg); “*”: com tumor, camundongos tratados com ActRIIB(R64 20 a 134)-mFc (30 mg/kg); Círculos: com tumor, camundongos tratados com ActRIIB(R64 20 a 134)-mFc (10 mg/kg), tratamento iniciado no período de implante do tumor para uma modalidade preventiva.

A Figura 12 mostra um alinhamento de ActRIIA e ActRIIB humanos com os resíduos que são deduzidos neste relatório, com base em análise de compósito de estruturas cristalinas de ActRIIB e ActRIIA múltiplas para contatar diretamente o ligante (o sítio de ligação ao ligante) indicado com caixas.

A Figura 13 mostra um alinhamento de sequência múltiplo de várias proteínas de ActRIIB de vertebrados e ActRIIA humano.

DESCRIÇÃO DETALHADA

1. Visão geral

Em certos aspectos, a presente invenção refere-se a polipeptídeos de ActRIIB. Conforme usado neste relatório, o termo “ActRIIB” refere-se a uma família de proteínas do receptor tipo IIB de activina (ActRIIB) e proteínas relacionadas a ActRIIB, derivadas de qualquer espécie. Membros da família de ActRIIB são geralmente todas as proteínas transmembranares, compostas de um domínio extracelular de ligação ao ligante com região rica em cisteína, um domínio transmembranar, e um domínio citoplásmico com especificidade de serina/treonina cinase prognosticada. Sequências de aminoácidos de proteína precursora de ActRIIA humano (fornecida para comparação) e proteína precursora de ActRIIB são ilustradas na Figura 1 (SEQ ID NO: 1) e na Figura 2 (SEQ ID NO: 2), respectivamente.

O termo “polipeptídeo de ActRIIB” é usado para se referir a polipeptídeos compreendendo qualquer polipeptídeo que ocorre naturalmente de um membro da família de ActRIIB assim como quaisquer variantes do mesmo (incluindo mutantes, fragmentos, fusões, e formas peptidomiméticas) que retêm uma atividade útil. Por exemplo, polipeptídeos de ActRIIB incluem polipeptídeos derivados da sequência de qualquer ActRIIB conhecido tendo uma sequência pelo menos aproximadamente 80 % idêntica à sequência de um polipeptídeo de ActRIIB, e preferivelmente pelo menos 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % ou mais de identidade.

Em uma modalidade específica, a invenção refere-se a polipeptídeos de ActRIIB solúveis. Conforme descrito neste relatório, o termo “polipeptídeo de ActRIIB solúvel”

geralmente refere-se a polipeptídeos compreendendo um domínio extracelular de uma proteína de ActRIIB. O termo “polipeptídeo de ActRIIB solúvel,” conforme usado neste relatório, inclui qualquer domínio extracelular que ocorre naturalmente de uma proteína de ActRIIB assim como quaisquer variantes do mesmo (incluindo mutantes, fragmentos e formas peptidomiméticas) que retêm uma atividade útil. Por exemplo, o domínio extracelular de uma proteína de ActRIIB se liga a um ligante e é geralmente solúvel. Exemplos de polipeptídeos de ActRIIB solúveis incluem polipeptídeos de ActRIIB solúveis ilustrados na Figura 1 (SEQ ED NO: 1). Outros exemplos de polipeptídeos de ActRIIB solúveis compreendem uma sequência sinal, além do domínio extracelular de uma proteína de ActRIIB, veja o Exemplo 1. A sequência sinal pode ser uma sequência sinal nativa de um ActRIIB, ou uma sequência sinal a partir de uma outra proteína, tal como uma sequência sinal do ativador tecidual do plasminogênio (TPA) ou uma sequência sinal da melitina de abelha (HBM).

Os sinais de TGF- β são mediados por complexos heteroméricos de receptores de serina/treonina cinase tipo I e tipo II, que fosforilam e ativam proteínas Smad a jusante sob a estimulação do ligante (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178). Estes receptores tipo I e tipo II são todas as proteínas transmembranares, compostas de um domínio extracelular de ligação ao ligante com região rica em cisteína, um domínio transmembranar, e um domínio citoplásmico com especificidade de serina/treonina prognosticada. Os receptores tipo I são essenciais para sinalização; e receptores tipo II são necessários para ligar os ligantes e para a expressão de receptores tipo I. Receptores de activina tipo I e II formam um complexo estável depois da ligação ao ligante, resultando na fosforilação de receptores tipo I por receptores tipo II.

Dois receptores tipo II relacionados, ActRIIA e ActRIIB, foram identificados como os receptores tipo II para activinas (Mathews e Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano *et al.*, 1992, Cell 68:97-108). Além das activinas, ActRIIA e ActRIIB podem interagir bioquimicamente com várias outras proteínas da família TGF- β , incluindo 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). Os requerentes descobriram que proteínas de fusão de ActRIIA-Fc e proteínas de fusão ActRIIB-Fc solúveis têm efeitos substancialmente diferentes *in vivo*, com ActRIIA-Fc tendo efeitos primários no osso e ActRIIB-Fc tendo efeitos primários no músculo esquelético.

Em certas modalidades, a presente invenção refere-se à antagonização de um ligante de receptores ActRIIB (também referido como um ligante de ActRIIB) com um polipeptídeo de ActRIIB objeto (por exemplo, um polipeptídeo de ActRIIB solúvel). Assim, composições e métodos da presente invenção são úteis para tratar distúrbios associados à

atividade anormal de um ou mais ligantes de receptores ActRIIB. Ligantes exemplares de receptores ActRIIB incluem alguns membros da família TGF- β , tais como activina, Nodal, GDF8, GDF11, e BMP7.

Activinas são fatores de crescimento polipeptídicos diméricos e pertencem à superfamília TGF-beta. Existem três activinas (A, B, e AB) que são homo/heterodímeros de duas subunidades β intimamente relacionadas ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$, e $\beta_A\beta_B$). Na superfamília TGF-beta, activinas são fatores únicos e multifuncionais que podem estimular a produção de hormônio em células ovarianas e placentárias, suportar sobrevivência celular neuronal, influenciar positiva ou negativamente o progresso do ciclo celular dependendo do tipo celular, e induzir a diferenciação mesodérmica pelo menos em embriões de anfíbio (DePaolo *et al.*, 1991, Proc SocEp Biol Med. 198:500-512; Dyson *et al.*, 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963). Além disso, descobriu-se que o fator de diferenciação eritróide (EDF) isolado das células leucêmicas monocíticas humanas estimuladas foi idêntico ao da activina A (Murata *et al.*, 1988, PNAS, 85: 2434). Sugeriu-se que a activina A age como um regulador natural de eritropoese na medula óssea. Em vários tecidos, a sinalização de activina é antagonizada por seu heterodímero relacionado, inibina. Por exemplo, durante a liberação de hormônio folículo-estimulante (FSH) a partir da hipófise, a activina promove secreção e síntese de FSH, enquanto a inibina previne a secreção e síntese de FSH. Outras proteínas que podem regular a bioatividade da activina e/ou podem se ligar à activina incluem folistatina (FS), proteína relacionada à folistatina (FSRP), α_2 -macroglobulina, Cerberus, e endoglin, que são descritas abaixo.

Proteínas nodais têm funções na indução e formação de mesoderma e endoderma, assim como na organização subsequente de estruturas axiais, tais como as cardíacas e estomacais na embriogênese precoce. Demonstrou-se que o tecido dorsal em um desenvolvimento vertebroembrionário contribui predominantemente com as estruturas axiais da placa da notocorda e pré-corda recrutando células adjacentes para formar estruturas embrionárias não axiais. Nodal mostrou sinalizar através de receptores tipo I e tipo II e efetores intracelulares conhecidos como proteínas Smad. Estudos recentes sustentam a idéia que ActRIIA e ActRIIB servem como receptores tipo II para Nodal (Sakuma *et al.*, Genes Cells. 2002, 7:401-12). Sugeriu-se que ligantes de Nodal interagem com seus cofatores (por exemplo, cripta) para ativar receptores tipo I e tipo II de activina, que fosforilam Smad2. Proteínas nodais são implicadas em muitos eventos críticos ao vertebroembrionário precoce, incluindo formação de mesoderma, padronagem prévia, e especificação do eixo direito-esquerdo. A evidência experimental demonstrou que a sinalização Nodal ativa pAR3-Lux, um repórter luciferase previamente mostrado para responder especificamente à activina e TGF-beta. Entretanto, Nodal é incapaz de induzir pTlx2-Lux, um repórter especificamente responsivo às proteínas morfogenéticas ósseas. Resultados recentes fornecem a evidência

bioquímica direta de que a sinalização de Nodal é mediada por activina-TGF-beta via Smads, Smad2 e Smad3. Outra evidência mostrou que a proteína cripta extracelular é necessária para a sinalização de Nodal, tornando-a distinta da sinalização de activina ou TGF-beta.

5 O Fator-8 de Crescimento e Diferenciação (GDF8) também é conhecido como miostatina. GDF8 é um regulador negativo de massa muscular esquelética. GDF8 é altamente expressado no desenvolvimento do músculo esquelético adulto. A mutação nula de GDF8 em camundongos transgênicos é caracterizada por uma hipertrofia e hiperplasia marcadas do músculo esquelético (McPherron *et al.*, Nature, 1997, 387:83-90). Aumentos
10 similares na massa muscular esquelética são evidentes em mutações que ocorrem naturalmente de GDF8 no gado (Ashmore *et al.*, 1974, Growth, 38:501-507; Swatland e Kieffer, J. Anim. Sci., 1994, 38:752-757; McPherron e Lee, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94:12457-12461; e Kambadur *et al.*, Genome Res., 1997, 7:910-915) e, visivelmente, em seres humanos (Schuelke *et al.*, N Engl J Med 2004; 350:2682-8). Estudos também
15 mostraram que a perda muscular associada à infecção por HIV em seres humanos é acompanhada por aumentos na expressão da proteína GDF8 (Gonzalez-Cadavid *et al.*, PNAS, 1998, 95:14938-43). Além disso, GDF8 pode modular a produção de enzimas músculo-específicas (por exemplo, creatina cinase) e modular a proliferação celular de mioblasto (WO 00/43781). O pró-peptídeo de GDF8 pode se ligar não covalentemente ao
20 dímero de domínio de GDF8 maduro, inativando sua atividade biológica (Miyazono *et al.* (1988) J. Biol. Chem., 263:6407-6415; Wakefield *et al.* (1988) J. Biol. Chem., 263:7646-7654; e Brown *et al.* (1990) Growth Factors, 3:35-43). Outras proteínas que se ligam ao GDF8 ou proteínas estruturalmente relacionadas e inibem sua atividade biológica incluem folistatina, e potencialmente, proteínas relacionada à folistatina (Gamer *et al.* (1999) Dev.
25 Biol., 208:222-232).

O Fator-11 de Crescimento e Diferenciação (GDF11), também conhecido como BMP11, é uma proteína secretada (McPherron *et al.*, 1999, Nat. Genet. 22:260-264). GDF11 é expressado na brotos distais da cauda, brotos distais dos membros, arcos maxilares e mandibulares, e gânglios da raiz dorsal durante o desenvolvimento do camundongo
30 (Nakashima *et al.*, 1999, Mech. Dev. 80:185-189). GDF11 desempenha um papel único na padronização de tecidos mesodérmicos e neurais (Gamer *et al.*, 1999, Dev Biol., 208:222-32). GDF11 mostrou-se um regulador negativo de condrogênese e miogênese no desenvolvimento de membros de galinha (Gamer *et al.*, 2001, Dev Biol. 229:407-20). A expressão de GDF11 no músculo também sugere seu papel na regulação do crescimento
35 muscular em um modo similar ao GDF8. Além disso, a expressão de GDF11 no cérebro sugere que GDF11 também pode possuir atividades que se referem à função do sistema nervoso. Curiosamente, descobriu-se que GDF11 inibe a neurogênese no epitélio olfativo

(Wu *et al.*, 2003, Neuron. 37:197-207). Consequentemente, GDF11 pode ter aplicações *in vitro* e *in vivo* no tratamento de doenças, tais como doenças musculares e doenças neurodegenerativas (por exemplo, esclerose lateral amiotrófica).

A proteína morfogenética óssea (BMP7), também chamada proteína osteogênica-1 (OP-1), é bem conhecida na indução da formação de cartilagens e ossos. Além disso, BMP7 regula um amplo arranjo de processos fisiológicos. Por exemplo, BMP7 pode ser o fator osteoindutivo responsável pelo fenômeno da osteogênese epitelial. Também descobriu-se que BMP7 desempenha um papel na regulação de cálcio e homeostase óssea. Semelhante à activina, BMP7 se liga a receptores tipo II, ActRIIA e IIB. Entretanto, BMP7 e activina recrutam receptores tipo I distintos em complexos de receptores heteroméricos. O receptor tipo I de BMP7 principal observado foi ALK2, enquanto que activina se ligou exclusivamente a ALK4 (ActRIIB). BMP7 e activina eliciaram respostas biológicas distintas e ativaram vias Smad diferentes (Macias-Silva *et al.*, 1998, J Biol Chem. 273:25628-36).

Em certos aspectos, a presente invenção refere-se ao uso de certos polipeptídeos de ActRIIB (por exemplo, polipeptídeos de ActRIIB solúveis) para antagonizar a sinalização de ligantes de ActRIIB em qualquer processo associado à atividade de ActRIIB. Opcionalmente, os polipeptídeos de ActRIIB da invenção podem antagonizar um ou mais ligantes de receptores ActRIIB, tais como activina, Nodal, GDF8, GDF11, e BMP7, e portanto, podem ser úteis no tratamento de distúrbios adicionais.

Portanto, a presente invenção considera o uso de polipeptídeos de ActRIIB no tratamento ou prevenção de doenças ou condições que estão associadas à atividade anormal de um ActRIIB ou um ligante de ActRIIB. ActRIIB ou ligantes de ActRIIB estão envolvidos na regulação de diversos processos biológicos críticos. Devido às suas funções importantes nestes processos, eles podem ser alvos desejáveis para intervenção terapêutica. Por exemplo, polipeptídeos de ActRIIB (por exemplo, polipeptídeos de ActRIIB solúveis) podem ser usados para tratar distúrbios ou condições em seres humanos ou animais. Exemplos de tais distúrbios ou condições incluem, mas não são limitados a, distúrbios metabólicos tais como diabetes tipo 2, tolerância à glicose prejudicada, síndrome metabólica (por exemplo, síndrome X), e resistência à insulina induzida por trauma (por exemplo, queimaduras ou desequilíbrio de nitrogênio); distúrbios do tecido adiposo (por exemplo, obesidade); distúrbios musculares e neuromusculares, tais como distrofia muscular (incluindo distrofia muscular de Duchenne); esclerose lateral amiotrófica (ALS); atrofia muscular; atrofia do órgão; fraqueza; síndrome do túnel carpal; doença pulmonar obstrutiva congestiva; e sarcopenia, caquexia e outras síndromes de perda muscular. Outros exemplos incluem osteoporose, especialmente nas mulheres mais velhas e/ou na pós-menopausa; osteoporose induzida por glucocorticóides; osteopenia; osteoartrite; e fraturas relacionadas à osteoporose. Outros exemplos ainda incluem massa óssea inferior devido à

terapia de glucocorticóide crônica, insuficiência gonadal prematura, supressão de andrógeno, deficiência de vitamina D, hiperparatireoidismo secundário, deficiências nutricionais, e anorexia nervosa. Estes distúrbios e condições são debatidos abaixo sob “Usos Terapêuticos Exemplares”.

5 Os termos usados neste relatório descritivo geralmente têm seus significados habituais na técnica, dentro do contexto desta invenção e no contexto específico onde cada termo é usado. Certos termos são debatidos abaixo ou em outra parte do relatório descritivo, para fornecer orientação adicional ao profissional praticante na descrição das composições e métodos da invenção e como prepará-los e usá-los. O escopo ou significado de qualquer
10 uso de um termo será evidente a partir do contexto específico em que o termo é usado.

Geralmente, “cerca de” e “aproximadamente” devem significar um grau aceitável de erro para a quantidade medida fornecendo a natureza ou precisão das medições. Tipicamente, graus exemplares de erro estão dentro de 20 por cento (%), preferivelmente dentro de 10 %, e mais preferivelmente dentro de 5 % de um valor ou faixa de valores
15 fornecido.

Alternativa e particularmente, em sistemas biológicos, os termos “cerca de” e “aproximadamente” podem significar valores que estão dentro de uma ordem de magnitude, preferivelmente dentro de 5 vezes e mais preferivelmente dentro de 2 vezes de um valor fornecido. Quantidades numéricas fornecidas neste relatório são aproximadas, a menos que
20 estabelecido de outro modo, significando que o termo “cerca de” ou “aproximadamente” pode ser inferido quando não expressamente estabelecido.

Os métodos da invenção podem incluir etapas de comparar sequências entre si, incluindo sequência do tipo selvagem a um ou mais mutantes (variantes de sequência). Tais comparações tipicamente compreendem alinhamentos de sequências poliméricas, por
25 exemplo, usando programas e/ou algoritmos de alinhamento de sequência que são bem conhecidos na técnica (por exemplo, BLAST, FASTA e MEGALIGN, entre outros). O técnico habilitado pode facilmente avaliar que, em tais alinhamentos, onde uma mutação contém uma inserção ou deleção de resíduo, o alinhamento de sequência introduzirá um “gap” (tipicamente representado por um traço, ou “A”) na sequência polimérica não contendo o
30 resíduo inserido ou suprimido.

“Homólogo,” em todas as suas formas gramaticais e variações de ortografia, refere-se ao relacionamento entre duas proteínas que possuem uma “origem evolutiva comum,” incluindo proteínas das superfamílias da mesma espécie de organismo, assim como proteínas homólogas de espécies diferentes de organismo. Tais proteínas (e seus ácidos
35 nucléicos codificantes) têm homologia de sequência, conforme refletido por sua similaridade de sequência, seja em termos de identidade percentual ou pela presença de resíduos ou motivos específicos e posições conservadas.

O termo “similaridade de sequência,” em todas as suas formas gramaticais, refere-se ao grau de identidade ou correspondência entre sequências de ácido nucléicos ou aminoácidos que podem ou não compartilhar uma origem evolutiva comum.

Entretanto, no uso comum e no presente pedido, o termo “homólogo,” quando
5 modificado com um advérbio tal como “altamente,” pode se referir à similaridade de sequência e pode ou não se referir a uma origem evolutiva comum.

2. Polipeptídeos de ActRIIB

Em certos aspectos, a invenção refere-se a polipeptídeos variantes de ActRIIB (por exemplo, polipeptídeos de ActRIIB solúveis). Opcionalmente, os fragmentos, variantes
10 funcionais, e formas modificadas têm as mesmas ou atividades biológicas similares de seus polipeptídeos de ActRIIB do tipo selvagem correspondentes. Por exemplo, uma variante de ActRIIB da invenção pode se ligar a, e inibir a função de um ligante de ActRIIB (por exemplo, activina A, activina AB, activina B, Nodal, GDF8, GDF11 ou BMP7). Opcionalmente, um polipeptídeo de ActRIIB modula o crescimento de tecidos, tais como
15 ossos, cartilagens, músculos ou gorduras. Exemplos de polipeptídeos de ActRIIB incluem polipeptídeo precursor de ActRIIB humano (SEQ ID NO: 2), e polipeptídeos de ActRIIB humano solúveis (por exemplo, SEQ ID NOs: 1, 5, 6 e 12).

A divulgação identifica funcionalmente as porções e variantes ativas de ActRIIB. Os requerentes confirmaram que uma proteína de fusão Fc tendo a sequência divulgada por
20 Hilden *et al.* (Blood. 15 Abr 1994;83(8): 2163-70), que tem uma Alanina na posição correspondente ao aminoácido 64 da SEQ ID NO: 2 (A64), tem uma afinidade relativamente baixa para activina e GDF-11. Ao contrário, a mesma proteína de fusão Fc com uma Arginina na posição 64 (R64) tem uma afinidade para activina e GDF-11 na faixa nanomolar baixa para picomolar alta. Portanto, uma sequência com uma R64 é usada como a
25 sequência referência do tipo selvagem para ActRIIB humano nesta divulgação.

Attisano *et al.* (Cell. 10 Jan 1992;68(I):97-108) mostrou que uma deleção da prolina ligada no C-terminal do domínio extracelular de ActRIIB reduziu a afinidade do receptor para activina. Os dados apresentados neste relatório mostram que uma proteína de fusão de ActRIIB-Fc contendo os aminoácidos 20 a 119 da SEQ ID NO: 2, “ActRIIB(20 a 119)-Fc” tem
30 ligação reduzida para GDF-11 e activina em relação a um ActRIIB(20 a 134)-Fc, que inclui a prolina ligada na região e o domínio justamembranar completo. Entretanto, uma proteína de ActRIIB(20 a 129)-Fc retém atividade similar, porém algumas vezes reduzida em relação ao tipo selvagem, ainda que a prolina ligada na região seja rompida. Assim, espera-se que os domínios extracelulares de ActRIIB que param no aminoácido 134, 133, 132, 131, 130 e 129
35 sejam todos ativos, porém constructos que param no 134 ou 133 podem ser mais ativos. Similarmente, espera-se que as mutações em qualquer um dos resíduos 129 a 134 não alterem a afinidade de ligação ao ligante em grandes margens. Em defesa disto, as

mutações P129 e P130 não diminuem substancialmente a ligação ao ligante. Portanto, uma proteína de fusão de ActRTTB-Fc pode terminar como iniciar como o aminoácido 109 (a cisteína final), entretanto, espera-se que as formas terminando em, ou entre 109 e 119 tenham ligação ao ligante reduzida. O aminoácido 119 é deficientemente conservado e desse modo é facilmente alterado ou truncado. As formas terminando em 128 ou mais retêm atividade de ligação do ligante. As formas terminando em, ou entre 119 e 127 terão uma capacidade de ligação intermediária. Qualquer uma destas formas pode ser desejável para o uso, dependendo do ajuste clínico ou experimental.

No N-terminal de ActRIIB, espera-se que uma proteína iniciando no aminoácido 29 ou antes retenha a atividade de ligação do ligante. O aminoácido 29 representa a cisteína inicial. Uma mutação de alanina para asparagina na posição 24 introduz uma sequência de glicosilação N-ligada sem afetar substancialmente a ligação ao ligante. Isto confirma que mutações na região entre a clivagem do peptídeo sinal e a região reticulada de cisteína, correspondente a aminoácidos 20 a 29 são bem toleradas. Em particular, constructos iniciando na posição 20, 21, 22, 23 e 24 reterão a atividade, e também espera-se que os constructos iniciando nas posições 25, 26, 27, 28 e 29 retenham a atividade. Os dados mostrados nos Exemplos demonstram que, surpreendentemente, um constructo iniciando em 22, 23, 24 ou 25 terá a maior atividade.

Uma porção ativa de ActRIIB compreende aminoácidos 29 a 109 da SEQ ID NO: 2, e constructos podem, por exemplo, iniciar em um resíduo correspondente aos aminoácidos 20 a 29 e terminar em uma posição correspondente aos aminoácidos 109 a 134. Outros exemplos incluem constructos que iniciam em uma posição de 20 a 29 ou 21 a 29 e terminam em uma posição de 119 a 134, 119 a 133 ou 129 a 134, 129 a 133. Outros exemplos incluem constructos que iniciam em uma posição de 20 a 24 (ou 21 a 24, ou 22 a 25) e terminam em uma posição de 109 a 134 (ou 109 a 133), 119 a 134 (ou 119 a 133) ou 129 a 134 (ou 129 a 133). Variantes dentro destas faixas também são consideradas, particularmente aquelas tendo pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou 99 % de identidade à porção correspondente da SEQ ID NO: 4.

A divulgação inclui os resultados de uma análise de estruturas de ActRIIB de compósito, mostrados na Figura 22, demonstrando que o sítio de ligação ao ligante é definido pelos resíduos Y31, N33, N35, L38 a T41, E47, E50, Q53 a K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 a N83, Y85, R87, A92, e E94 a F101. Nestas posições, espera-se que mutações conservativas sejam toleradas, embora uma mutação K74A seja bem tolerada, como são R40A, K55A, F82A e mutações na posição L79. R40 é um K em *Xenopus*, indicando que aminoácidos básicos nesta posição serão tolerados. Q53 é R em ActRIIB bovino e K em ActRIIB de *Xenopus*, e portanto aminoácidos incluindo R, K, Q, N e H serão tolerados nesta posição. Assim, uma fórmula geral para uma proteína variante de ActRIIB

ativa é aquela que compreende aminoácidos 29 a 109, porém opcionalmente iniciando em uma posição variando de 20 a 24 ou 22 a 25 e terminando em uma posição variando de 129 a 134, e compreendendo não mais do que 1, 2, 5, 10 ou 15 alterações de aminoácido conservativas no sítio de ligação ao ligante, e zero, uma ou mais alterações não conservativas nas posições 40, 53, 55, 74, 79 e/ou 82 no sítio de ligação ao ligante. Uma tal proteína pode reter mais do que 80 %, 90 %, 95 % ou 99 % de identidade da sequência à sequência de aminoácidos 29 a 109 da SEQ ID NO: 4. Sítios fora do sítio de ligação, em que a variabilidade pode ser particularmente bem tolerada, incluem o terminal amino e carbóxi do domínio extracelular (conforme observado acima), e posições 42 a 46 e 65 a 73.

Uma asparagina para alteração de alanina na posição 65 (N65A) realmente melhora a ligação ao ligante na base A64, e assim, espera-se que não tenha efeito prejudicial na ligação ao ligante na base R64. Esta mudança provavelmente elimina a glicosilação na N65 na base A64, assim demonstrando que uma mudança significativa nesta região provavelmente pode ser tolerada. Embora uma mudança de R64A seja deficientemente tolerada, R64K é bem tolerado, e assim um outro resíduo básico, tal como H pode ser tolerado na posição 64.

ActRIIB é bem conservado em quase todos os vertebrados, com extensões grandes do domínio extracelular completamente conservado. Qualquer um dos ligantes que se liga ao ActRIIB também são altamente conservados. Consequentemente, comparações de sequências de ActRIIB a partir de vários organismos de vertebrados fornecem critérios nos resíduos que podem ser alterados. Portanto, uma variante ativa de ActRIIB humano pode incluir um ou mais aminoácidos em posições correspondentes a partir da sequência de um outro ActRIIB de vertebrado, ou pode incluir um resíduo que é similar àquele na sequência humana ou de outro vertebrado. Os exemplos seguintes ilustram este método para definir uma variante ativa de ActRIIB. L46 é uma valina em ActRIIB de *Xenopus*, e desse modo esta posição pode ser alterada, e opcionalmente pode ser alterada a um outro resíduo hidrofóbico, tal como V, I ou F, ou um resíduo não polar tal como A. E52 é um K em *Xenopus*, indicando que este sítio pode ser tolerante a uma ampla variedade de mudanças, incluindo resíduos polares, tais como E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y e provavelmente A. T93 é um K em *Xenopus*, indicando que uma ampla variação estrutural é tolerada nesta posição, com resíduos polares favorecidos, tais como S, K, R, E, D, H, G, P, G e Y. F108 é um Y em *Xenopus*, e portanto Y ou outro grupo hidrofóbico, tal como I, V ou L deve ser tolerado. E111 é K em *Xenopus*, indicando que resíduos carregados serão tolerados nesta posição, incluindo D, R, K e H, assim como Q e N. R112 é K em *Xenopus*, indicando que resíduos básicos são tolerados nesta posição, incluindo R e H. A na posição 119 é relativa e deficientemente conservada, e aparece como P em roedores e V em *Xenopus*, assim, essencialmente qualquer aminoácido deve ser tolerado nesta posição.

A divulgação demonstra que a adição de um outro sítio de glicosilação N-ligado (N-X-S/T) aumenta a meia vida do soro de uma proteína de fusão de ActRIIB-Fc, em relação à forma de ActRIIB(R64)-Fc. Introduzindo-se uma asparagina na posição 24 (constructo A24N), uma sequência NXT é criada, a qual confere uma meia vida mais longa. Outras

5 sequências NX(T/S) são encontradas em 42 a 44 (NQS) e 65 a 67 (NSS), embora a última não possa ser eficazmente glicosilada com R na posição 64. Geralmente, as sequências N-X-S/T podem ser introduzidas nas posições fora do sítio de ligação ao ligante definido na Figura 12. Sítios particularmente adequados para a introdução de sequências N-X-S/T não endógenas incluem aminoácidos 20 a 29, 20 a 24, 22 a 25, 109 a 134, 120 a 134 ou 129 a

10 134. Sequências N-X-S/T também podem ser introduzidas no ligador entre a sequência de ActRIIB e de Fc ou outro componente de fusão. Um tal sítio pode ser introduzido com esforço mínimo introduzindo-se um N na posição correta com respeito a um S ou T pré-existente, ou introduzindo-se um S ou T em uma posição correspondente a um N pré-existente. Assim, alterações desejáveis que criariam um sítio de glicosilação N-ligado são:

15 A24N, R64N, S67N (possivelmente combinados com uma alteração de N65A), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S e R112T. Qualquer S que é prognosticado ser glicosilado pode ser alterado a um T sem criar um sítio imunogênico, por causa da proteção fornecida pela glicosilação. Do mesmo modo, qualquer T que é prognosticado ser glicosilado pode ser alterado a um S. Assim as alterações de S67T e S44T são

20 consideradas. Do mesmo modo, em uma variante de A24N, uma alteração de S26T pode ser usada. Consequentemente, uma variante de ActRIIB pode incluir um ou mais consensos adicionais de glicosilação N-ligada não endógena.

A posição L79 pode ser alterada para conferir as propriedades de ligação de activina - miostatina (GDF-11) alteradas. L79A ou L79P reduz a ligação de GDF-11 a uma

25 extensão maior do que a ligação de activina. L79E ou L79D retém a ligação de GDF-11. Notavelmente, as variantes de L79E e L79D têm ligação de activina altamente reduzida. Experimentos *in vivo* indicam que estes receptores de não activina retêm a capacidade significativa de aumentar a massa muscular, porém mostram efeitos diminuídos em outros tecidos. Estes dados demonstram a desejabilidade e possibilidade de se obter polipeptídeos

30 com efeitos reduzidos sobre activina.

As variações descritas podem ser combinadas de várias maneiras. Adicionalmente, os resultados do programa de mutagênese descritos neste relatório indicam que existem posições de aminoácidos em ActRIIB que são frequentemente benéficas para conservação. Estas incluem a posição 64 (aminoácido básico), posição 80 (aminoácido ácido ou

35 hidrofóbico), posição 78 (hidrofóbico, e particularmente triptofano), posição 37 (ácido, e particularmente ácido aspártico ou glutâmico), posição 56 (aminoácido básico), posição 60 (aminoácido hidrofóbico, particularmente fenilalanina ou tirosina). Assim, em cada uma das

variantes divulgadas neste relatório, a divulgação fornece uma estrutura de aminoácidos que pode ser conservada. Outras posições que podem ser desejáveis para conservação são as seguintes: posição 52 (aminoácido ácido), posição 55 (aminoácido básico), posição 81 (ácido), 98 (polar ou carregado, particularmente E, D, R ou K).

5 Em certas modalidades, fragmentos isolados dos polipeptídeos de ActRIIB podem ser obtidos pela triagem de polipeptídeos recombinantemente produzidos a partir do fragmento correspondente do ácido nucléico que codifica um polipeptídeo de ActRIIB (por exemplo, SEQ ID NOs: 3 e 4). Além disso, fragmentos podem ser quimicamente sintetizados usando técnicas conhecidas no ramo, tais como a química de f-Moc ou t-Boc de fase sólida de Merrifield convencional. Os fragmentos podem ser produzidos (recombinantemente ou
10 por síntese química) e testados para identificar aqueles fragmentos peptídica que podem funcionar, por exemplo, como antagonistas (inibidores) ou agonistas (ativadores) de uma proteína de ActRIIB ou um ligante de ActRIIB.

Em certas modalidades, uma variante funcional dos polipeptídeos de ActRIIB tem
15 uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75 % idêntica a uma sequência de aminoácidos selecionada da SEQ ID NOs: 3, 4 e 10. Em certos casos, a variante funcional tem uma sequência de aminoácidos pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % ou 100 % idêntica a uma sequência de aminoácidos selecionada da SEQ ID NOs: 3, 4 e 10.

Em certas modalidades, a presente invenção considera a preparação de variantes
20 funcionais modificando-se a estrutura de um polipeptídeo de ActRIIB para tais propósitos, como realçar a eficácia terapêutica, ou estabilidade (por exemplo, vida útil *ex vivo* e resistência à degradação proteolítica *in vivo*). Polipeptídeos de ActRIIB modificados também podem ser produzidos, por exemplo, por substituição, deleção, ou adição de aminoácidos. Por exemplo, é razoável esperar que uma reposição isolada de uma leucina com uma
25 isoleucina ou valina, um aspartato com um glutamato, uma treonina com uma serina, ou uma reposição similar de um aminoácido com um aminoácido estruturalmente relacionado (por exemplo, mutações conservativas) não terá um efeito principal na atividade biológica da molécula resultante. Reposições conservativas são aquelas que ocorrem dentro de uma família de aminoácidos que estão relacionados em suas cadeias laterais. Uma mudança na
30 sequência de aminoácidos de um polipeptídeo de ActRIIB resulta em um homólogo funcional pode ser facilmente determinado avaliando-se a capacidade de o polipeptídeo de ActRIIB variante produzir uma resposta em células em uma forma similar ao polipeptídeo de ActRIIB do tipo selvagem, ou se ligar a um ou mais ligantes, tais como activina, GDF-11 ou miostatina em uma forma similar ao tipo selvagem.

35 Em certas modalidades específicas, a presente invenção considera a preparação de mutações no domínio extracelular (também referido como domínio de ligação ao ligante) de um polipeptídeo de ActRIIB tal que o polipeptídeo de ActRIIB variante (ou mutante) tem

atividades de ligação ao ligante alteradas (por exemplo, afinidade de ligação ou especificidade de ligação). Em certos casos, tais polipeptídeos de ActRIIB variante têm afinidade de ligação alterada (elevada ou reduzida) para um ligante específico. Em outros casos, os polipeptídeos de ActRIIB variantes têm especificidade de ligação alterada para seus ligantes.

Por exemplo, a divulgação fornece polipeptídeos de ActRIIB variantes que preferencialmente se ligam a GDF8/GDF11 em relação a activinas. A divulgação estabelece ainda a desejabilidade de tais polipeptídeos reduzirem os efeitos “off-target”, embora tais variantes seletivas possam ser menos desejáveis para o tratamento de doenças severas onde ganhos muito altos na massa muscular podem ser necessários para efeito terapêutico e onde algum nível do efeito “off-target” é aceitável. Por exemplo, resíduos de aminoácidos da proteína de ActRIIB, tais como E39, K55, Y60, K74, W78, D80, e F101, estão no sítio de ligação ao ligante e são responsáveis por mediar a ligação aos seus ligantes, tais como activina e GDF8. Assim, a presente invenção fornece um domínio de ligação ao ligante alterado (por exemplo, domínio de ligação a GDF8) de um receptor ActRIIB, que compreende uma ou mais mutações nesses resíduos de aminoácidos. Opcionalmente, o domínio de ligação ao ligante alterado pode ter seletividade aumentada para um ligante, tal como GDF8 em relação a um domínio de ligação ao ligante do tipo selvagem de um receptor ActRIIB. Para fins de ilustração, estas mutações aumentam a seletividade do domínio de ligação ao ligante alterado para GDF8 sobre activina. Opcionalmente, o domínio de ligação ao ligante alterado tem uma razão de K_d para ligação de activina para K_d para ligação de GDF8 que é pelo menos 2, 5, 10, ou ainda 100 vezes maior em relação à razão para o domínio de ligação ao ligante do tipo selvagem. Opcionalmente, o domínio de ligação ao ligante alterado tem uma razão de IC_{50} para inibir activina para IC_{50} para inibir GDF8 que é pelo menos 2, 5, 10, ou ainda 100 vezes maior em relação ao domínio de ligação ao ligante do tipo selvagem. Opcionalmente, o domínio de ligação ao ligante alterado inibe GDF8 com uma IC_{50} pelo menos 2, 5, 10, ou ainda 100 vezes menor do que a IC_{50} para inibir activina.

Como um exemplo específico, o resíduo de aminoácido positivamente carregado Asp (D80) do domínio de ligação ao ligante de ActRIIB pode ser submetido à mutação a um resíduo de aminoácido diferente, tal que o polipeptídeo de ActRIIB variante preferencialmente se liga a GDF8, porém não à activina. Preferivelmente, o resíduo D80 é modificado a um resíduo de aminoácido selecionado do grupo que consiste de: um resíduo de aminoácido não carregado, um resíduo de aminoácido negativo, e um resíduo de aminoácido hidrofóbico. Como um exemplo específico adicional, o resíduo hidrofóbico, L79, pode ser alterado aos aminoácidos ácidos, ácido aspártico ou ácido glutâmico, para reduzir consideravelmente a ligação de activina retendo a ligação de GDF11. Como será

reconhecido por aqueles de habilidade na técnica, a maioria das mutações, variantes ou modificações descrita pode ser preparada no nível do ácido nucléico ou, em alguns casos, por modificação pós-tradução ou síntese química. Tais técnicas são bem conhecidas no ramo.

5 Em certas modalidades, a presente invenção considera mutações específicas dos polipeptídeos de ActRIIB de modo a alterar a glicosilação do polipeptídeo. Sítios de glicosilação exemplares em polipeptídeos de ActRIIB são ilustrados na Figura 2. Tais mutações podem ser selecionadas de modo a introduzir ou eliminar um ou mais sítios de glicosilação, tais como sítios de glicosilação O-ligados ou N-ligados. Sítios de reconhecimento de glicosilação ligada à asparagina geralmente compreendem uma
10 sequência tripeptídica, asparagina-X-treonina (onde “X” é qualquer aminoácido) que é especificamente reconhecida por enzimas de glicosilação celular apropriadas. A alteração também pode ser feita pela adição ou substituição de um ou mais resíduos de serina ou treonina à sequência do polipeptídeo de ActRIIB do tipo selvagem (para sítios de glicosilação O-ligados). Uma variedade de substituições ou deleções de aminoácidos em
15 uma ou na primeira ou terceira posição de aminoácidos de um sítio de reconhecimento de glicosilação (e/ou deleção de aminoácido na segunda posição) resulta na não glicosilação na sequência tripeptídica modificada. Um outro meio de aumentar o número de porções de carboidrato em um polipeptídeo de ActRIIB é pela ligação química ou enzimática de
20 glicosídeos ao polipeptídeo de ActRIIB. Dependendo do modo de ligação usado, o açúcar podem ser ligado a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxila livres; (c) grupos sulfidríla livres, tais como aqueles de cisteína; (d) grupos hidroxila livres, tais como aqueles de serina, treonina, ou hidroxiprolina; (e) resíduos aromáticos, tais como aqueles de fenilalanina, tirosina, ou triptofano; ou (f) o grupo amida de glutamina. Estes métodos são descritos na
25 WO 87/05330 publicada em 11 de Setembro de 1987, e em Aplin e Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., páginas 259-306, incorporados como referência neste relatório. A remoção de uma ou mais porções de carboidrato presentes em um polipeptídeo de ActRIIB pode ser realizada química e/ou enzimaticamente. A desglicosilação química pode envolver, por exemplo, a exposição do polipeptídeo de ActRIIB ao composto ácido
30 trifluorometanossulfônico, ou um composto equivalente. Este tratamento resulta na clivagem de muitos ou todos os açúcares, exceto o açúcar de ligação (N-acetilglucosamina ou N-acetilgalactosamina), deixando a sequência de aminoácidos intacta. A desglicosilação química é descrita ainda por Hakimuddin *et al.* (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 e por Edge *et al.* (1981) Anal. Biochem. 118:131. A clivagem enzimática de porções de
35 carboidrato em polipeptídeos de ActRIIB pode ser obtida pelo uso de uma variedade de endo e exoglicosidases, conforme descrito por Thotakura *et al.* (1987) Meth. Enzymol. 138:350. A sequência de um polipeptídeo de ActRIIB pode ser ajustada, conforme

apropriado, dependendo do tipo de sistema de expressão usado, como células de mamíferos, leveduras, insetos e plantas, todas podem introduzir padrões de glicosilação diferentes que podem ser afetados pela sequência de aminoácidos do peptídeo. No geral, proteínas de ActRIIB para o uso em seres humanos serão expressadas em uma linhagem celular de mamífero que fornece glicosilação apropriada, tal como linhagens celulares de HEK293 ou CHO, embora espera-se que outras linhagens celulares de expressão em mamíferos também sejam úteis.

Esta divulgação considera ainda um método de gerar variantes, particularmente conjuntos de variantes combinatórias de um polipeptídeo de ActRIIB, incluindo, opcionalmente, variantes de truncamento; “pools” de mutantes combinatórios são especialmente úteis para identificar sequências variantes funcionais. O propósito da triagem de tais bibliotecas combinatórias pode ser gerar, por exemplo, variantes de polipeptídeo de ActRIIB que tenham propriedades alteradas, tais como farmacocinética alterada, ou ligação ao ligante alterada. Uma variedade de ensaios de triagem é fornecida abaixo, e tais ensaios podem ser usados para avaliar as variantes. Por exemplo, uma variante de polipeptídeo de ActRIIB pode ser triada quanto à capacidade de se ligar a um polipeptídeo de ActRIIB, para prevenir a ligação de um ligante de ActRIIB a um polipeptídeo de ActRIIB.

A atividade de um polipeptídeo de ActRIIB ou de suas variantes também pode ser testada em um ensaio com base celular ou *in vivo*. Por exemplo, o efeito de uma variante de polipeptídeo de ActRIIB na expressão de genes envolvidos na produção óssea em um osteoblasto ou precursor pode ser avaliado. Isto pode, conforme necessário, ser realizado na presença de uma ou mais proteínas de ligante de ActRIIB recombinantes (por exemplo, BMP7), e células podem ser transfectadas de modo a produzir um polipeptídeo de ActRIIB e/ou variantes do mesmo, e opcionalmente, um ligante de ActRIIB. Do mesmo modo, um polipeptídeo de ActRIIB pode ser administrado a um camundongo ou outro animal, e uma ou mais propriedades ósseas, tais como densidade ou volume, podem ser avaliadas. A taxa de restabelecimento para fraturas ósseas também pode ser avaliada. Similarmente, a atividade de um polipeptídeo de ActRIIB ou suas variantes pode ser testada em células musculares, adipócitos, e células neuronais quanto a qualquer efeito sobre o crescimento destas células, por exemplo, pelos ensaios, conforme descrito abaixo. Tais ensaios são bem conhecidos e rotineiros na técnica. Um gene repórter responsivo a SMAD pode ser usado em tais linhagens celulares para monitorar os efeitos sobre a sinalização.

Variantes combinatoriamente derivadas podem ser geradas, as quais têm uma potência seletiva em relação a um polipeptídeo de ActRIIB que ocorre naturalmente. Tais proteínas variantes, quando expressadas a partir de constructos de DNA recombinante, podem ser usadas em protocolos de terapia genética. Do mesmo modo, a mutagênese pode dar origem a variantes que têm meias vidas intracelulares dramaticamente diferentes do que

as correspondentes de um polipeptídeo de ActRIIB do tipo selvagem. Por exemplo, a proteína alterada pode se tornar mais ou menos estável à degradação proteolítica ou outros processos que resultam na destruição ou, de outro modo, inativação de um polipeptídeo de ActRIIB nativo. Tais variantes, e os genes que as codificam, podem ser utilizadas para

5 alterar níveis de polipeptídeo de ActRIIB modulando-se a meia vida dos polipeptídeos de ActRIIB. Por exemplo, uma meia vida curta pode dar origem a efeitos biológicos mais transitórios e, quando parte de um sistema de expressão induzível, pode permitir um controle mais estreito de níveis de polipeptídeo de ActRIIB recombinante dentro da célula.

Em certas modalidades, os polipeptídeos de ActRIIB da invenção podem

10 compreender ainda modificações pós-tradução, além daquelas que estão naturalmente presentes nos polipeptídeos de ActRIIB. Tais modificações incluem, mas não são limitadas a, acetilação, carboxilação, glicosilação, fosforilação, lipidação, e acilação. Como um resultado, o polipeptídeos de ActRIIB modificados podem conter elementos de não aminoácidos, tais como polietilenoglicóis, lipídeos, poli ou monossacarídeo, e fosfatos.

15 Efeitos de tais elementos de não aminoácidos na funcionalidade de um polipeptídeo de ActRIIB podem ser testados, conforme descrito neste relatório, quanto a outras variantes de polipeptídeo de ActRIIB. Quando um polipeptídeo de ActRIIB é produzido em células clivando-se uma forma embrionária do polipeptídeo de ActRIIB, o processamento pós-tradução também pode ser importante para duplicação e/ou função correta da proteína.

20 Células diferentes (tais como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 ou HEK293) têm mecanismos celulares específicos e mecanismos característicos para tais atividades pós-tradução e podem ser escolhidas para garantir a modificação e processamento corretos dos polipeptídeos de ActRIIB.

Em certos aspectos, variantes funcionais ou formas modificadas dos polipeptídeos

25 de ActRIIB incluem proteínas de fusão tendo pelo menos uma porção dos polipeptídeos de ActRIIB e um ou mais domínios de fusão. Exemplos bem conhecidos de tais domínios de fusão incluem, mas não são limitados a, polistidina, Glu-Glu, glutathione S-transferase (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G, uma região constante de cadeia pesada de imunoglobulina (por exemplo, um Fc), proteína de ligação à maltose (MBP), ou albumina

30 sérica humana. Um domínio de fusão pode ser selecionado de modo a conferir uma propriedade desejada. Por exemplo, alguns domínios de fusão são particularmente úteis para o isolamento das proteínas de fusão por cromatografia de afinidade. Para o propósito de purificação por afinidade, matrizes relevantes para cromatografia de afinidade, tais como resinas conjugadas à glutathione, amilase, e níquel ou cobalto são usadas. Muitas de tais

35 matrizes estão disponíveis na forma de "kit", tal como o sistema de purificação GST da Pharmacia e o sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil com pares de fusão (HIS₆). Como um outro exemplo, um domínio de fusão pode ser selecionado de modo a facilitar a detecção

dos polipeptídeos de ActRIIB. Exemplos de tais domínios de detecção incluem várias proteínas fluorescentes (por exemplo, GFP) assim como “tags de epítipo,” que são usualmente sequências de peptídeos curtas para que um anticorpo específico esteja disponível. Tags de epítipo bem conhecidas para que os anticorpos monoclonais

5 específicos estejam facilmente disponíveis incluem FLAG, hemaglutinina do vírus influenza (HA), e tags c-myc. Em alguns casos, os domínios de fusão têm um sítio de clivagem da protease, tal como para o Fator Xa ou Trombina, que permite que a protease relevante realize parcialmente a digestão das proteínas de fusão e desse modo libere as proteínas recombinantes deste. As proteínas liberadas depois podem ser isoladas do domínio de

10 fusão por separação cromatográfica subsequente. Em certas modalidades preferidas, um polipeptídeo de ActRIIB é fundido com um domínio que estabiliza o polipeptídeo de ActRIIB *in vivo* (um domínio “estabilizador”). O termo “estabilizar” significa aumentar a meia vida do soro, independentemente se é por causa da destruição diminuída, liberação diminuída pelos rins, ou outros efeitos farmacocinéticos. As fusões com a porção Fc de uma imunoglobulina

15 conferem propriedades farmacocinéticas desejáveis em uma faixa ampla de proteínas. Do mesmo modo, fusões com albumina sérica humana podem conferir propriedades desejáveis. Outros tipos de domínios de fusão que podem ser selecionados incluem domínios de multimerização (por exemplo, dimerização, tetramerização) e domínios funcionais (que conferem uma função biológica adicional, tal como estimulação adicional do

20 crescimento muscular).

Como um exemplo específico, a presente invenção fornece uma proteína de fusão como um antagonista de GDF8 que compreende um domínio extracelular (por exemplo, ligação ao GDF8) fundido a um domínio Fc (por exemplo, SEQ ID NO: 13).

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD (A)

25 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A)

VSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN

GQPENNYKTTTPVLDSGPFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN (A)

HYTQKSLSLSPGK*

Preferivelmente, o domínio Fc tem uma ou mais mutações nos resíduos, tais como

30 Asp-265, lisina 322, e Asn-434. Em certos casos, o domínio Fc mutante tendo uma ou mais destas mutações (por exemplo, mutação Asp-265) tem capacidade reduzida de ligação ao receptor Fcγ em relação a um domínio Fc do tipo selvagem. Em outros casos, o domínio Fc mutante tendo uma ou mais destas mutações (por exemplo, mutação Asn-434) tem capacidade aumentada de ligação ao receptor Fc relacionado a MHC de classe I (FcRN) em

35 relação a um domínio Fc do tipo selvagem.

É entendido que elementos diferentes das proteínas de fusão podem ser arranjados de qualquer maneira que seja compatível com a funcionalidade desejada. Por exemplo, um

polipeptídeo de ActRIIB pode ser colocado no C-terminal em um domínio heterólogo, ou, alternativamente, um domínio heterólogo pode ser colocado no C-terminal em um polipeptídeo de ActRIIB. O domínio do polipeptídeo de ActRIIB e o domínio heterólogo não precisam ser adjacentes em uma proteína de fusão, e domínios adicionais ou sequências de aminoácidos podem ser incluídos no C- ou N-terminal em qualquer domínio ou entre os domínios.

Em certas modalidades, os polipeptídeos de ActRIIB da presente invenção contêm uma ou mais modificações que são capazes de estabilizar os polipeptídeos de ActRIIB. Por exemplo, tais modificações realçam a meia vida *in vitro* dos polipeptídeos de ActRIIB, realçam a meia vida circulatória dos polipeptídeos de ActRIIB ou reduzem a degradação proteolítica dos polipeptídeos de ActRIIB. Tais modificações estabilizantes incluem, mas não são limitadas a, proteínas de fusão (incluindo, por exemplo, proteínas de fusão compreendendo um polipeptídeo de ActRIIB e um domínio estabilizador), modificações de um sítio de glicosilação (incluindo, por exemplo, a adição de um sítio de glicosilação a um polipeptídeo de ActRIIB), e modificações da porção de carboidrato (incluindo, por exemplo, a remoção de porções de carboidrato de um polipeptídeo de ActRIIB). No caso de proteínas de fusão, um polipeptídeo de ActRIIB é fundido a um domínio estabilizador, tal como uma molécula de IgG (por exemplo, um domínio Fc). Conforme usado neste relatório, o termo “domínio estabilizador” não se refere apenas a um domínio de fusão (por exemplo, Fc) como no caso de proteínas de fusão, mas também inclui modificações não proteináceas, tais como uma porção de carboidrato, ou polímero não proteináceo, tal como polietilenoglicol.

Em certas modalidades, a presente invenção torna disponível as formas isoladas e/ou purificadas dos polipeptídeos de ActRIIB, que são isoladas, ou de outro modo, substancialmente livres de outras proteínas.

Em certas modalidades, polipeptídeos de ActRIIB (não modificados ou modificados) da invenção podem ser produzidos por uma variedade de técnicas conhecidas no ramo. Por exemplo, tais polipeptídeos de ActRIIB podem ser sintetizados usando técnicas de química de proteína padrão, tais como aquelas descritas em Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlim (1993) e Grant G. A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman e Company, Nova Iorque (1992). Além disso, sintetizadores de peptídeo automáticos estão comercialmente disponíveis (por exemplo, Modelo 396 da Advanced ChemTech; Milligen/Biosearch 9600). Alternativamente, os polipeptídeos de ActRIIB, fragmentos ou variantes dos mesmos podem ser recombinantemente produzidos usando vários sistemas de expressão (por exemplo, *E. coli*, células de Ovário de Hamster Chinês, células COS, baculovírus) como é bem conhecido na técnica (veja também abaixo). Em uma modalidade adicional, os polipeptídeos de ActRIIB modificados ou não modificados podem ser produzidos pela digestão de polipeptídeos de ActRIIB de comprimento total que

ocorrem naturalmente ou recombinantemente produzidos usando-se, por exemplo, uma protease, por exemplo, tripsina, termolisina, quimiotripsina, pepsina, ou enzima de conversão de aminoácidos básicos pareados (PACE). A análise por computador (usando um software comercialmente disponível, por exemplo, Mac Vector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) pode ser usada para identificar sítios de clivagem proteolítica. Alternativamente, tais polipeptídeos de ActRIIB podem ser produzidos a partir de polipeptídeos de ActRIIB de comprimento total que ocorrem naturalmente ou recombinantemente produzidos, tal como por técnicas padrão conhecidas no ramo, tais como por clivagem química (por exemplo, brometo de cianogênio, hidroxilamina).

3. Ácidos nucleicos Que Codificam Polipeptídeos de ActRIIB

Em certos aspectos, a invenção fornece ácidos nucleicos isolados e/ou recombinantes que codificam qualquer um dos polipeptídeos de ActRIIB (por exemplo, polipeptídeos de ActRIIB solúveis), incluindo qualquer uma das variantes divulgadas neste relatório. Por exemplo, a SEQ ID NO: 4 codifica um polipeptídeo precursor de ActRIIB que ocorre naturalmente, enquanto a SEQ ID NO: 3 codifica um polipeptídeo de ActRIIB solúvel. Os ácidos nucleicos objeto podem ser de filamento único ou de filamento duplo. Tais ácidos nucleicos podem ser moléculas de DNA ou RNA. Estes ácidos nucleicos podem ser usados, por exemplo, em métodos para fabricar polipeptídeos de ActRIIB ou como agentes terapêuticos diretos (por exemplo, em um método de terapia genética).

Em certos aspectos, os ácidos nucleicos objeto que codificam os polipeptídeos de ActRIIB incluem ácidos nucleicos que são variantes da SEQ ID NO: 3. Sequências nucleotídicas variantes incluem sequências que diferem por uma ou mais substituições, adições ou deleções de nucleotídeo, tais como variantes alélicas; e, portanto, incluirão sequências de codificação que diferem da sequência nucleotídica da sequência de codificação designada na SEQ ID NO: 4.

Em certas modalidades, a invenção fornece sequências de ácido nucleico isoladas ou recombinantes que são pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % ou 100 % idênticas à SEQ ID NO: 3. Uma pessoa de habilidade comum na técnica avaliará que as sequências de ácido nucleico complementares à SEQ ID NO: 3, e variantes da SEQ ID NO: 3 também estão dentro do escopo desta invenção. Em modalidades adicionais, as sequências de ácido nucleico da invenção podem ser isoladas, recombinantes, e/ou fundidas com uma sequência nucleotídica heteróloga, ou em uma biblioteca de DNA.

Em outras modalidades, ácidos nucleicos da invenção também incluem sequências nucleotídicas que hibridizam sob condições altamente estritas à sequência nucleotídica designada na SEQ ID NO: 3, sequência complementar da SEQ ID NO: 3, ou fragmentos das mesmas. Conforme debatido acima, uma pessoa de habilidade comum na técnica entenderá facilmente que as condições de estringência apropriadas, as quais promovem a hibridização

de DNA, podem ser variadas. Uma pessoa de habilidade comum na técnica entenderá facilmente que as condições de estringência apropriadas, as quais promovem a hibridização de DNA, podem ser variadas. Por exemplo, uma pessoa pode realizar a hibridização em 6,0 x cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) a cerca de 45 °C, seguido por uma lavagem de 2,0 x SSC a 50 °C. Por exemplo, a concentração de sal na etapa de lavagem pode ser selecionada a partir de uma estringência baixa de cerca de 2,0 x SSC a 50 °C a uma estringência alta de cerca de 0,2 x SSC a 50 °C. Além disso, a temperatura na etapa de lavagem pode ser aumentada a partir de condições de estringência baixa na temperatura ambiente, cerca de 22 °C, para condições de estringência alta a cerca de 65 °C. Tanto a temperatura quanto o sal podem ser variados, ou a temperatura ou a concentração de sal podem ser mantidas constantes, enquanto a outra variável é modificada. Em uma modalidade, a invenção fornece ácidos nucleicos que hibridizam sob condições de estringência baixa de 6 x SSC na temperatura ambiente seguido por uma lavagem em 2 x SSC na temperatura ambiente.

Ácidos nucleicos isolados que diferem dos ácidos nucleicos apresentados na SEQ ID NO: 3 devido à degeneração no código genético também estão dentro do escopo da invenção. Por exemplo, vários aminoácidos são designados por mais do que um tripleto. Códon que especificam o mesmo aminoácido, ou sinônimos (por exemplo, CAU e CAC são sinônimos para histidina) podem resultar em mutações "silenciosas" que não afetam a sequência de aminoácidos da proteína. Entretanto, espera-se que os polimorfismos da sequência de DNA que levam a mudanças nas sequências de aminoácidos das proteínas objeto existam entre células de mamífero. Uma pessoa habilitada na técnica avaliará que estas variações em um ou mais nucleotídeos (até cerca de 3 a 5 % dos nucleotídeos) dos ácidos nucleicos que codificam uma proteína particular podem existir entre indivíduos de uma espécie fornecida devido à variação alélica natural. Quaisquer e todas as tais variações nucleotídicas e polimorfismos de aminoácidos resultantes estão dentro do escopo desta invenção.

Em certas modalidades, os ácidos nucleicos recombinantes da invenção podem ser operavelmente ligados a uma ou mais sequências nucleotídicas regulatórias em um constructo de expressão. Sequências nucleotídicas regulatórias geralmente serão apropriadas para a célula hospedeira usada para a expressão. Tipos numerosos de vetores de expressão apropriados e sequências regulatórias adequadas são conhecidos na técnica para uma variedade de células hospedeiras. Tipicamente, uma ou mais sequências nucleotídicas regulatórias podem incluir, mas não são limitadas a, sequências promotoras, sequências líderes ou sinais, sítios de ligação ribossômicos, sequências de início e terminação transcricional, sequências de início e terminação de tradução, e sequências realçadoras ou ativadoras. Promotores constitutivos ou induzíveis conhecidos na técnica são

considerados pela invenção. Os promotores podem ser promotores que ocorrem naturalmente, ou promotores híbridos que combinam elementos de mais do que um promotor. Um constructo de expressão pode estar presente em uma célula em um epissoma, tal como um plasmídeo, ou o constructo de expressão pode ser inserido em um cromossomo. Em uma modalidade preferida, o vetor de expressão contém um gene marcador selecionável para permitir a seleção de células hospedeiras transformadas. Genes marcadores selecionáveis são bem conhecidos na técnica e variarão com a célula hospedeira usada.

Em certos aspectos da invenção, o ácido nucléico objeto é fornecido em um vetor de expressão compreendendo uma sequência nucleotídica que codifica um polipeptídeo de ActRIIB e operavelmente ligada a pelo menos uma sequência regulatória. As sequências regulatórias são reconhecidas na técnica e são selecionadas para direcionar a expressão do polipeptídeo de ActRIIB. Consequentemente, o termo sequência regulatória inclui promotores, realçadores, e outros elementos de controle de expressão. Sequências regulatórias exemplares são descritas em Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por exemplo, qualquer uma de uma ampla variedade de sequências de controle de expressão que controla a expressão de uma sequência de DNA quando operativamente ligada a ela pode ser usada nestes vetores para expressar sequências de DNA que codificam um polipeptídeo de ActRIIB. Tais sequências de controle de expressão úteis, incluem, por exemplo, os primeiros e últimos promotores de SV 40, promotor tet, promotor precoce imediato do adenovírus ou citomegalovírus, promotores RSV, o sistema lac, o sistema trp, o sistema TAC ou TRC, promotor T7, cuja expressão é dirigida por T7 RNA polimerase, o operador principal e regiões promotoras de fago lambda, as regiões controle para a proteína de cobertura fd, o promotor para 3-fosfoglicerato cinase ou outras enzimas glicolíticas, os promotores de fosfatase de ácido, por exemplo, Pho5, os promotores da fatores do tipo "mating" α de levedura, o promotor poliedro do sistema do baculovírus e outras sequências conhecidas para controlar a expressão de genes de células procarióticas ou eucarióticas ou seus vírus, e várias combinações das mesmas. Deve ser entendido que o projeto do vetor de expressão pode depender de tais fatores como a escolha da célula hospedeira a ser transformada e/ou o tipo de proteína desejada a ser expressada. Além disso, o número de cópias do vetor, a capacidade de controlar o número de cópias e a expressão de qualquer outra proteína codificada pelo vetor, tal como marcadores de antibióticos, também devem ser considerados.

Um ácido nucléico recombinante da invenção pode ser produzido ligando-se o gene clonado, ou uma porção do mesmo, em um vetor adequado para a expressão em células procarióticas, célula eucarióticas (levedura, aves, insetos ou mamíferos), ou ambas. Veículos de expressão para a produção de um polipeptídeo de ActRIIB recombinante

incluem plasmídeos e outros vetores. Por exemplo, vetores adequados incluem plasmídeos dos tipos: plasmídeos derivados de pBR322, plasmídeos derivados de pEMBL, plasmídeos derivados de pEX, plasmídeos derivados de pBTac e plasmídeos derivados de pUC para a expressão em células procarióticas, tais como *E. coli*.

5 Alguns vetores de expressão em mamíferos contêm sequências procarióticas para facilitar a propagação do vetor nas bactérias, e uma ou mais unidades de transcrição eucarióticas que são expressadas em células eucarióticas. Os vetores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo e pHyg são exemplos de vetores de expressão em mamíferos, adequados para transfecção de células eucarióticas. Alguns destes vetores são modificados com sequências a partir de plasmídeos bacterianos, tais como pBR322, para facilitar a replicação e seleção de resistência ao fármaco tanto em células procarióticas quanto eucarióticas. Alternativamente, derivados de vírus, tais como o vírus do papiloma bovino (BPV-I), ou vírus Epstein-Barr (pHEBo, derivada de pREP e p205) podem ser usados para expressão transitória de proteínas em células eucarióticas. Exemplos de outros sistemas de expressão viral (incluindo retroviral) podem ser encontrados abaixo na descrição de sistemas de liberação de terapia genética. Os vários métodos utilizados na preparação dos plasmídeos e na transformação de organismos hospedeiros são bem conhecidos na técnica. Para outros sistemas de expressão adequados para células procarióticas e eucarióticas, assim como procedimentos recombinantes gerais, veja *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2ª Ed., ed. por Sambrook, Fritsch e Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) Capítulos 16 e 17. Em alguns exemplos, pode ser desejável expressar os polipeptídeos recombinantes através do uso de um sistema de expressão de baculovírus. Exemplos de tais sistemas de expressão de baculovírus incluem vetores derivados de pVL (tais como pVL1392, pVL1393 e pVL941), vetores derivados de pAcUW (tais como pAcUWI), e vetores derivados de pBlueBac (tais como o β -gal contendo pBlueBac III).

Em uma modalidade preferida, um vetor será designado para a produção dos polipeptídeos de ActRIIB objeto em células de CHO, tais como um vetor Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif), vetores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) e vetores pCI-neo (Promega, Madison, Wise). Como será evidente, os constructos genéticos objeto podem ser usados para causar a expressão dos polipeptídeos de ActRIIB objeto em células propagadas em cultura, por exemplo, para produzir proteínas, incluindo proteínas de fusão ou proteínas variantes, para purificação.

Esta invenção também refere-se a uma célula hospedeira transfectada com um gene recombinante incluindo uma sequência de codificação (por exemplo, SEQ ID NO: 4) para um ou mais polipeptídeos de ActRIIB objeto. A célula hospedeira pode ser qualquer célula procariótica ou eucariótica. Por exemplo, um polipeptídeo de ActRIIB da invenção

pode ser expressado em células bacterianas, tais como *E. coli*, células de inseto (por exemplo, usando um sistema de expressão de baculovírus), levedura, ou células de mamíferos. Outras células hospedeiras adequadas são conhecidas àqueles habilitados na técnica.

5 Consequentemente, a presente invenção refere-se ainda a métodos de produzir os polipeptídeos de ActRIIB objeto. Por exemplo, uma célula hospedeira transfectada com um vetor de expressão que codifica um polipeptídeo de ActRIIB pode ser cultivada sob condições apropriadas para permitir que a expressão do polipeptídeo de ActRIIB ocorra. O polipeptídeo de ActRIIB pode ser secretado e isolado de uma mistura de células e meio
10 contendo o polipeptídeo de ActRIIB. Alternativamente, o polipeptídeo de ActRIIB pode ser retido citoplasmicamente ou em uma fração de membrana e as células colhidas, lisadas e a proteína isolada. Uma cultura celular inclui células hospedeiras, meios e outros subprodutos. Meios adequados para a cultura celular são bem conhecidos na técnica. Os polipeptídeos de ActRIIB objeto podem ser isolados do meio de cultura celular, células hospedeiras, ou
15 ambos, usando técnicas conhecidas no ramo para purificar proteínas, incluindo cromatografia de troca iônica, cromatografia de filtração em gel, ultrafiltração, eletroforese, e purificação por imunoafinidade com anticorpos específicos para epítopos particulares dos polipeptídeos de ActRIIB. Em uma modalidade preferida, o polipeptídeo de ActRIIB é uma proteína de fusão contendo um domínio que facilita sua purificação.

20 Em uma outra modalidade, uma codificação do gene de fusão para uma sequência líder de purificação, tal como uma sequência do sítio de clivagem de poli-(His)/enterocinase no N-terminal da porção desejada do polipeptídeo de ActRIIB recombinante, pode permitir a purificação da proteína de fusão expressada por cromatografia de afinidade usando uma resina de metal Ni^{2+} . A sequência líder de purificação depois pode ser subsequentemente
25 removida por tratamento com enterocinase para fornecer o polipeptídeo de ActRIIB purificado (por exemplo, veja Hochuli *et al.*, (1987) *J. Chromatography* 411:177; e Janknecht *et al.*, *PNAS USA* 88:8972).

 Técnicas para fabricar genes de fusão são bem conhecidas. Essencialmente, a junção de vários fragmentos de DNA codificando sequências polipeptídicas diferentes é
30 realizada de acordo com técnicas convencionais, utilizando terminais com extremidades cegas ou extremidades alternadas para ligação, digestão com enzima de restrição para fornecer terminais apropriados, substituição de extremidades coesivas, conforme apropriado, tratamento com fosfatase alcalina para evitar junções indesejáveis, e ligação enzimática. Em uma outra modalidade, o gene de fusão pode ser sintetizado por técnicas
35 convencionais incluindo sintetizadores de DNA automáticos. Alternativamente, a amplificação por PCR de fragmentos de gene pode ser realizada usando iniciadores (âncora) que dão origem a ressaltos complementares entre dois fragmentos de gene

consecutivos que podem subsequentemente ser anelados para gerar uma sequência gênica quimérica (veja, por exemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons: 1992).

4. Anticorpos

- 5 Um outro aspecto da invenção refere-se a anticorpos. Um anticorpo que é especificamente reativo com um polipeptídeo de ActRIIB (por exemplo, um polipeptídeo de ActRIIB solúvel) e que se liga competitivamente ao polipeptídeo de ActRIIB pode ser usado como um antagonista das atividades do polipeptídeo de ActRIIB. Por exemplo, usando-se imunogenes derivados de um polipeptídeo de ActRIIB, os antissoros anti-proteína/anti-peptídeo ou anticorpos monoclonais podem ser preparados por protocolos padrão (veja, por exemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. por Harlow e Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Um mamífero, tal como um camundongo, um hamster ou coelho pode ser imunizado com uma forma imunogênica do polipeptídeo de ActRIIB, um fragmento antigênico que é capaz de eliciar uma resposta do anticorpo, ou uma proteína de fusão.
- 10 Técnicas para conferir imunogenicidade em uma proteína ou peptídeo incluem conjugação aos portadores ou outras técnicas bem conhecidas no ramo. Uma porção imunogênica de um polipeptídeo de ActRIIB pode ser administrada na presença de adjuvante. O progresso da imunização pode ser monitorado por detecção de titulações de anticorpos no plasma ou soro. ELISA padrão ou outros imunoensaios podem ser usados com o imunogene como
- 15 antígeno para avaliar os níveis de anticorpos.

- 20 Após a imunização de um animal com uma preparação antigênica de um polipeptídeo de ActRIIB, antissoros podem ser obtidos e, se desejado, anticorpos policlonais podem ser isolados do soro. Para produzir anticorpos monoclonais, células produtoras de anticorpos (linfócitos) podem ser colhidas de um animal imunizado e fundidas por
- 25 procedimentos de fusão celular somática padrão com imortalização de células, tais como células de mieloma para produzir células de hibridoma. Tais técnicas são bem conhecidas no ramo, e incluem, por exemplo, a técnica de hibridoma (originalmente desenvolvida por Kohler e Milstein, (1975) *Nature*, 256: 495-497), a técnica de hibridoma de célula B humana (Kozbar *et al.*, (1983) *Immunology Today*, 4: 72), e a técnica hibridoma de EBV para produzir
- 30 anticorpos monoclonais humanos (Cole *et al.*, (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. páginas 77-96). Células de hibridoma podem ser triadas imunoquimicamente para produção de anticorpos especificamente reativos com um polipeptídeo de ActRIIB e anticorpos monoclonais isolados de uma cultura compreendendo tais células de hibridoma.

- 35 O termo "anticorpo", conforme usado neste relatório, inclui fragmentos do mesmo, os quais também são especificamente reativos com um polipeptídeo de ActRIIB objeto. Anticorpos podem ser fragmentados usando técnicas convencionais e os fragmentos triados

quanto à utilidade, da mesma maneira descrita acima para anticorpos totais. Por exemplo, fragmentos $F(ab)_2$ podem ser gerados tratando-se o anticorpo com pepsina. O fragmento $F(ab)_2$ resultante pode ser tratado para reduzir pontes dissulfeto e para produzir fragmentos Fab. O anticorpo da presente invenção inclui ainda moléculas biespecíficas, de cadeia
5 única, e quiméricas e humanizadas tendo afinidade para um polipeptídeo de ActRIIB conferida em pelo menos uma região CDR do anticorpo. Em modalidades preferidas, o anticorpo compreende ainda uma marcação ligada a este, e capaz de ser detectado (por exemplo, a marcação pode ser um radioisótopo, composto fluorescente, enzima ou co-fator de enzima).

10 Em certas modalidades preferidas, um anticorpo da invenção é um anticorpo monoclonal, e em certas modalidades, a invenção disponibiliza métodos para gerar novos anticorpos. Por exemplo, um método para gerar um anticorpo monoclonal que se liga especificamente a um polipeptídeo de ActRIIB pode compreender administrar a um camundongo uma quantidade de uma composição imunogênica compreendendo o
15 polipeptídeo de ActRIIB eficaz para estimular uma resposta imune detectável, obtendo células produtoras de anticorpos (por exemplo, células do baço) provenientes de camundongo e fundindo as células produtoras de anticorpos com células de mieloma para obter hibridomas produtores de anticorpos, e testar os hibridomas produtores de anticorpos quanto à identificação de um hibridoma que produz um anticorpo monoclonal que se liga
20 especificamente ao polipeptídeo de ActRIIB. Uma vez obtido, um hibridoma pode ser propagado em uma cultura celular, opcionalmente em condições de cultura onde as células derivadas de hibridoma produzem o anticorpo monoclonal que se liga especificamente ao polipeptídeo de ActRIIB. O anticorpo monoclonal pode ser purificado a partir da cultura celular.

25 O adjetivo “especificamente reativo com”, conforme usado em referência a um anticorpo, significa, como é geralmente entendido na técnica, que o anticorpo é suficientemente seletivo entre o antígeno de interesse (por exemplo, um polipeptídeo de ActRIIB) e outros antígenos que não são de interesse, que o anticorpo é útil para detectar a presença do antígeno de interesse em um tipo particular de amostra biológica. Em certos
30 métodos que utilizam o anticorpo, tais como aplicações terapêuticas, um grau mais alto de especificidade na ligação pode ser desejável. Anticorpos monoclonais geralmente têm uma maior tendência (em comparação a anticorpos policlonais) a discriminar eficazmente entre os antígenos e polipeptídeos de reação cruzada desejados. Uma característica que influencia a especificidade de uma interação anticorpo:antígeno é a afinidade do anticorpo
35 para o antígeno. Embora a especificidade desejada possa ser atingida com uma faixa de afinidades diferentes, geralmente anticorpos preferidos terão uma afinidade (uma constante de dissociação) de cerca de 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} ou menos.

Além disso, as técnicas usadas para triar anticorpos, de modo a identificar um anticorpo desejável podem influenciar nas propriedades do anticorpo obtido. Por exemplo, se um anticorpo é usado para ligar um antígeno em solução, pode ser desejável testar a ligação da solução. Uma variedade de técnicas diferentes estão disponíveis para testar a interação entre anticorpos e antígenos para identificar particularmente anticorpos desejáveis. Tais técnicas incluem ELISAs, ensaios de ligação por ressonância superficial com plásmon (por exemplo, o ensaio de ligação Biacore, Bia-core AB, Uppsala, Suécia), ensaios em sanduíche (por exemplo, o sistema de pérola paramagnética da IGEN International, Inc., Gaithersburg, Mariland), western blots, ensaios de imunoprecipitação, e imunohistoquímica.

Em certos aspectos, a divulgação fornece anticorpos que se ligam a um polipeptídeo de ActRIIB solúvel. Tais anticorpos podem ser gerados, conforme descrito acima, usando um polipeptídeo de ActRIIB solúvel ou fragmento do mesmo como um antígeno. Anticorpos deste tipo podem ser usados, por exemplo, para detectar polipeptídeos de ActRIIB em amostras biológicas e/ou para monitorar os níveis de polipeptídeo de ActRIIB solúvel em um indivíduo. Em certos casos, um anticorpo que se liga especificamente a um polipeptídeo de ActRIIB solúvel pode ser usado para modular a atividade de um polipeptídeo de ActRIIB e/ou um ligante de ActRIIB, desse modo regulando (promovendo ou inibindo) o crescimento de tecidos, tais como ossos, cartilagens, músculos, gorduras, e neurônios.

5. Ensaios de Triagem

Em certos aspectos, a presente invenção refere-se ao uso dos polipeptídeos de ActRIIB objeto (por exemplo, polipeptídeos de ActRIIB solúveis) para identificar compostos (agentes) que são agonistas ou antagonistas dos polipeptídeos de ActRIIB. Compostos identificados através desta triagem podem ser testados em tecidos, tais como ossos, cartilagens, músculos, gorduras, e/ou neurônios, para avaliar sua capacidade de modular o crescimento tecidual *in vitro*. Opcionalmente, estes compostos podem ainda ser testados em modelos animais para avaliar sua capacidade de modular o crescimento tecidual *in vivo*.

Existem numerosos métodos para triar agentes terapêuticos e modular o crescimento tecidual alvejando-se os polipeptídeos de ActRIIB. Em certas modalidades, a triagem com alto rendimento de compostos pode ser realizada para identificar agentes que perturbam os efeitos mediados por ActRIIB no crescimento de ossos, cartilagens, músculos, gorduras, e/ou neurônios. Em certas modalidades, o ensaio é realizado para triar e identificar compostos que especificamente inibem ou reduzem a ligação de um polipeptídeo de ActRIIB ao seu par de ligação, tal como um ligante de ActRIIB (por exemplo, activina, Nodal, GDF8, GDF11 ou BMP7). Alternativamente, o ensaio pode ser usado para identificar compostos que realçam a ligação de um polipeptídeo de ActRIIB a sua proteína de ligação, tal como um ligante de ActRIIB. Em uma modalidade adicional, os compostos podem ser

identificados pela sua capacidade de interagir com um polipeptídeo de ActRIIB.

Uma variedade de formatos de ensaio será suficiente e, na luz da presente divulgação, aqueles que não são expressamente descritos neste relatório, não obstante, serão compreendidos por uma pessoa de habilidade comum na técnica. Conforme descrito
5 neste relatório, os compostos de teste (agentes) da invenção podem ser criados por qualquer método químico combinatório. Alternativamente, os compostos objeto podem ser biomoléculas sintetizadas que ocorrem naturalmente *in vivo* ou *in vitro*. Compostos (agentes) testados quanto a sua capacidade de agir como moduladores de crescimento
10 tecidual podem ser produzidos, por exemplo, por bactérias, levedura, plantas ou outros organismos (por exemplo, produtos naturais), produzidos quimicamente (por exemplo, moléculas pequenas, incluindo peptidomiméticos), ou recombinantemente produzidos. Compostos de teste considerados pela presente invenção incluem moléculas orgânicas de não peptídica, peptídeos, polipeptídeos, peptidomiméticos, açúcares, hormônios, e moléculas de ácido nucléico. Em uma modalidade específica, o agente de teste é uma molécula
15 orgânica pequena tendo um peso molecular de menos do que cerca de 2.000 dáltons.

Os compostos de teste da invenção podem ser fornecidos como entidades únicas, distintas, ou fornecidos em bibliotecas de maior complexidade, tais como aquelas preparadas por química combinatória. Estas bibliotecas podem compreender, por exemplo,
20 compostos orgânicos. A apresentação de compostos de teste ao sistema de teste pode ser em uma forma isolada ou como misturas de compostos, especialmente em etapas de triagem iniciais. Opcionalmente, os compostos podem ser opcionalmente derivatizados com outros compostos e ter grupos derivatizantes que facilitam o isolamento dos compostos. Exemplos não limitantes de grupos derivatizantes incluem biotina, fluoresceína,
25 digoxigenina, proteína verde fluorescente, isótopos, poliistidina, pérolas magnéticas, glutathione S-transferase (GST), reticuladores fotoativáveis ou quaisquer combinações dos mesmos.

Em muitos programas de triagem de fármacos que testam bibliotecas de compostos e extratos naturais, os ensaios de rendimento alto são desejáveis de modo a maximizar o
30 número de compostos examinados em um período de tempo fornecido. Ensaios que são realizados em sistemas de célula livre, tal como podem ser derivados com proteínas purificadas ou semipurificadas, são frequentemente preferidos como triagens “primárias” em que eles podem ser gerados para permitir desenvolvimento rápido e detecção relativamente fácil de uma alteração em um alvo molecular que é mediado por um composto de teste.
35 Além disso, os efeitos da toxicidade ou biodisponibilidade celular do composto de teste podem ser geralmente ignorados no sistema *in vitro*, o ensaio ao invés de ser focalizado primariamente no efeito do fármaco no alvo molecular pode ser manifestado em uma

alteração de afinidade de ligação entre um polipeptídeo de ActRIIB e sua proteína de ligação (por exemplo, um ligante de ActRIIB).

Meramente para fins de ilustração, em um ensaio de triagem exemplar da presente invenção, o composto de interesse é contactado com um polipeptídeo de ActRIIB isolado e purificado, o qual é comumente capaz de se ligar a um ligante de ActRIIB, conforme apropriado para a intenção do ensaio. À mistura do composto e polipeptídeo de ActRIIB é depois adicionada uma composição contendo um ligante de ActRIIB. A detecção e quantificação dos complexos de ActRIIB/ligante de ActRIIB fornecem um meio para determinar a eficácia do composto na inibição (ou potenciação) da formação do complexo entre o polipeptídeo de ActRIIB e sua proteína de ligação. A eficácia do composto pode ser avaliada gerando-se as curvas de resposta de dose a partir dos dados obtidos usando várias concentrações do composto de teste. Além disso, um ensaio controle também pode ser realizado para fornecer um valor de referência para comparação. Por exemplo, em um ensaio controle, o ligante de ActRIIB isolado e purificado é adicionado a uma composição contendo o polipeptídeo de ActRIIB, e a formação do complexo ActRIIB/ligante de ActRIIB é quantificada na ausência do composto de teste. No geral, será entendido que a ordem em que os reagentes podem ser misturados pode ser variada, e podem ser misturados simultaneamente. Além disso, no lugar das proteínas purificadas, extratos e lisados celulares podem ser usados para tornar uma sistema de ensaio de célula livre adequado.

A formação do complexo entre o polipeptídeo de ActRIIB e sua proteína de ligação pode ser detectada por uma variedade de técnicas. Por exemplo, a modulação da formação de complexos pode ser quantificada usando, por exemplo, proteínas detectavelmente marcadas, tais como polipeptídeo de ActRIIB marcado radioativamente (por exemplo, ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C ou ^3H), marcado fluorescentemente (por exemplo, FITC), ou marcado enzimaticamente ou sua proteína de ligação, por imunoensaio, ou por detecção cromatográfica.

Em certas modalidades, a presente invenção considera o uso de ensaios de polarização fluorescente e ensaios de transferência de energia por ressonância fluorescente (FRET) direta ou indiretamente nas medições, o grau de interação entre um polipeptídeo de ActRIIB e sua proteína de ligação. Além disso, outros modos de detecção, tais como aqueles com base em guias de ondas ópticas (Publicação PCT WO 96/26432 e Pat. U.S. Nº 5.677.196), ressonância superficial com plásmon (SPR), sensores superficiais de carga, e sensores superficiais de força, são compatíveis com muitas modalidades da invenção.

Além disso, a presente invenção considera o uso de um ensaio de interação “trap”, também conhecido como o “ensaio duplo-híbrido,” para identificar agentes que interrompem ou potencializam a interação entre um polipeptídeo de ActRIIB e sua proteína de ligação. Veja, por exemplo, Pat. U.S. Nº 5.283.317; Zervos *et al.* (1993) *Cell* 72: 223-232; Madura *et*

al. (1993) J Biol Chem 268:12046-12054; Bartel *et al.* (1993) Biotechniques 14:920-924; e Iwabuchi *et al.* (1993) Oncogene 8:1693-1696). Em uma modalidade específica, a presente invenção considera o uso de sistemas de duplo-híbrido reverso para identificar compostos (por exemplo, moléculas pequenas ou peptídeos) que dissociam interações entre um polipeptídeo de ActRIIB e sua proteína de ligação. Veja por exemplo, Vidal e Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29; Vidal e Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81; e Pat. U.S. Nºs 5.525.490; 5.955.280; e 5.965.368.

Em certas modalidades, os compostos objeto são identificados pela sua capacidade de interagir com um polipeptídeo de ActRIIB da invenção. A interação entre o composto e o polipeptídeo de ActRIIB pode ser covalente ou não covalente. Por exemplo, tal interação pode ser identificada no nível da proteína usando métodos bioquímicos *in vitro*, incluindo fotorreticulação, ligação ao ligante marcada radioativamente, e cromatografia de afinidade (Jakoby WB *et al.*, 1974, Methods in Enzymology 46: 1). Em certos casos, os compostos podem ser triados em um ensaio com base no mecanismo, tal como um ensaio para detectar compostos que se ligam a um polipeptídeo de ActRIIB. Isto pode incluir um evento de ligação de fase sólida ou fase fluida. Alternativamente, o gene que codifica um polipeptídeo de ActRIIB pode ser transfectado com um sistema repórter (por exemplo, β -galactosidase, luciferase, ou proteína verde fluorescente) em uma célula e triado contra a biblioteca preferivelmente por uma triagem de rendimento alto ou com membros individuais da biblioteca. Outros ensaios de ligação com base no mecanismo podem ser usados, por exemplo, ensaios de ligação que detectam mudanças na energia livre. Os ensaios de ligação podem ser realizados com o alvo fixado a um poço, pérola ou chip ou capturado por um anticorpo imobilizado ou resolvido por eletroforese capilar. Os compostos ligados podem ser detectados usualmente usando ressonância colorimétrica ou fluorescente ou superficial com plásmom.

Em certos aspectos, a presente invenção fornece métodos e agentes para estimular o crescimento muscular e aumentar a massa muscular, por exemplo, antagonizando-se as funções de um polipeptídeo de ActRIIB e/ou um ligante de ActRIIB. Portanto, qualquer composto identificado pode ser testado em células ou tecidos totais, *in vitro* ou *in vivo*, para confirmar sua capacidade de modular o crescimento muscular. Vários métodos conhecidos na técnica podem ser utilizados para este propósito. Por exemplo, métodos da invenção são realizados, tal que a transdução de sinal através de uma proteína de ActRIIB ativada pela ligação a um ligante de ActRIIB (por exemplo, GDF8) foi reduzida ou inibida. Será reconhecido que o crescimento do tecido muscular no organismo resultaria em uma massa muscular aumentada no organismo em comparação à massa muscular de um organismo correspondente (ou população de organismos) em que a transdução de sinal através de uma proteína de ActRIIB não tivesse sido efetuada.

Por exemplo, os efeitos dos polipeptídeos de ActRIIB ou compostos de teste no crescimento/proliferação da célula muscular podem ser determinados medindo-se a expressão gênica de Pax-3 e Myf-5 que está associada à proliferação de células miogênicas, e expressão gênica de MyoD que está associada à diferenciação muscular (por exemplo, Amthor *et al.*, Dev Biol. 2002, 251: 241-57). É conhecido que GDF8 inibe a expressão gênica de Pax-3 e Myf-5, e previne a expressão gênica de MyoD. Espera-se que os polipeptídeos de ActRIIB ou compostos de teste antagonizem esta atividade de GDF8. Um outro exemplo de ensaios de base celular inclui medir a proliferação de mioblastos, tais como mioblastos C(2)C(12) na presença dos polipeptídeos de ActRIIB ou compostos de teste (por exemplo, Thomas *et al.*, J Biol Chem. 2000, 275: 40235-43).

A presente invenção também considera ensaios *in vivo* para medir a massa e força musculares. Por exemplo, Whitemore *et al.* (Biochem Biophys Res Commun. 2003, 300:965-71) divulga um método de medir a massa muscular esquelética aumentada e força e preensão aumentadas em camundongos. Opcionalmente, este método pode ser usado para determinar os efeitos terapêuticos de compostos de teste (por exemplo, polipeptídeos de ActRIIB) em doenças ou condições musculares, por exemplo, aquelas doenças em que a massa muscular é limitada.

Em certos aspectos, a presente invenção fornece métodos e agentes para modular (estimular ou inibir) a formação óssea e aumentar a massa óssea. Portanto, qualquer composto identificado pode ser testado em células ou tecidos totais, *in vitro* ou *in vivo*, para confirmar sua capacidade de modular o crescimento de ossos ou cartilagens. Vários métodos conhecidos na técnica podem ser utilizados para este propósito.

Por exemplo, o efeito dos polipeptídeos de ActRIIB ou compostos de teste sobre o crescimento de ossos ou cartilagens pode ser determinado medindo-se a indução de Msx2 ou a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos em ensaios com base celular (veja, por exemplo, Daluiski *et al.*, Nat Genet. 2001, 27(1):84-8; Hino *et al.*, Front Biosci. 2004, 9:1520-9). Um outro exemplo de ensaios de base celular inclui analisar a atividade osteogênica dos polipeptídeos de ActRIIB e compostos de teste objeto no progenitor mesenquimal e células osteoblásticas. Para fins de ilustração, adenovírus recombinantes expressando um polipeptídeo de ActRIIB foram construídos para infectar células C3H10T1/2 progenitoras mesenquimais pluripotentes, células C2C12 pré-osteoblásticas, e células TE-85 osteoblásticas. A atividade osteogênica depois é determinada medindo-se a indução de fosfatase alcalina, osteocalcina, e mineralização da matriz (veja, por exemplo, Cheng *et al.*, J Bone Joint Surg Am. 2003, 85-A(8): 1544-52).

A presente invenção também considera ensaios *in vivo* para medir o crescimento de ossos ou cartilagens. Por exemplo, Namkung-Matthai *et al.*, Bone, 28:80-86 (2001) divulga um modelo osteoporótico de rato em que o reparo do osso durante o período

precoce depois da fratura é estudado. Kubo *et al.*, Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 68:197-202 (1999) também divulga um modelo osteoporótico de rato em que o reparo do osso durante o período tardio depois da fratura é estudado. Estas referências são integralmente incorporadas como referência neste relatório para sua divulgação de modelo de rato para estudo em fratura óssea osteoporótica. Em certos aspectos, a presente invenção faz uso de ensaios de restabelecimento de fratura que são conhecidos na técnica. Estes ensaios incluem técnica de fratura, análise histológica, e análise biomecânica, as quais são descritas, por exemplo, na Pat. U.S. Nº 6.521.750, que é incorporada integralmente como referência para sua divulgação de protocolos experimentais para causar, assim como medir, a extensão de fraturas, e o processo de reparo.

Em certos aspectos, a presente invenção fornece métodos e agentes para controlar ganho de peso e obesidade. No nível celular, a proliferação e diferenciação de adipócito são críticas no desenvolvimento da obesidade, que leva à geração de células de gordura adicionais (adipócitos). Portanto, qualquer composto identificado pode ser testado em células ou tecidos totais, *in vitro* ou *in vivo*, para confirmar sua capacidade de modular a adipogênese medindo-se a proliferação ou diferenciação de adipócito. Vários métodos conhecidos na técnica podem ser utilizados para este propósito. Por exemplo, o efeito de um polipeptídeo de ActRIIB (por exemplo, um polipeptídeo de ActRIIB solúvel) ou compostos de teste sobre a adipogênese pode ser determinado medindo-se a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 para amadurecer adipócitos em ensaios com base celular, tal como, observando-se o acúmulo de triacilglicerol em vesículas marcadas com Oil Red O e pela aparência de certos marcadores de adipócito, tais como FABP (aP2/422) e PPAR γ 2. Veja, por exemplo, Reusch *et al.*, 2000, Mol Cell Biol. 20:1008-20; Deng *et al.*, 2000, Endocrinology. 141: 2370-6; Bell *et al.*, 2000, Obes Res. 8: 249-54. Um outro exemplo de ensaios de base celular inclui analisar o papel de polipeptídeos de ActRIIB e compostos de teste na proliferação de adipócitos ou células precursoras de adipócito (por exemplo, células 3T3-L1), tal como, monitorando-se células bromodeoxiuridina (BrdU) positivas. Veja, por exemplo, Pico *et al.*, 1998, Mol Cell Biochem. 189:1-7; Masuno *et al.*, 2003, Toxicol Sci. 75:314-20.

É entendido que os ensaios de triagem da presente invenção aplicam-se não apenas aos polipeptídeos de ActRIIB e variantes dos polipeptídeos de ActRIIB objeto, mas também a quaisquer compostos de teste incluindo agonistas e antagonista dos polipeptídeos de ActRIIB. Além disso, estes ensaios de triagem são úteis para verificação alvo de fármacos e propósitos de controle de qualidade.

6. Usos Terapêuticos Exemplares

Em certas modalidades, composições (por exemplo, polipeptídeos de ActRIIB) da presente invenção podem ser usadas para tratar ou prevenir uma doença ou condição que

está associada à atividade anormal de um polipeptídeo de ActRIIB e/ou um ligante de ActRIIB (por exemplo, GDF8). Estas doenças, distúrbios ou condições são geralmente referidos neste relatório como “condições associadas a ActRIIB”. Em certas modalidades, a presente invenção fornece métodos de tratar ou prevenir um indivíduo em necessidade dos

5 mesmos, administrando-se ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipeptídeo de ActRIIB conforme descrito acima. Estes métodos são particularmente visados para tratamentos terapêuticos e profiláticos de animais, e mais particularmente, seres humanos.

Conforme usado neste relatório, um produto terapêutico que “previne” um distúrbio

10 ou condição refere-se a um composto que, em uma amostra estatística, reduz a ocorrência do distúrbio ou condição na amostra tratada em relação a uma amostra controle não tratada, ou atrasa o início ou reduz a severidade de um ou mais sintomas do distúrbio ou condição em relação à amostra controle não tratada. O termo “tratamento”, conforme usado neste relatório, inclui profilaxia da condição ou melhora ou eliminação da condição uma vez que

15 esta foi estabelecida.

Os complexos de ActRIIB/ligante de ActRIIB desempenham papéis essenciais no crescimento tecidual, assim como processos de desenvolvimento precoces, tais como a formação correta de várias estruturas ou em uma ou mais capacidades pós-desenvolvimento incluindo desenvolvimento sexual, produção hormonal hipofisária, e

20 criação de ossos e cartilagens. Assim, as condições associadas a ActRIIB incluem crescimento tecidual anormal e defeitos de desenvolvimento. Além disso, as condições associadas a ActRIIB incluem, mas não são limitadas a, distúrbios de crescimento e diferenciação celular, tais como inflamação, alergia, doenças autoimunes, doenças infecciosas, e tumores.

As condições associadas a ActRIIB exemplares incluem distúrbios neuromusculares (por exemplo, distrofia muscular e atrofia muscular), doença pulmonar obstrutiva congestiva (e perda muscular associada a COPD), síndrome de perda muscular, sarcopenia, caquexia, distúrbios do tecido adiposo (por exemplo, obesidade), diabetes tipo 2, e doença óssea degenerativa (por exemplo, osteoporose). Outras condições associadas a

30 ActRIIB exemplares incluem distúrbios musculodegenerativos e neuromusculares, reparo tecidual (por exemplo, cura do ferimento), doenças neurodegenerativas (por exemplo, esclerose lateral amiotrófica), distúrbios imunológicos (por exemplo, distúrbios relacionados à proliferação ou função anormal de linfócitos), e obesidade ou distúrbios relacionados à proliferação anormal de adipócitos.

Em certas modalidades, composições (por exemplo, polipeptídeos de ActRIIB solúveis) da invenção são usadas como parte de um tratamento para uma distrofia muscular. O termo “distrofia muscular” refere-se a um grupo de doenças musculares

degenerativas caracterizadas por enfraquecimento e deterioração gradual de músculos esqueléticos e algumas vezes os músculos cardíacos e respiratórios. As distrofias musculares são distúrbios genéticos caracterizados por perda muscular e fraqueza progressiva que iniciam com mudanças microscópicas no músculo. Conforme os músculos se degeneram com o passar do tempo, há um declínio na força muscular da pessoa. Distrofias musculares exemplares que podem ser tratadas com um regime incluindo os polipeptídeos de ActRIIB objeto incluem: Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), Distrofia Muscular de Becker (BMD), Distrofia Muscular de Emery-Dreifuss (EDMD), Distrofia Muscular de Limb-Girdle (LGMD), Distrofia Muscular Facioscapulohumeral (FSH ou FSHD) (também conhecida como Landouzy-Dejerine), Distrofia Miotônica (MMD) (também conhecida como Doença de Steinert), Distrofia Muscular Oculofaríngea (OPMD), Distrofia Muscular Distal (DD), Distrofia Muscular Congênita (CMD).

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) foi primeiro descrita pelo neurologista Francês Guillaume Benjamin Amand Duchenne em 1860. A Distrofia Muscular de Becker (BMD) é nomeada depois pelo médico Alemão Peter Emil Becker, quem primeiro descreveu esta variante de DMD em 1950. DMD é uma das doenças hereditárias mais frequentes em machos, afetando um em 3.500 meninos. DMD ocorre quando o gene da distrofina, localizado no braço curto do cromossomo X, é quebrado. Visto que machos apenas portam uma cópia do cromossomo X, eles têm apenas uma cópia do gene da distrofina. Sem a proteína distrofina, o músculo é facilmente danificado durante ciclos de contração e relaxação. Embora previamente o músculo doente seja compensado por regeneração, mais tarde as células progenitoras musculares não podem se manter com o avanço do dano e o músculo saudável é substituído por tecido fibro-adiposo não funcional.

BMD resulta a partir de mutações diferentes no gene da distrofina. Pacientes com BMD têm alguma distrofina, porém ela é insuficiente em quantidade ou deficiente em qualidade. A pouca quantidade de distrofina protege os músculos dos processos de degeneração daqueles com BMD deficiente ou rapidamente, assim como aqueles de pessoas com DMD.

Por exemplo, pesquisas recentes demonstram que bloquear ou eliminar a função de GDF8 (um ligante de ActRIIB) *in vivo* pode eficazmente tratar pelo menos certos sintomas em pacientes com DMD e BMD. Assim, os polipeptídeos de ActRIIB objeto podem agir como inibidores de GDF8 (antagonistas), e constituem um meio alternativo de bloquear as funções de GDF8 e/ou ActRIIB *in vivo* em pacientes com DMD e BMD. Este método é confirmado e sustentado pelos dados mostrados neste relatório, por meio do qual uma proteína de ActRIIB-Fc mostrou aumentar a massa muscular em um modelo de camundongo de distrofia muscular.

Similarmente, os polipeptídeos de ActRIIB objeto fornecem um meio eficaz para

aumentar massa muscular em outras condições da doença que estão em necessidade de crescimento muscular. Por exemplo, ALS, também chamada doença de Lou Gehrig (doença do neurônio motor) é um distúrbio do SNC crônico, incurável, e irreversível que ataca os neurônios motores, componentes do SNC que conectam o cérebro aos músculos esqueléticos. Em ALS, os neurônios motores deterioram e conseqüentemente morrem, e ainda que um cérebro de uma pessoa normalmente permaneça funcionando completamente e ativo, o comando para o movimento nunca atinge os músculos. A maioria das pessoas que possuem ALS está entre 40 e 70 anos de idade. Os primeiros neurônios motores que enfraquecem são aqueles que conduzem os braços ou pernas. Aqueles com ALS podem ter locomoção dificultada, eles podem deixar cair objetos, levar tombos, pronunciar as palavras com dificuldade, e rir ou chorar incontrolavelmente. Conseqüentemente, os músculos nos membros começam a atrofiar por causa do desuso. Esta fraqueza muscular tornar-se-á debilitante e uma pessoa necessitará de uma cadeira de rodas ou se tornará incapaz de agir fora do leito. A maioria dos pacientes com ALS morre de insuficiência respiratória ou de complicações de assistência ventilatória semelhantes à pneumonia, 3 a 5 anos a partir do início da doença. Este método é confirmado e sustentado pelos dados mostrados neste relatório, por meio do qual uma proteína de ActRIIB-Fc mostrou melhorar a aparência, massa muscular e expectativa de vida de um modelo de camundongo de ALS.

A massa muscular aumentada induzida por polipeptídeo de ActRIIB também pode beneficiar aqueles sofrendo de doenças de perda muscular. Gonzalez-Cadavid *et al.* (*supra*) relatou que a expressão de GDF8 se correlaciona inversamente com a massa livre de gordura em seres humanos e que a expressão aumentada do gene GDF8 está associada à perda de peso em homens com síndrome consuntiva da AIDS. Inibindo-se a função de GDF8 em pacientes com AIDS, pelo menos certos sintomas de AIDS podem ser aliviados, se não completamente eliminados, assim melhorando significativamente a qualidade de vida em pacientes com AIDS.

Visto que a perda da função de GDF8 (um ligante de ActRIIB) também está associada à perda de gordura sem diminuição da ingestão de nutrientes (Zimmers *et al.*, *supra*; McPherron e Lee, *supra*), os polipeptídeos de ActRIIB objeto podem ser ainda usados como um agente terapêutico para reduzir ou prevenir o desenvolvimento de obesidade e diabetes tipo II. Este método é confirmado e sustentado pelos dados mostrados neste relatório, por meio do qual uma proteína de ActRIIB-Fc mostrou melhorar o estado metabólico em camundongos obesos.

A síndrome da anorexia-caquexia do câncer está entre os aspectos mais debilitantes e ameaçadores de vida do câncer. A perda de peso progressiva na síndrome de anorexia-caquexia do câncer é uma característica comum de muitos tipos de câncer e é responsável não apenas por uma qualidade de vida deficiente e resposta deficiente à

quimioterapia, mas também um tempo de sobrevivência mais curto do que aquele encontrado em pacientes com tumores comparáveis sem perda de peso. Associada à anorexia, danificação do tecido adiposo e muscular, aflição psicológica, e uma qualidade de vida inferior, a caquexia surge de uma interação complexa entre o câncer e o hospedeiro. É uma das causas mais comuns de morte entre pacientes com câncer e está presente em 80 % dos óbitos. É um exemplo complexo do metabolismo de carboidrato, e gordura, e proteína efetuando desordem metabólica. Tumores produzem anormalidades diretas e indiretas, resultando em anorexia e perda de peso. Correntemente, não há tratamento para controlar ou reverter o processo. A síndrome da anorexia-caquexia do câncer afeta a produção de citocina, a liberação de fatores indutores de proteólise e mobilizadores de lipídeo, e as alterações no metabolismo intermediário. Embora a anorexia seja comum, uma entrada de alimento diminuída sozinha é incapaz de ser responsável pelas mudanças na composição corporal observada em pacientes com câncer, e o aumento de ingestão de nutrientes é incapaz de reverter a síndrome consuntiva. A caquexia deve ser suspeitada em pacientes com câncer se uma perda involuntária de peso de mais do que cinco por cento do peso pré-mórbido ocorrer dentro de um período de seis meses.

Visto que a superexpressão sistêmica de GDF8 em camundongos adultos induz a perda de gordura e muscular profunda análoga àquela observada em síndromes de caquexia humana (Zimmers *et al.*, *supra*), os polipeptídeos de ActRIIB objeto como composições farmacêuticas podem ser benéficamente usados para prevenir, tratar, ou aliviar os sintomas da síndrome de caquexia, onde o crescimento muscular é desejado.

Em outras modalidades, a presente invenção fornece métodos de induzir a formação de ossos e/ou cartilagens, prevenir a perda óssea, aumentar a mineralização do osso ou prevenir a desmineralização do osso. Por exemplo, os polipeptídeos de ActRIIB e compostos objeto identificados na presente invenção têm aplicação no tratamento de osteoporose e a cura de fraturas ósseas e defeitos de cartilagens em seres humanos e outros animais. Os polipeptídeos de ActRIIB podem ser úteis em pacientes que são diagnosticados com baixa densidade óssea subclínica, como uma medida protetiva contra o desenvolvimento de osteoporose.

Em uma modalidade específica, métodos e composições da presente invenção podem encontrar utilidade médica na cura de fraturas ósseas e defeitos de cartilagens em seres humanos e outros animais. Os métodos e composições objeto também podem ter uso profilático na redução de fraturas internas e expostas e também na fixação melhorada de juntas artificiais. *De novo*, a formação óssea induzida por um agente osteogênico contribui para o reparo de defeitos craniofaciais congênitos, induzidos por trauma, ou induzidos por ressecção oncológica, e também é útil em cirurgia plástica cosmética. Além disso, métodos e composições da invenção podem ser usados no tratamento de doença periodontal, e em

outros processos de reparo dental. Em certos casos, os polipeptídeos de ActRIIB objeto podem fornecer um ambiente para atrair células de formação óssea, estimulam o crescimento de células de formação óssea ou induzem a diferenciação de progenitores de células de formação óssea. Polipeptídeos de ActRIIB da invenção também podem ser úteis

5 no tratamento de osteoporose. Além disso, os polipeptídeos de ActRIIB podem ser usados no reparo de defeitos de cartilagens e prevenção/reversão de osteoartrite.

Em uma outra modalidade específica, a invenção fornece um método e composição terapêutica para reparar fraturas e outras condições relacionadas aos defeitos de cartilagens e/ou ossos ou doenças periodontais. A invenção fornece ainda métodos e composições

10 terapêuticas para a cura do ferimento e reparo tecidual. Os tipos de ferimentos incluem, mas não são limitados a, queimaduras, incisões e úlceras. Veja por exemplo, Publicação PCT Nº WO84/01106. Tais composições compreendem uma quantidade terapeuticamente eficaz de pelo menos um dos polipeptídeos de ActRIIB da invenção em mistura com um veículo, portador ou matriz farmaceuticamente aceitável.

15 Em uma outra modalidade específica, métodos e composições da invenção podem ser aplicados a condições que causam perda óssea, tais como osteoporose, hiperparatireoidismo, doença de Cushing, hipertireoidismo, estado de diarréia crônica ou malabsorção, acidose tubular renal, ou anorexia nervosa. Muitas pessoas sabem que indivíduos do sexo feminino, tendo um peso corporal baixo, e levando um estilo de vida

20 sedentário apresentam fatores de risco para osteoporose (perda de densidade mineral óssea, levando ao risco de fratura). Entretanto, a osteoporose também pode resultar do uso a longo prazo de certas medicações. A osteoporose que resulta de medicamentos ou uma outra condição médica é conhecida como osteoporose secundária. Em uma condição conhecida como doença de Cushing, a quantidade em excesso de cortisol produzida pelo

25 organismo resulta em osteoporose e fraturas. As medicações mais comuns associadas à osteoporose secundária são os corticosteróides, uma classe de medicamentos que age de forma semelhante ao cortisol, um hormônio produzido naturalmente pelas glândulas adrenais. Embora níveis adequados de hormônios da tireóide (que são produzidos pela glândula tireóide) sejam necessários para o desenvolvimento do esqueleto, o hormônio da

30 tireóide em excesso pode diminuir a massa óssea com o passar do tempo. Antiácidos que contêm alumínio podem levar à perda óssea quando tomados em doses altas por pessoas com problemas renais, particularmente aqueles que passam por diálise. Outras medicações que podem causar osteoporose secundária incluem fenitoína (Dilantin) e barbituratos que são usados para prevenir convulsões; metotrexato (Rheumatrex, Immunex, Folex PFS), um

35 medicamento para algumas formas de artrite, câncer, e distúrbios imunes; ciclosporina (Sandimmune, Neoral), um medicamento usado para tratar algumas doenças autoimunes e para suprimir o sistema imune em pacientes com transplante de órgãos; agonistas do

hormônio liberador de hormônio luteinizante (Lupron, Zoladex), usados para tratar câncer de próstata e endometriose; heparina (Calciparine, Liquaemin), uma medicação anticoagulante; e colestiramina (Questran) e colestipol (Colestid), usado para tratar colesterol alto. A doença da goma causa perda óssea, pois estas bactérias nocivas na boca forçam o organismo a se defender contra elas. As bactérias produzem toxinas e enzimas sob a linha de gengiva, causando uma infecção crônica.

Em uma outra modalidade, a presente invenção fornece métodos e agentes terapêuticos para tratar doenças ou distúrbios associados ao crescimento ósseo anormal ou indesejável. Por exemplo, pacientes tendo a doença conhecida como Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP) desenvolvem um “segundo esqueleto” anormal que impede qualquer movimento. Adicionalmente, o crescimento ósseo anormal pode ocorrer depois da cirurgia de reposição da bacia e assim prejudicar o efeito cirúrgico. Este é um exemplo mais comum de crescimento ósseo patológico e uma situação em que os métodos e composições objeto podem ser terapêuticamente úteis. Os mesmos métodos e composições também podem ser úteis para tratar outras formas de crescimento ósseo anormal (por exemplo, crescimento patológico do osso após trauma, queimaduras ou lesão da medula espinhal), e para tratar ou prevenir as condições indesejáveis associadas ao crescimento ósseo anormal observado em relação ao câncer de próstata ou osteossarcoma metastático. Exemplos destes agentes terapêuticos incluem, mas não são limitados a, polipeptídeos de ActRIIB que antagonizam a função de um ligante de ActRIIB (por exemplo, BMP7), compostos que interrompem a interação entre um ActRIIB e seu ligante (por exemplo, BMP7), e anticorpos que especificamente se ligam a um receptor ActRIIB tal que um ligante de ActRIIB (por exemplo, BMP7) não possa se ligar ao receptor ActRIIB.

Em outras modalidades, a presente invenção fornece composições e métodos para regular o teor de gordura corporal em um animal e para tratar ou prevenir condições relacionadas a este, e particularmente, condições que comprometem a saúde relacionadas a este. De acordo com a presente invenção, a regulação (controle) do peso corporal pode se referir a reduzir ou aumentar o peso corporal, reduzindo ou aumentando a taxa de ganho de peso ou reduzindo ou aumentando a taxa de perda de peso, e também inclui manter ativamente, ou não significativamente mudar o peso corporal (por exemplo, contra influências externas e internas que podem, de outro modo, aumentar ou diminuir o peso corporal). Uma modalidade da presente invenção refere-se a regular o peso corporal administrando-se um polipeptídeo de ActRIIB a um animal (por exemplo, um ser humano) em necessidade do mesmo.

Em uma modalidade específica, a presente invenção refere-se a métodos e compostos para reduzir o peso corporal e/ou reduzir o ganho de peso em um animal, e mais particularmente, para tratar ou melhorar a obesidade em pacientes em risco de sofrer ou

sofrendo de obesidade. Em uma outra modalidade específica, a presente invenção é dirigida a métodos e compostos para tratar um animal que é incapaz de ganhar ou reter peso (por exemplo, um animal com uma síndrome consuntiva). Tais métodos são eficazes em aumentar o peso e/ou massa corporal, ou em reduzir a perda de peso e/ou massa, ou em
5 melhorar as condições associadas ou causadas por peso e/ou massa corporal indesejavelmente baixo (por exemplo, não saudável).

Outros distúrbios, incluindo colesterol alto, que podem ser tratados com proteínas de ActRIIB são descritos nos Exemplos.

7. Composições Farmacêuticas

10 Em certas modalidades, compostos (por exemplo, polipeptídeos de ActRIIB) da presente invenção são formulados com um portador farmaceuticamente aceitável. Por exemplo, um polipeptídeo de ActRIIB pode ser administrado sozinho ou como um componente de uma formulação farmacêutica (composição terapêutica). Os compostos objeto podem ser formulados para administração em qualquer meio conveniente para o uso
15 na medicina humana ou veterinária.

Em certas modalidades, o método terapêutico da invenção inclui administrar a composição tópica, sistêmica, ou localmente como um implante ou dispositivo. Quando administrada, a composição terapêutica para o uso nesta invenção é, certamente, em uma forma fisiologicamente aceitável, livre de pirogênio. Além disso, a composição pode ser
20 desejavelmente encapsulada ou injetada em uma forma viscosa para liberação a um sítio tecidual alvo (por exemplo, ossos, cartilagens, músculos, gorduras ou neurônios), por exemplo, um sítio tendo um dano tecidual. A administração tópica pode ser adequada para a cura do ferimento e reparo tecidual. Agentes terapeuticamente úteis, exceto os polipeptídeos de ActRIIB que também podem ser opcionalmente incluídos na composição, conforme
25 descrito acima, podem ser alternativa ou adicionalmente administrados simultânea ou sequencialmente com os compostos objeto (por exemplo, polipeptídeos de ActRIIB) nos métodos da invenção.

Em certas modalidades, composições da presente invenção podem incluir uma matriz capaz de liberar um ou mais compostos terapêuticos (por exemplo, polipeptídeos de
30 ActRIIB) a um sítio tecidual alvo, fornecendo uma estrutura para o desenvolvimento tecidual e idealmente capazes de serem reabsorvidos no corpo. Por exemplo, a matriz pode fornecer liberação lenta dos polipeptídeos de ActRIIB. Tais matrizes podem ser formadas de materiais presentemente no uso para outras aplicações médicas implantadas.

A escolha do material da matriz é fundamentada em biocompatibilidade,
35 biodegradabilidade, propriedades mecânicas, aparência cosmética e propriedades de interface. A aplicação particular das composições objeto definirá a formulação apropriada. Matrizes potenciais para as composições podem ser sulfato de cálcio, fosfato tricálcico,

hidroxiapatita, ácido polilático e polianidridos biodegradáveis e quimicamente definidos. Outros materiais potenciais são biodegradáveis e biologicamente bem definidos, tais como colágeno ósseo ou dérmico. Outras matrizes são compreendidas de componentes das proteínas puras ou da matriz extracelular. Outras matrizes potenciais não são

5 biodegradáveis e quimicamente definidas, tais como hidroxiapatita, biovidros, aluminatos, ou outras cerâmicas sinterizados. Matrizes podem ser compreendidas de combinações de qualquer um dos tipos de material mencionados acima, tais como ácido polilático e hidroxiapatita ou colágeno e fosfato tricálcico. As biocerâmicas podem ser alteradas em composição, tal como em cálcio-aluminato-fosfato e processamento para alterar o tamanho

10 do poro, tamanho de partícula, forma da partícula, e biodegradabilidade.

Em certas modalidades, métodos da invenção podem ser administrados oralmente, por exemplo, na forma de cápsulas, hóstias, pílulas, tabletes, pastilhas expectorantes (usando uma base flavorizada, usualmente sacarose e acácia ou tragacanto), pós, grânulos, ou como uma solução ou uma suspensão em um líquido aquoso ou não aquoso, ou como

15 uma emulsão líquida óleo em água ou água em óleo, ou como um elixir ou xarope, ou como pastilhas (usando uma base inerte, tal como gelatina e glicerina, ou sacarose e acácia) e/ou como colutórios e semelhantes, cada um contendo uma quantidade pré-determinada de um agente como um ingrediente ativo. Um agente também pode ser administrado como um bolo, eletuário ou pasta.

20 Nas formas de dosagem sólida para administração oral (cápsulas, tabletes, pílulas, drágeas, pós, grânulos, e semelhantes), um ou mais compostos terapêuticos da presente invenção podem ser misturados com um ou mais portadores farmaceuticamente aceitáveis, tais como citrato de sódio ou fosfato dicálcico, e/ou qualquer um dos seguintes: (1) enchedores ou expansores, tais como amidos, lactose, sacarose, glicose, manitol, e/ou

25 ácido silícico; (2) aglutinantes, tais como, por exemplo, carboximetilcelulose, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarose, e/ou acácia; (3) amaciantes, tais como glicerol; (4) agentes desintegrantes, tais como ágar-ágar, carbonato de cálcio, amido de batata ou tapioca, ácido algínico, certos silicatos, e carbonato de sódio; (5) agentes retardadores de solução, tais como parafina; (6) aceleradores de absorção, tais como compostos de amônio

30 quaternário; (7) agentes umectantes, tais como, por exemplo, álcool cetílico e monoestearato de glicerol; (8) absorventes, tais como argila caulim e bentonita; (9) lubrificantes, tais como talco, estearato de cálcio, estearato de magnésio, polietilenoglicóis sólidos, lauril sulfato de sódio, e misturas dos mesmos; e (10) agentes corantes. No caso de cápsulas, tabletes e pílulas, as composições farmacêuticas também podem compreender

35 agentes tamponantes. Composições sólidas de um tipo similar também podem ser utilizadas como enchedores em cápsulas de gelatina com enchimento mole ou duro usando tais excipientes como lactose ou açúcares do leite, assim como polietilenoglicóis de peso

molecular alto e semelhantes.

Formas de dosagem líquidas para administração oral incluem emulsões, microemulsões, soluções, suspensões, xaropes, e elixires farmacologicamente aceitáveis. Além do ingrediente ativo, as formas de dosagem líquidas podem conter diluentes inertes
 5 comumente usados na técnica, tais como água ou outros solventes, agentes solubilizantes e emulsificadores, tais como álcool etílico, álcool isopropílico, carbonato de etila, acetato de etila, álcool benzílico, benzoato de benzila, propilenoglicol, 1,3-butilenoglicol, óleos (em particular, óleos de caroço de algodão, amendoim, milho, germe, oliva, mamona, e gergelim), glicerol, álcool tetraidrofurílico, polietilenoglicóis e ésteres de ácido graxo de
 10 sorbitano, e misturas dos mesmos. Além de diluentes inertes, as composições orais também podem incluir adjuvantes, tais como agentes umectantes, agentes emulsificantes e de suspensão, agentes adoçante, flavorizantes, corantes, aromatizantes, e preservantes.

Suspensões, além dos compostos ativos, podem conter agentes de suspensão, tais como álcoois isostearílicos etoxilados, polioxietileno sorbitol, e ésteres de sorbitano, celulose
 15 microcristalina, metadroxido de alumínio, bentonita, ágar-ágar e tragacanto, e misturas dos mesmos.

Certas composições divulgadas neste relatório podem ser topicamente administradas, na pele ou nas membranas mucosas. As formulações tópicas podem incluir ainda uma ampla variedade de agentes eficazes como realçadores de penetração na pele
 20 ou na camada córnea. Exemplos destes são 2-pirrolidona, N-metil-2-pirrolidona, dimetilacetamida, dimetilformamida, propilenoglicol, álcool metílico ou isopropílico, sulfóxido de dimetila, e azona. Agentes adicionais podem ser ainda incluídos para tornar a formulação cosmeticamente aceitável. Exemplos destes são gorduras, ceras, óleos, corantes, fragrâncias, preservantes, estabilizadores, e agentes ativos de superfície. Agentes
 25 ceratolíticos, tais como aqueles conhecidos na técnica também podem ser incluídos. Exemplos são ácido salicílico e enxofre.

Formas de dosagem para a administração tópica ou transdérmica incluem pós, pulverizações, unguentos, pastas, cremes, loções, géis, soluções, emplastros, e inaladores. O composto ativo pode ser misturado sob condições estéreis com um portador
 30 farmacologicamente aceitável, e com quaisquer preservantes, tampões, ou propelentes que podem ser necessários. Os unguentos, pastas, cremes e géis podem conter, além de um composto objeto da invenção (por exemplo, um polipeptídeo de ActRIIB), excipientes, tais como gorduras animais e vegetais, óleos, ceras, parafinas, amido, tragacanto, derivados de celulose, polietilenoglicóis, silicones, bentonitas, ácido silícico, talco e óxido de zinco, ou
 35 misturas dos mesmos.

Pós e pulverizações podem conter, além de um composto objeto, excipientes tais como lactose, talco, ácido silícico, hidróxido de alumínio, silicatos de cálcio, e pó de

poliamida, ou misturas destas substâncias. Pulverizações podem adicionalmente conter propelentes convencionais, tais como clorofluoroidrocarbonetos e hidrocarbonetos não substituídos voláteis, tais como butano e propano.

Em certas modalidades, composições farmacêuticas adequadas para administração parenteral podem compreender um ou mais polipeptídeos de ActRIIB em combinação com uma ou mais soluções, dispersões, suspensões ou emulsões aquosas ou não aquosas, isotônicas, estéreis farmacêuticamente aceitáveis, ou pós estéreis que podem ser reconstituídos em soluções ou dispersões injetáveis estéreis exatamente antes do uso, que podem conter antioxidantes, tampões, bacteriostáticos, solutos que tornam a formulação isotônica com o sangue do recipiente intencionado ou agentes de suspensão ou espessantes. Exemplos de portadores aquosos e não aquosos adequados que podem ser utilizados nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, polióis (tais como glicerol, propilenoglicol, polietilenoglicol, e semelhantes), e misturas adequadas dos mesmos, óleos vegetais, tais como óleo de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis, tais como oleato de etila. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de materiais de revestimento, tais como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessária no caso de dispersões, e pelo uso de tensoativos.

As composições da invenção também podem conter adjuvantes, tais como preservantes, agentes umectantes, agente emulsificadores e agentes dispersantes. A prevenção da ação de microorganismos pode ser garantida pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, ácido sórbico fenol, e semelhantes. Também pode ser desejável incluir agentes isotônicos, tais como açúcares, cloreto de sódio, e semelhantes nas composições. Além disso, a absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser realizada pela inclusão de agentes que retardam a absorção, tais como monoestearato de alumínio e gelatina.

É entendido que o regime de dosagem será determinado pelo médico atendente considerando vários fatores que modificam a ação dos compostos objeto da invenção (por exemplo, polipeptídeos de ActRIIB). Os vários fatores dependerão da doença a ser tratada. No caso de distúrbios musculares, fatores podem incluir, mas não são limitados a, quantidade de massa muscular desejada a ser formada, os músculos mais afetados pela doença, a condição do músculo deteriorado, a idade, sexo, e dieta do paciente, tempo de administração, e outros fatores clínicos. A adição de outros fatores de crescimento conhecidos à composição final, também pode afetar a dosagem. O progresso pode ser monitorado por avaliação periódica do crescimento e/ou reparo muscular, por exemplo, testando-se a força, avaliação do MRI do tamanho do músculo e análise de biópsias do músculo.

Em certas modalidades da invenção, um ou mais polipeptídeos de ActRIIB podem

ser administrados, juntos (simultaneamente) ou em tempos diferentes (sequencialmente ou sobrepostos). Além disso, polipeptídeos de ActRIIB podem ser administrados com um outro tipo de agentes terapêuticos, por exemplo, um agente indutor de cartilagem, um agente indutor de osso, um agente indutor de músculo, um agente redutor de gordura ou indutor de neurônio. Os dois tipos de compostos podem ser administrados simultaneamente ou em tempos diferentes. Espera-se que os polipeptídeos de ActRIIB da invenção possam agir em conjunto ou sinergisticamente com um outro agente terapêutico.

Em um exemplo específico, uma variedade de fatores osteogênicos, indutores de cartilagem e indutores de osso foi descrita, particularmente bisfosfonatos. Veja por exemplo, Pedido de Patente Europeu N^{os} 148.155 e 169.016. Por exemplo, outros fatores que podem ser combinados com os polipeptídeos de ActRIIB objeto incluem vários fatores de crescimento, tais como fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fatores de crescimento de transformação (TGF- α e TGF- β), e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF).

Em certas modalidades, a presente invenção também fornece terapia genética para a produção *in vivo* de polipeptídeos de ActRIIB. Tal terapia obteria seu efeito terapêutico por introdução das sequências polinucleotídicas de ActRIIB em células ou tecidos tendo os distúrbios conforme listados acima. A liberação de sequências polinucleotídicas de ActRIIB pode ser obtida usando um vetor de expressão recombinante, tal como um vírus quimérico ou um sistema de dispersão coloidal. O uso de lipossomas alvejados para liberação terapêutica de sequências polinucleotídicas de ActRIIB é preferido.

Vários vetores virais que podem ser utilizados para terapia genética, conforme ensinado neste relatório, incluem adenovírus, vírus herpes, varíola, ou, preferivelmente, um vírus RNA tal como um retrovírus. Preferivelmente, o vetor retroviral é um derivado de um retrovírus murino ou aviário. Exemplos de vetores retrovirais em que um único gene estranho pode ser inserido incluem, mas não são limitados a: vírus da leucemia murina de Moloney (MoMuLV), vírus do sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), vírus do tumor mamário murino (MuMTV), e Vírus do Sarcoma de Rous (RSV). Vários vetores retrovirais adicionais podem incorporar genes múltiplos. Todos estes vetores podem transferir ou incorporar um gene para um marcador selecionável de modo que as células transduzidas podem ser identificadas e geradas. Vetores retrovirais podem ser preparados específicos ao alvo ligando-se, por exemplo, um açúcar, um glicolípídeo, ou uma proteína. O alvejamento preferido é realizado usando-se um anticorpo. Aqueles habilitados na técnica reconhecerão que sequências polinucleotídicas específicas podem ser inseridas no genoma retroviral ou ligadas a um envelope viral para permitir liberação específica do alvo do vetor retroviral contendo o polinucleotídeo de ActRIIB. Em uma modalidade preferida, o vetor é alvejado em células/tecidos de ossos, cartilagens, músculos ou neurônios.

Alternativamente, células de cultura de tecidos podem ser diretamente transfectadas com plasmídeos que codificam os genes gag, pol e env de estrutura retroviral, por transfecção de fosfato de cálcio convencional. Estas células depois são transfectadas com o plasmídeo vetor contendo os genes de interesse. As células resultantes liberam o
5 vetor retroviral no meio de cultura.

Um outro sistema de liberação alvejado para polinucleotídeos de ActRIIB é um sistema de dispersão coloidal. Sistemas de dispersão coloidal incluem complexos de macromolécula, nanocápsulas, microesferas, pérolas, e sistemas com base em lipídeo incluindo emulsões óleo em água, micelas, micelas mistas, e lipossomas. O sistema coloidal
10 preferido desta invenção é um lipossoma. Os lipossomas são vesículas de membrana artificial que são úteis como veículos de liberação *in vitro* e *in vivo*. RNA, DNA e vírions intactos podem ser encapsulados no interior aquoso e ser liberados em células em uma forma biologicamente ativa (veja, por exemplo, Fraley, *et al.*, Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Métodos para transferência genética eficaz usando um veículo lipossoma, são
15 conhecidos na técnica, veja, por exemplo, Mannino, *et al.*, Biotechniques, 6:682, 1988. A composição do lipossoma é usualmente uma combinação de fosfolipídeos, usualmente em combinação com esteróides, especialmente colesterol. Outros fosfolipídeos ou outros lipídeos também podem ser usados. As características físicas de lipossomas dependem do pH, força iônica, e a presença de cátions divalentes.

Exemplos de lipídeos úteis na produção de lipossoma incluem compostos fosfatidila, tais como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolipídeos, cerebrosídeos, e gangliosídeos. Fosfolipídeos ilustrativos incluem fosfatidilcolina de ovo, dipalmitoilfosfatidilcolina, e distearoilfosfatidilcolina. O alvejamento de lipossomas também é possível com base, por exemplo, na especificidade do órgão,
20 especificidade da célula, e especificidade da organela e é conhecido na técnica.

EXEMPLIFICAÇÃO

No geral, a invenção presentemente descrita será mais facilmente entendida por referência aos exemplos seguintes, que são meramente incluídos para propósitos de ilustração de certas modalidades da presente invenção, e não são intencionados a limitar a
30 invenção.

Exemplo 1. Geração de uma proteína de fusão de ActRIIb-Fc.

Os requerentes construíram uma proteína de fusão de ActRIIb solúvel que tem o domínio extracelular de ActRIIb humano fundido a um domínio Fc humano ou de camundongo com um ligador mínimo (três aminoácidos glicina) entre eles. Os constructos
35 são referidos como ActRIIb-hFc e ActRIIb-mFc, respectivamente. ActRIIb-hFc é mostrado abaixo como purificado a partir de linhagens celulares de CHO (SEQ ID NO: 5)

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGC
WLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTG
GGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTIS
KAKGOPREPOVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK

As proteínas de ActRIIb-hFc e ActRIIb-mFc foram expressadas em linhagens celulares de CHO. Três sequências líderes diferentes foram consideradas:

(i) Melitina de abelha (HBML): MKFLVNVALVFMVYISYIYA (SEQ ID NO: 7)

(ii) Ativador do Plasminogênio Tecidual (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP
 5 (SEQ ID NO: 8)

(iii) Nativo: MGAAAKLAFVFLISCSSGA (SEQ ID NO: 9).

A forma selecionada utiliza o TPA líder e tem a sequência de aminoácidos não processada seguinte:

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEG
EQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNF
CNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGOPREPOVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVM
HEALHNHYTOKSLSLSPGK

Este polipeptídeo é codificado pela sequência de ácido nucléico seguinte (SEQ ID
 10 NO: 10):

A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA GTCTTCGTTT
 CGCCCGGCOC CTCTGGGCGT GGGGAGGCTG AGACACGGGA GTGCATCTAC TACAACGCCA
 ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACCAGAGCG GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA
 AGCGGCTGCA CTGCTACGCC TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA
 AGGGCTGCTG GCTAGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG
 AGAACCCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG CGCTTCACTC
 ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC ACCCCCGACA GCCCCACCG
 GTGGTGGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG
 TCTTCCTCTT CCCCCAAA OCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CTGAGGTCA
 CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG
 ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT
 ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCTGTC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
 AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG TCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA
 AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA
 AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCAGCGAC ATCGCCGTGG
 AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT
 CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TATAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAAG TGGCAGCAGG

 GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA
 GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

O sequenciamento N-terminal do material produzido pela célula de CHO revelou

uma sequência principal de -GRGEAE (SEQ ID NO: 11). Notavelmente, outros constructos relatados na literatura iniciam com uma sequência -SGR....

A purificação pode ser obtida por uma série de etapas de cromatografia em coluna, incluindo, por exemplo, três ou mais entre as seguintes, em qualquer ordem: cromatografia da proteína A, cromatografia em sefarose Q, cromatografia em fenilsefarose, cromatografia de exclusão por tamanho, e cromatografia de troca catiônica. A purificação pode ser concluída com filtração viral e troca de tampão.

As proteínas de fusão de ActRIIb-Fc também foram expressadas em células HEK293 e células COS. Embora o material a partir de todas as linhagens celulares e condições de cultura razoáveis tenha fornecido proteína com atividade de construção muscular *in vivo*, a variabilidade na potência foi observada, possivelmente se relacionando à seleção de linhagem celular e/ou condições de cultura.

Exemplo 2: Geração de Mutantes de ActRIIb-Fc

Os requerentes geraram uma série de mutações no domínio extracelular de ActRIIB e produziram estas proteínas mutantes como proteínas de fusão solúveis entre ActRIIB extracelular e um domínio Fc. A fusão de ActRIIB-Fc base tem a sequência (porção Fc sublinhada) (SEQ ID NO: 12):

**SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKG
CWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVITYEPPPTAPT
GGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPYEKT
SKAKGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTT
PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTOKLSLSLSPGK**

Várias mutações, incluindo truncamentos N- e C-terminal, foram introduzidas na proteína de ActRIIB-Fc base. Com respeito aos dados apresentados no Exemplo 1, espera-se que estes constructos, se expressados com um TPA líder, estejam desprovidos da serina N-terminal. Mutações foram geradas no domínio extracelular de ActRIIB por mutagênese por PCR. Depois da PCR, os fragmentos foram purificados através de uma coluna Qiagen, digeridos com SfoI e AgeI e gel purificado. Estes fragmentos foram ligados no vetor de expressão pAID4 (veja WO 2006/012627) tal que sob ligação, este criou a fusão de quimera com IgG1 humana. Sob a transformação em *E. coli* DH5 alfa, colônias foram selecionadas e DNAs foram isolados. Para constructos murinos (mFc), uma IgG2a murina foi substituída no lugar da IgG1 humana. Todos os mutantes AU apresentaram sequência verificada.

Todos os mutantes foram produzidos em células HEK293T por transfecção temporária. Em resumo, em um rotor de 500 ml, células HEK293T foram estabelecidas em 6 x 10⁵ células/ml em meio Freestyle (Invitrogen) em volume de 250 ml e cultivadas durante a noite. No dia seguinte, estas células foram tratadas com complexo de DNA:PEI (1:1) em

concentração de DNA final de 0,5 ug/ml. Depois de 4 h, um meio de 250 ml foi adicionado e as células foram cultivadas durante 7 dias. O meio condicionado foi colhido extraíndo-se as células por centrifugação e concentrado.

Os mutantes foram purificados usando uma variedade de técnicas, incluindo, por exemplo, coluna da proteína A e eluídos com tampão glicina com baixo pH (3,0). Depois da neutralização, estes foram dialisados contra PBS.

Mutantes também foram produzidos em células de CHO por metodologia similar.

Mutantes foram testados em ensaios e/ou bioensaios de ligação descritos abaixo. Em alguns exemplos, os ensaios foram realizados com meio condicionado ao invés de proteínas purificadas.

Exemplo 2. Bioensaio para sinalização mediada por GDF-11 e Activina.

Um Ensaio de Gene Repórter A-204 foi usado para avaliar os efeitos de proteínas de ActRIIB-Fc na sinalização por GDF-11 e Activina A. Linhagem celular: Rbdomiossarcoma Humano (derivado do músculo). Vetor Repórter: pGL3(CAGA)12 (Descrito em Dennler *et al*, 1998, EMBO 17: 3091-3100.) Veja Figura 5. O motivo CAGA12 está presente em genes responsivos a TGF-Beta (gene PAI-1), assim, este vetor é de uso geral para sinalização de fatores através de Smad2 e 3.

Dia 1: Dividir as células A-204 em placa de 48 poços.

Dia 2: Células A-204 transfectadas com 10 ug de pGL3(CAGA)12 ou pGL3(CAGA) 12(10 ug)+ pRLCMV (1 ug) e Eugene.

Dia 3: Adicionar fatores (diluídos em meio + BSA 0,1 %). Os inibidores precisam ser pré-incubados com Fatores durante 1 h antes da adição às células. 6 h mais tarde, células enxaguadas com PBS, e células lisadas.

Este procedimento é seguido por um ensaio de Luciferase. Na ausência de quaisquer inibidores, Activina A mostrou a estimulação, 10 vezes, da expressão do gene repórter e uma ED₅₀ de ~ 2 ng/ml. GDF-11: estimulação, 16 vezes, ED₅₀: ~ 1,5 ng/ml.

ActRIIB(R64, 20 a 134) é um inibidor potente da atividade de activina, GDF-8 e GDF-11 neste ensaio. Variantes também foram testadas neste ensaio.

Exemplo 3. Inibição de GDF-11 de Truncamentos no N-terminal e C-terminal

Truncamentos no N-terminal e C-terminal da porção ActRIIB, ActRIIB-Fc (R64, 20 a 134) foram gerados e testados quanto à atividade como inibidores de GDF-11 e activina. As atividades são mostradas abaixo (conforme medidas em meio condicionado):

Truncamentos de ActRIIB-hFc no C-terminal:

	IC ₅₀ (ng/mL)	
	GDF-11	Activina
ActRIIB-hFc (R64, 20 a 134)	45	22
ActRIIB-hFc (R64, 20 a 132)	87	32

ActRIIb-hFc (R64, 20 a 131)	120	44
ActRIIb-hFc (R64, 20 a 128)	130	158

Conforme pode ser observado, truncamentos de três (terminando com ...PPT), seis (terminando com ...YEP) ou mais aminoácidos no C-terminal causam três vezes ou mais a diminuição na atividade da molécula. O truncamento dos aminoácidos de final 15 da porção ActRIIB causa uma perda maior de atividade (veja WO 2006/012627).

- 5 Truncamentos no terminal amino foram preparados na base de uma proteína de ActRIIb-hFc (R64 20 a 131). As atividades são mostradas abaixo (conforme medidas em meio condicionado):

Truncamentos de ActRIIb-hFc no N-terminal:

	IC ₅₀ (ng/mL)	
	GDF-11	Activina
ActRIIb-hFc (R64, 20 a 131) (GRG...)	183	201
ActRIIb-hFc (R64, 21 a 131) (RGE...)	121	325
ActRIIb-hFc (R64, 22 a 131) (GEA...)	71	100
ActRIIb-hFc (R64, 23 a 131) (EAE...)	60	43
ActRIIb-hFc (R64, 24 a 131) (AET...)	69	105

- Consequentemente, truncamentos de dois, três ou quatro aminoácidos a partir do N-terminal levam à produção de uma proteína mais ativa do que as versões com um domínio extracelular de comprimento total. Experimentos adicionais mostram que um truncamento de cinco aminoácidos, ActRIIb-hFc (R64, 25 a 131) tem atividade equivalente à forma não truncada, e deleções adicionais no N-terminal continuam a degradar a atividade da proteína. Portanto, constructos ideais terão um C-terminal terminando entre o aminoácido 133 a 134 da SEQ ID NO: 4 e um N-terminal iniciando nos aminoácidos 22 a 24 da SEQ ID NO: 4. Um N-terminal correspondente aos aminoácidos 21 ou 25 fornecerá atividade que é similar ao constructo de ActRIIb-hFc (R64, 20 a 134).

Exemplo 4. Variantes de ActRIIb-Fc, Atividade com Base Celular.

- A atividade das proteínas de ActRIIB-Fc foi testada em um ensaio com base celular, conforme descrito acima. Os resultados são resumidos na Tabela 1, abaixo. Algumas variantes foram testadas em constructos de truncamento no C-terminal diferentes. Conforme debatido acima, truncamentos de cinco ou quinze aminoácidos causam a redução na atividade. Notavelmente, as variantes de L79D e L79E mostraram perda substancial de ligação de activina restando a inibição do tipo selvagem de GDF-11.

- 25 Ligação de ActRIIB-Fc Solúvel a GDFII e Activina A:

Variações de ActRIIB-Fc	Porção de ActRIIB (corresponde aos aminoácidos da SEQ ID NO: 4)	Atividade de Inibição de GDF11	Atividade de Inibição de Activina
64R	20 a 134	+++ (aprox. $K_1 10^{-8}$ M)	+++ (aprox. $K_1 10^{-8}$ M)
64R	20 a 134	+ (aprox. $K_1 10^{-6}$ M)	+ (aprox. $K_1 10^{-6}$ M)
64R	20 a 129	+++	++++
64R K74A	20 a 134	+++	++++
64RA 24N	20 a 134	+++	+++
64R A24N	20 a 119	++	++
64R A24N K74A	20 a 119	+	+
R64 L79P	20 a 134	+	+
R64 L79P K74A	20 a 134	+++	+
R64 L79D	20 a 134	+++	+
R64 L79E	20 a 134	+++	+
R64K	20 a 134	+++	+++
R64K	20 a 119	+++	+++
R64 P129S P130A	20 a 134	+++	+++
R64N	20 a 134	+	+

+ Atividade deficiente (aproximadamente $K_1 1 \times 10^{-6}$)

++ Atividade moderada (aproximadamente $K_1 1 \times 10^{-7}$)

+++ Atividade satisfatória (tipo selvagem) (aproximadamente $K_1 1 \times 10^{-8}$)

++++ Maior do que a atividade do tipo selvagem

- 5 Diversas variantes foram avaliadas quanto à meia vida do soro em ratos. ActRIIB(R64 20 a 134)-Fc tem uma meia vida do soro de aproximadamente 70 horas. ActRIIB(R64 A24N 20 a 134)-Fc tem uma meia vida do soro de aproximadamente 100 a 150 horas. A variante de A24N tem atividade no ensaio de base celular (acima) e ensaios *in vivo* (abaixo) que são equivalentes à molécula do tipo selvagem. Ligada à meia vida mais longa,
- 10 isto significa que com o passar do tempo, uma variante de A24N fornecerá maior efeito por unidade de proteína do que a molécula do tipo selvagem.

Notavelmente, a introdução de aminoácidos ácidos (ácido aspártico ou glutâmico) na posição 79 diminuiu seletivamente a ligação de activina restando a ligação de GDF11/GDF8. Conforme debatido abaixo, as proteínas de ActRIIB-Fc do tipo selvagem

parecem ter efeitos em tecidos, a não ser no músculo, alguns dos quais podem ser indesejáveis. Conforme divulgado neste relatório, espera-se que estes efeitos se relacionem aos vários ligantes diferentes que são ligados e inibidos por ActRIIB-Fc, incluindo, possivelmente, activina. Dados iniciais indicam que, em camundongos, as variantes de L79E e L79D reduziram os efeitos em tecidos, a não ser no músculo, retendo seus efeitos no músculo. Embora as variações deste tipo possam ser vistas como variantes de ActRIIB, deve ser observado que estas proteínas funcionam verdadeiramente como receptores de activina, e assim o nome “ActRIIB” é apropriado apenas como um indicador da derivação destes polipeptídeos. Embora os resíduos ácidos na posição 79 diminuam a ligação de activina retendo a ligação de GDF11, outras alterações nesta posição não têm este efeito. Uma mudança de L79A aumenta a ligação de activina em relação à ligação de GDF11. Uma mudança de L79P diminui tanto a ligação de activina quanto de GDF11.

Exemplo 5. Ligação de GDF-11 e Activina A.

A ligação de certas proteínas de ActRIIB-Fc aos ligantes foi testada em um ensaio BiaCore™.

As variantes de ActRIIB-Fc ou proteína do tipo selvagem foram capturadas no sistema usando um anticorpo anti-hFc. Os ligantes foram injetados e fluíram sobre as proteínas receptoras capturadas. Os resultados são resumidos nas tabelas abaixo.

Variantes de IIB com especificidade de ligação ao ligante.

	GDF11		
Proteína	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD(M)
ActRIIB-hFc (R64 20 a 134)	1,34e-6	1,13e-4	8,42e-11
ActRIIB-hFc (R64, A24N 20 a 134)	1,21e-6	6,35e-5	5,19e-11
ActRIIB-hFc (R64, L79D 20 a 134)	6,7e-5	4,39e-4	6,55e-10
ActRIIB-hFc (R64, L79E 20 a 134)	3,8e-5	2,74e-4	7,16e-10
ActRIIB-hFc (R64K 20 a 134)	6,77e-5	2,41e-5	3,56e-11
	GDF8		
Proteína	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD(M)
ActRIIB-hFc (R64 20 a 134)	3,69e-5	3,45e-5	9,35e-11
ActRIIB-hFc (R64, A24N 20 a 134)			
ActRIIB-hFc (R64, L79D 20 a 134)	3,85e-5	8,3e-4	2,15e-9
ActRIIB-hFc (R64, L79E 20 a 134)	3,74e-5	9e-4	2,41e-9
ActRIIB-hFc (R64K 20 a 134)	2,25e-5	4,71e-5	2,1e-10
ActRIIB-hFc (R64K 20 a 129)	9,74e-4	2,09e-4	2,15e-9
ActRIIB-hFc (R64, P129S, P130R 20 a 134)	1,08e-5	1,8e-4	1,67e-9
ActRIIB-hFc (R64, K74A 20 a 134)	2,8e-5	2,03e-5	7,18e-11
	Activina A		

Proteína	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD(M)
ActRIIB-hFc (R64 20 a 134)	5,94e6	1,59e-4	2,68e-11
ActRIIB-hFc (R64, A24N 20 a 134)	3,34e6	3,46e-4	1,04e-10
ActRIIB-hFc (R64, L79D 20 a 134)			Pouca ligação
ActRIIB-hFc (R64, L79E 20 a 134)			Pouca ligação
ActRIIB-hFc (R64K 20 a 134)	6,82e6	3,25e-4	4,76e-11
ActRIIB-hFc (R64K 20 a 129)	7,46e6	6,28e-4	8,41e-11
ActRIIB-hFc (R64, P129S, P130R 20 a 134)	5,02e6	6,28e-4	8,31e-11

Estes dados confirmam os dados do ensaio com base celular, demonstrando que a variante de A24N retém a atividade de ligação ao ligante que é similar àquela da molécula de ActRIIB-hFc (R64 20 a 134), e que a molécula de L79D ou L79E retém a ligação de miostatina e GDF11, porém mostra ligação marcadamente diminuída (não quantificável) à

5 Activina A.

Outras variantes foram geradas e testadas, conforme relatado na WO 2006/012627, usando ligantes ligados ao dispositivo e ao receptor que flui sobre os ligantes ligados. Uma tabela de dados com respeito a estas variantes é reproduzida abaixo:

Ligação de variantes de ActRIIB-Fc solúveis a GDF11 e Activina A (ensaio BiaCore)

ActRIIB	ActA	GDF11
WT (64A)	KD = 1,8e-7M (+)	KD = 2,6e-7M (+)
WT (64R)	na	KD = 8,6e-8M (+++)
cauda +15	KD ~2,6e-8M (+++)	KD = 1,9e-8M (++++)
E37A	*	*
R40A	-	-
D54A	-	*
K55A	++	*
R56A	*	*
K74A	KD = 4,35e-9 M +++++	KD = 5,3e-9M +++++
K74Y	*	--
K74F	*	--
K74I	*	--
W78A	*	*

L79A	+	*
D80K	*	*
D80R	*	*
D80A	*	*
D80F	*	*
D80G	*	*
D80M	*	*
D80N	*	*
D80I	*	--
F82A	++	-

* Nenhuma ligação observada

-- < 1/5 de ligação de WT

- ~ 1/2 de ligação de WT

+ WT

++ ligação aumentada < 2 x

+++ ligação aumentada em ~5 x

++++ ligação aumentada em ~10 x

+++++ ligação aumentada em ~ 40 x

Exemplo 6: O Efeito de Proteínas de ActRIIB-Fc sobre a Massa Muscular em

10 Camundongos do Tipo Selvagem.

Os requerentes determinaram a capacidade de a proteína de ActRIIB-Fc aumentar a massa muscular em camundongos do tipo selvagem.

Camundongos C57Bl10 foram dosados (10 mg/kg; intraperitoneal (i.p.)) duas vezes por semana tanto com a proteína de ActRIIB humano (R64 20 a 134) quanto com o ActRIIB humano (K74A 20 a 134). Os camundongos foram mapeados por RMN no dia 0 e no dia 28 para determinar a mudança percentual de massa tecidual magra corporal total. Os camundongos tratados com ActRIIB (R64 20 a 134)-Fc humano exibiram um aumento significativo de 31,1 % no tecido magro em comparação ao grupo controle veículo. Os camundongos tratados com a proteína de ActRIIB (K74A 20 a 134)-Fc humano exibiram um aumento significativo no aumento de massa de tecido magro em comparação ao grupo controle, embora em menor grau do que o grupo tratado com ActRIIB humano (R64 20 a 134). Em um estudo similar, camundongos foram tratados duas vezes por semana com PBS, 1 mg/kg, 3 mg/kg, ou ActRIIB murino 10 mg/kg (WT, 20 a 134)-Fc, intraperitonealmente. No fim do estudo, músculos femorais, gastrocnêmicos, peitorais e do diafragma foram dissecados e pesados. Os resultados são resumidos na Tabela 3, abaixo.

Tabela 3: Pesos de tecido de camundongos do tipo selvagem tratados com veículo e ActRIIB (WT, 20 a 134)-Fc murino

Tratado com veículo	Gastrocnêmico (L+R)	Femoral (L+R)	Peitoral (L+R)	Diafragma
Média (gramas) ± desvio Std.	0,306 ± 0,020	0,187 ± 0,040	0,257 ± 0,020	0,076 ± 0,020
muActRIIB (WT, 20 a 134)-Fc (10 mg/kg)	Gastrocnêmico (L+R)	Femoral (L+R)	Peitoral (L+R)	Diafragma
Média (gramas) ± desvio Std.	0,387 ± 0,010	0,241 ± 0,014	0,360 ± 0,070	0,124 ± 0,040
Valor p do teste t	0,0001	0,009	0,02	0,04

Conforme mostrado na Tabela 3, a proteína de fusão de ActRIIB (WT, 20 a 134)-Fc murino aumenta significativamente a massa muscular em camundongos do tipo selvagem. Nos camundongos tratados com ActRIIB (WT, 20 a 134)-Fc murino, os músculos gastrocnêmicos foram aumentados em 26,5 %, os músculos femorais aumentados em 28,9 %, os músculos peitorais foram aumentados em 40,0 %. Também observamos mudanças no músculo do diafragma, o qual foi aumentado em 63 % em comparação aos camundongos controle tratados com veículo. A diminuição do músculo do diafragma é uma complicação comum em uma variedade de distrofias musculares. Portanto, o aumento no peso do diafragma observado depois do tratamento com ActRIIB (WT, 20 a 134)-Fc murino pode ser de importância clínica.

Exemplo 7: O Efeito das Proteínas de ActRIIB-Fc de Meia Vida Longa sobre a Massa Muscular em Camundongos do Tipo Selvagem.

Os requerentes determinaram a capacidade de a variante de meia vida longa da proteína de ActRIIB-mFc (R64, A24N 20 a 134) aumentar a massa muscular em camundongos do tipo selvagem.

Camundongos C57Bl10 foram dosados (10 mg/kg; intraperitoneal (i.p.)) duas vezes por semana tanto com a proteína de ActRIIB-mFc humano (R64 20 a 134) quanto com o ActRIIB-mFc humano (R64, A24N 20 a 134). Os camundongos foram mapeados por RMN em vários pontos até o dia 25 para determinar a mudança percentual de massa tecidual magra corporal total. Ambas as moléculas causaram aumentos equivalentes no peso corporal total e nas massas musculares, com os efeitos de aumento nos músculos gastrocnêmicos, femorais e peitorais variando de um 40 a 70 %. Veja as Figuras 5 e 6.

Estes dados demonstram que a forma de meia vida aumentada da molécula promove o crescimento muscular em um estudo de curto prazo com uma potência equivalente à molécula do tipo selvagem.

Exemplo 8: O Efeito das Proteínas de ActRIIB-Fc com Ligação de Activina

Reduzida sobre a Massa Muscular em Camundongos do Tipo Selvagem.

Os requerentes determinaram a capacidade de a variante de meia vida longa da proteína de ActRIIB-mFc (R64, L79D 20 a 134) aumentar a massa muscular em camundongos do tipo selvagem.

- 5 Camundongos C57Bl10 foram dosados (10 mg/kg; intraperitoneal (i.p.)) duas vezes por semana tanto com a proteína de ActRIIB-mFc humano (R64 20 a 134) quanto com o ActRIIB-mFc humano (R64, L79D 20 a 134). Os camundongos foram mapeados por RMN em vários pontos até o dia 24 para determinar a mudança percentual de massa tecidual magra corporal total. Os dados são mostrados na tabela abaixo.

	Peso Corporal Dia 0 (g)	Peso Corporal Dia 24 (g)	Gastrocnêmico (L+R)	Femoral (L+R)	Peitoral (L+R)
TBS Mod. (p/v)	24,4 ± 1,51	26,8 ± 1,43	0,29 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,24 ± 0,05
R64, 20 a 134 (10 mg/kg)	25,0 ± 1,36	31,2* ± 1,53	0,40* ± 0,02	0,24* ± 0,02	0,37* ± 0,07
R64, L79D, 20 a 134 (10 mg/kg)	25,3 ± 1,22	28,1 ± 1,64	0,32* ± 0,02	0,20* ± 0,02	0,27 ± 0,05
					* p < 0,05

- 10 Estes dados demonstram que a variante de L79D (ligação de Activina A reduzida) de ActRIIB é ativa *in vivo* para a promoção do crescimento muscular, entretanto, a quantidade de crescimento muscular é menor do que aquela para o ActRIIB do tipo selvagem. Este efeito diminuído pode ser causado, em parte, pela redução leve na ligação de miostatina ou pela perda de ligação a um regulador negativo de crescimento muscular
- 15 adicional ainda desconhecido. A capacidade para estimular o crescimento muscular sem afetar a sinalização de Activina A é altamente desejável, pois a activina é uma molécula regulatória amplamente expressada, conhecida como possuidora de efeitos no sistema reprodutivo, ossos, fígado e muitos outros tecidos. Em camundongos, ActRIIB-mFc (R64 20 a 134) causa efeitos substanciais no sistema reprodutivo e, em alguns exemplos, causa um
- 20 aumento no tamanho do baço. A molécula de ActRIIB-mFc (R64, L79D 20 a 134) tem efeitos amplamente atenuados tanto em tecidos reprodutivos quanto no baço, indicando que esta molécula será particularmente adequada para a promoção do crescimento muscular em pacientes que são reprodutivamente ativos ou têm o desejo de minimizar os efeitos no sistema reprodutivo.

Exemplo 9: O Efeito da Proteína de ActRIIB-Fc sobre a Massa e Força Musculares em Camundongos Mdx.

De modo a determinar a capacidade de a proteína de ActRIIB (WT, 20 a 134)-Fc murino aumentar a massa muscular em uma condição de doença, os requerentes determinaram a capacidade de a proteína de ActRIIB-Fc aumentar a massa muscular no modelo camundongo mdx de distrofia muscular.

Camundongos Mdx adultos foram tratados duas vezes por semana com a proteína de ActRIIB (WT, 20 a 134)-Fc murino (1, 3, ou 10 mg/kg; intraperitoneal) ou um controle veículo PBS. A força que um camundongo exerce quando traciona um transdutor de força é medida para determinar força e preensão da pata dianteira. A força média de 5 experimentos de tração foi usada para a comparação de força e preensão entre os grupos. No fim do estudo, os músculos femorais, gastrocnêmicos, peitorais e do diafragma foram dissecados e pesados. Medições de força e preensão também mostraram um aumento significativo. A resultados da massa muscular são resumidos na tabela abaixo.

Pesos de tecido de camundongos mdx tratados com veículo e ActRIIB (WT, 20 a 134)-Fc murino

Tratado com veículo	Gastrocnêmico (L+R)	Femoral (L+R)	Peitoral (L+R)	Diafragma
Média (gramas) ± desvio Std.	0,413 ± 0,040	0,296 ± 0,019	0,437 ± 0,060	0,111 ± 0,030
muActRIIB (WT, 20 a 134)-Fc (10 mg/kg)	Gastrocnêmico (L+R)	Femoral (L+R)	Peitoral (L+R)	Diafragma
Médio (gramas) ± desvio Std.	0,52 ± 0,050	0,39 ± 0,05	0,807 ± 0,21	0,149 ± 0,020
Valor p do teste t	0,0006	0,0006	0,002	0,05

Conforme ilustrado na tabela, os grupos tratados com ActRIIB (WT, 20 a 134)-Fc murino exibiram massa tecidual magra aumentada nos camundongos mdx em comparação aos camundongos tratados com PBS. O tratamento com ActRIIB-Fc aumentou o tamanho do músculo gastrocnêmico em 25,9 %, o tamanho do músculo femoral em 31,8 %, e o tamanho do músculo peitoral em 85,4 % em comparação ao grupo controle veículo. De importância clínica possível, também descobrimos que os pesos do diafragma dos camundongos tratados com ActRIIB (WT, 20 a 134)-Fc de camundongo foram aumentados em 34,2 % em comparação ao grupo controle. Estes dados demonstram a eficácia da proteína de ActRIIB-Fc em uma condição de doença de distrofia muscular.

Adicionalmente, camundongos mdx tratados com a proteína de ActRIIB-Fc exibem

força e preensão aumentada em comparação aos controles tratados com veículo. Em 16 semanas, os grupos de ActRIIB de 1, 3 e 10 mg/kg demonstraram um aumento em 31,4 %, 32,3 % e 64,4 % na força e preensão, respectivamente, em comparação ao grupo controle veículo. O desempenho de força e preensão aperfeiçoado dos grupos tratados com ActRIIB murino (WT, 20 a 134)-Fc sustenta a idéia de que o músculo aumentado encontrado nos grupos de tratamento é fisiologicamente relevante. Camundongos mdx são suscetíveis à lesão contrátil-induzida e passam por ciclos mais significantes de degeneração e regeneração do que suas contrapartes do tipo selvagem. Apesar destes fenótipos musculares, o tratamento com ActRIIB murino (WT, 20 a 134)-Fc aumenta a força e preensão nos camundongos mdx.

Na Distrofia Muscular de Duchenne, o início da doença ocorre precocemente na infância, frequentemente antes dos cinco anos de idade. Consequentemente, os dados apresentados acima com respeito aos camundongos adultos não refletem necessariamente os efeitos que uma molécula de ActRIIB teria em crianças com DMD. Para resolver esta questão, um estudo foi conduzido com camundongos mdx jovens.

O tratamento com ActRIIB-mFc (R64, 20 a 134) aumenta significativamente o peso corporal em camundongos C57BL/10 e mdx jovens (quatro semanas de vida). A análise de composição corporal usando espectroscopia de RMN *in vivo* revelou massa tecidual magra aumentada associada a pesos corporais mais altos.

Camundongos C57BL/10 tratados com ActRIIB-mFc (R64, 20 a 134) ganharam 35,2 % de massa tecidual magra e o grupo mdx tratado ganhou 48,3 % a mais de massa tecidual magra do que seus grupos controle respectivos. Além disso, o efeito do tratamento com ActRIIB-mFc (R64, 20 a 134) sobre a resistência foi avaliado. Escores da força e preensão de camundongos mdx tratados com veículo foram 15,7 % menores do que o grupo C57BL/10 veículo, desse modo ilustrando a fraqueza muscular associada à deficiência de distrofina. Ao contrário, os camundongos mdx tratados com ActRIIB-mFc (R64, 20 a 134) aperfeiçoaram sua força e preensão em comparação ao grupo veículo mdx, e atingiram medições de força e preensão que superaram aquelas dos camundongos veículo C57BL/10 e alcançaram a nível dos escores de força e preensão de C57BL/10 tratados (mdx veículo: $0,140 \pm 0,01$ KgF; mdx tratado: $0,199 \pm 0,02$ KgF; C57BL/10 veículo: $0,166 \pm 0,03$; $0,205 \pm 0,02$ KgF). Notavelmente, o tratamento restabeleceu os camundongos mdx jovens aos níveis do tipo selvagem de força e preensão. Portanto, a molécula de ActRIIB-mFc (R64, 20 a 134) tem aplicações clínicas importantes na distrofia muscular de Duchenne, particularmente em pacientes jovens em uma idade próxima ao início da doença.

Exemplo 7: O Efeito da Proteína de ActRIIB-Fc sobre a Força e Sobrevivência em Camundongos SOD1.

Para determinar a capacidade de polipeptídeos de ActRIIB aumentarem a força e

sobrevivência em um modelo camundongo de ALS, os requerentes testaram a proteína de ActRIIB-Fc no camundongo SOD1.

Camundongos B6.Cg-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J, ou SOD1, portavam grandes números de cópias do alelo mutante do transgene superóxido dismutase humano. Níveis altos desta proteína transportam um fenótipo aos camundongos que é comparável ao da ALS humana. Os camundongos SOD1 desenvolveram paralisia ascendente e exibiram sinais precoces da doença em 91 dias. Os resultados da doença com morte prematura ocorreram entre 19 a 23 semanas de idade.

Os camundongos SOD1 foram dosados com um controle veículo ou ActRIIB-mFc (K74A 20 a 134) (i.p., 5mg/kg, duas vezes por semana) iniciando com 10 semanas de idade. A força que um camundongo exerce quando traciona um transdutor de força é uma medida da força e preensão da pata dianteira. A força média de 5 experimentos de tração foi usada para a comparação da força e preensão entre os grupos. A sobrevivência foi calculada de acordo com o número de dias entre a data que o camundongo foi gerado e a data que o camundongo apresentou-se incapaz de se direcionar por si só dentro de 30 segundos até ficar deitado. A Figura 7 mostra as medições de força e preensão e a figura 8 ilustra os dados de sobrevivência.

Camundongos no estágio final da doença têm dificuldade de ordenação, presumivelmente devido à progressão da paralisia, e parecem desalinhados. A observação superficial dos camundongos revelou que o grupo de tratamento com ActRIIB (K74A 20 a 134)-Fc murino pareceu bem ordenado mesmo nos estágios finais da doença em comparação ao grupo PBS. Esta observação sugere que os camundongos tratados estão em melhores condições de saúde e mantêm uma qualidade de vida superior aos controles.

Conforme é observado na figura 7, os camundongos SOD1 que recebem o tratamento com ActRIIB (K74A 20 a 134)-Fc murino exibem uma força e preensão significativamente maior em comparação ao grupo controle PBS. Isto é observado no dia 117, o estágio precoce da doença, assim como depois que a doença progrediu no dia 149. A Figura 8 ilustra que os camundongos tratados com ActRIIB (K74A 20 a 134)-Fc sobreviveram significativamente durante um período mais longo do que os controles veículo. Este estudo ilustra a utilidade do ActRIIB (K74A 20 a 134)-Fc murino no modelo camundongo de ALS em aperfeiçoar a resistência e sobrevivência dos camundongos.

Um experimento similar foi realizado com camundongos SOD1, porém o tratamento foi atrasado até o início totalmente detectável da doença (dia 130), de modo a melhor imitar o tratamento de ALS humana depois do início de sintomas significantes da doença. No dia 130, camundongos SOD1 foram divididos em grupos tratados com veículo (TBS modificado) ou ActRIIB (R64 20 a 134)-mFc (10 mg/kg). Camundongos foram subcutaneamente dosados uma vez por semana. Os camundongos foram mapeados por RMN nos dias 1 e 27

do estudo (idades de 129 e 157 dias, respectivamente). As medições de força e preensão foram realizadas nos dias 0 e 20 do estudo. No fim do estudo, o grupo macho controle perdeu 4,3 % de peso corporal a partir do dia 0 de estudo, ao passo que o grupo tratado ganhou 7,8 % de peso corporal a partir do dia 0 de estudo. O grupo fêmea controle perdeu 1,5 % e o grupo fêmea tratado ganhou 15 % de peso corporal a partir do dia 0 de estudo.

Medição de Força e Preensão de SOD1

	Dia 0	Dia 20
Controle Macho	0,149 ± 0,02	0,097 ± 0,02 ^a
ActRIIB (R64 20 a 134)-mFc Macho	0,147 ± 0,02	0,128 ± 0,02 ^{a,b}
Controle Fêmea	0,130 ± 0,02	0,091 ± 0,02 ^a
ActRIIB (R64 20 a 134)-mFc Fêmea	0,128 ± 0,01	0,11 ± 0,02 ^b

Medições de força e preensão dos dias 0 e 20 em camundongos SOD1 machos e fêmeas. O sobrescrito “a” denota significativamente diferente em comparação à medida do dia 0 respectiva ($p < 0,05$). O sobrescrito “b” denota diferença significativa entre as medições do dia 20 ($p < 0,05$) de PBS (Grupo 1) e ActRIIB (R64 20 a 134)-mFc (Grupo 2).

Os camundongos foram mapeados por RMN para determinar mudanças na composição corporal atribuídas ao tratamento. Camundongos macho controle perderam 6,0 % de sua massa tecidual magra durante o curso do estudo (dia 1: 18,2 g ± 1,28; dia 27: 17,1 g ± 1,10). Camundongos macho tratados ganharam 9,1 % de massa tecidual magra a partir do dia 0 de estudo (dia 1: 19,17 g ± 0,77; dia 27: 20,92 g ± 0,74). Camundongos fêmea controle obtiveram 0,83 % de redução de massa magra a partir do início do estudo (dia 1: 13,18 g ± 0,84; dia 27: 13,08 g ± 0,71) e camundongos fêmea tratados obtiveram 10,7 % de aumento de peso corporal a partir do dia 0 de estudo (dia 1: 13,66 g ± 0,83; dia 27: 15,12 g ± 1,21). Os grupos macho e fêmea tratados ganharam quantidades significantes de tecido magro em comparação aos seus grupos controle PBS respectivos ($p < 0,001$).

Efeitos de ActRIIB (R64 20 a 134)-mFc sobre o Músculo de SOD1

	Gastrocnêmico (L+R)	Femoral (L+R)	Peitoral (L+R)
Controle Macho	0,18 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,20 ± 0,04
ActRIIB (R64 20 a 134)-mFc Macho	0,22 ± 0,04	0,15 ± 0,02	0,30 ± 0,04
Controle Fêmea	0,13 ± 0,02	0,089 ± 0,016	0,11 ± 0,01
ActRIIB (R64 20 a 134)-mFc Fêmea	0,17 ± 0,03	0,01 ± 0,02	0,15 ± 0,05

Estes dados indicaram que o tratamento com ActRIIB-Fc pode ser benéfico no tratamento de pacientes que têm ALS ativa, aperfeiçoando a função muscular e qualidade de vida.

Exemplo 8: O Efeito de uma Proteína de ActRIIB-Fc sobre a Adiposidade e

Diabetes em Camundongos Obesos.

Os requerentes testaram as proteínas de ActRIIB-mFc em camundongos alimentados com uma dieta com alto teor de gordura (HFD) para determinar a capacidade de ActRIIB-Fc reduzir a adiposidade em um modelo camundongo de obesidade.

O diabetes tipo II é uma complicação principal da obesidade e é caracterizado pela resistência à insulina. Níveis de insulina no período de jejum elevados são indicativos de resistência à insulina e fornecem um meio de testar se um animal está em um estado resistente à insulina. Os requerentes determinaram o efeito do tratamento com ActRIIB (R64 K74A 20 a 134)-Fc murino sobre a normalização dos níveis de insulina no período de jejum em um modelo camundongo de obesidade.

Camundongos C57BL/6 alimentados com HFD foram mantidos em uma dieta composta de 35 % de gordura e considerados obesos quando seu peso corporal foi aproximadamente 50 % maior do que aquele de camundongos com idade combinada alimentados com uma dieta alimentar padrão (4,5 % de gordura). Os camundongos obesos foram dosados duas vezes por semana tanto com um controle veículo quanto com o ActRIIB (R64 K74A 20 a 134)-Fc humano (10 mg/kg; i.p.). Os camundongos obesos foram mapeados por RMN para determinar a composição corporal no início da dosagem e depois de 3 semanas da dosagem. As mudanças na composição corporal a partir do valor de referência são resumidas na figura 9.

Camundongos foram alimentados com HFD e considerados obesos quando seus pesos corporais foram 50 % maiores do que suas contrapartes alimentadas com alimento padrão. Camundongos alimentados com HFD foram dosados tanto com um controle veículo quanto com ActRIIB (R64 K74A 20 a 134)-Fc murino (5 mg/kg duas vezes por semana; i.p.) durante 35 semanas. No fim do estudo, camundongos foram submetidos ao jejum durante a noite. Ao término do jejum, o sangue foi coletado e processado para soro. O soro depois foi usado para determinar níveis de insulina no período de jejum em ambos os grupos. Os resultados quanto ao efeito de ActRIIB (K74A 20 a 134)-Fc murino sobre os níveis de insulina no período de jejum de camundongos obesos são resumidos na tabela abaixo.

Níveis de insulina no período de jejum a partir de camundongos tratados com veículo e ActRIIB (K74A 20 a 134)-Fc murino

	HFD PBS	HFD ActRIIB (K74A 20 a 134)-mFc murino
Média (ng/ml) $\pm$ Desvio Std.	2,27 $\pm$ 1,64	0,78 $\pm$ 0,40
test t	N/A	0,012

A Figura 9 mostra a adiposidade diminuída do grupo ActRIIB (R64 K74A 20 a 134)-Fc murino em comparação ao controles tratados com veículo. Descobriu-se que os

camundongos tratados obtiveram 25,9 % de diminuição na massa de gordura em comparação aos seus níveis de valor de referência. Adicionalmente, o grupo tratado aumentou sua massa magra em 10,1 % acima de seus níveis de valor de referência. As mudanças percentuais na massa tecidual adiposa e na tecidual magra do ActRIIB (R64 K74A 20 a 134)-mFc foram significativamente maiores do que as mudanças percentuais do grupo tratado com PBS.

Neste modelo, camundongos foram mantidos em uma dieta com alto teor de gordura até que eles se apresentassem > 50 % mais pesados do que suas contrapartes alimentadas com alimento padrão. Com base neste aumento notável no peso corporal e adiposidade, é evidente que este modelo pode corresponder aos seres humanos que são caracterizados como obesos mórbidos. Portanto, descobriu-se que o tratamento com proteína de ActRIIB (R64 K74A 20- 134)-Fc humano reduz a adiposidade em camundongos obesos e pode ser clinicamente relevante para o tratamento de seres humanos morbidamente obesos.

Os resultados resumidos na Tabela 5 sugerem que o tratamento com a proteína de ActRIIB (K74A 20 a 134)-Fc murino é capaz de reduzir significativamente os níveis de insulina elevados no soro no período de jejum associados à obesidade. Esta descoberta sustenta a relevância clínica possível do uso de polipeptídeos de ActRIIB no tratamento de diabetes Tipo II.

Outros experimentos foram conduzidos com ActRIIB-mFc (R64 20 a 134) no modelo HFD de obesidade e diabetes. Camundongos C57BL/6 alimentados com HFD com 30 semanas de vida foram divididos em 2 grupos (PBS e ActRIIB-mFc (R64 20 a 134) 10 mg/kg). Os camundongos foram pesados e dosados duas vezes por semana intraperitonealmente durante 12 semanas. Os camundongos foram avaliados por RMN nos dias 0 e 94 do estudo.

Camundongos tratados perderam 1,9 % de seus pesos corporais no dia 0 do estudo enquanto os camundongos tratados com PBS ganharam 6,7 % de seus pesos corporais iniciais durante o estudo. Camundongos tratados também ganharam mais tecido magro do que o grupo PBS (21,1 % $\pm$ 6,28 versus 3,7 % $\pm$ 4,08) durante o estudo. Os camundongos tratados também perderam tecido adiposo significativa (-34 % $\pm$ 10,95) em comparação ao grupo PBS (+10,2 $\pm$ 10,18).

Pesos musculares individuais também foram aumentados no grupo tratado com ActRIIB-mFc (R64 20 a 134).

	Gastroc (L+R)	Femoral (L+R)	Peitoral (L+R)
PBS	0,33 $\pm$ 0,05	0,18 $\pm$ 0,03	0,31 $\pm$ 0,05
ActRIIB-mFc (R64 20 a 134)	0,44 $\pm$ 0,08*	0,25 $\pm$ 0,02*	0,44 $\pm$ 0,13*

Além dos efeitos benéficos na gordura e músculo que estão associados ao tratamento com ActRIIB-Fc nestes camundongos, efeitos positivos em lipídeos do soro foram observados. Níveis de colesterol e triglicerídeo no soro foram acentuadamente reduzidos, sugerindo que as proteínas de fusão de ActRIIB-Fc podem ser usadas para

5

Exemplo 9: O Efeito da Proteína de ActRIIB-Fc sobre a Massa Muscular em Camundongos Caquéticos.

Os requerentes testaram a capacidade de ActRIIB (R64 20 a 134)-mFc atenuar a perda muscular em um modelo camundongo de perda muscular induzida por

10

Camundongos foram subcutaneamente dosados diariamente durante 13 dias com PBS ou dexametasona (2 mg/kg) para induzir a perda muscular. Durante os mesmos 13 dias, grupos tratados com PBS e dexametasona receberam veículo ou ActRIIB (R64 20 a 134)-mFc (10 mg/kg; i.p.; duas vezes por semana) tal que todas as combinações dos

15

tratamentos foram representadas. Os camundongos foram mapeados por RMN nos dias 0 e 13 para determinar mudanças na massa tecidual magra entre os grupos. Os resultados da RMN são esboçados na Tabela 6 abaixo.

Tabela 6: Massa tecidual magra de camundongos tratados com veículo e ActRIIB (R64 20 a 134)-Fc murino

Grupo (tratamento sc:ip)	Média massa magra, dia 13- Média massa magra, dia 0 (g) ± desvio std
PBS:PBS	0,83 ± 0,94
Dexamet:PBS	0,47 ± 0,34 ^a
Dexamet:ActRIIB	2,56 ± 0,37 ^{a,b}
PBS:ActRIIB	3,63 ± 0,62 ^a
a Diferença significativa comparada a PBS:PBS a p < 0,05	
b Diferença significativa comparada a Dexamet:PBS a p < 0,05	

20

A varredura por RMN mostrou uma diminuição significativa de 2,5 % na massa tecidual magra no grupo dexametasona:PBS em comparação ao grupo PBS:PBS. Ao contrário, o grupo dexametasona:ActRIIB (R64 20 a 134)-mFc exibiu um aumento de 13,5 % na massa tecidual magra, um aumento significativo comparado aos grupos PBS:PBS e dexametasona:PBS. A caquexia é um efeito colateral indesejável para uma variedade de

25

tratamentos terapêuticos, incluindo terapia de glucocorticóide crônica. Portanto, pode ser de importância clínica que o tratamento com uma proteína de ActRIIB (R64 20 a 134)-mFc

humano possa atenuar a perda muscular associada à caquexia.

Exemplo 10: O Efeito de ActRIIB-Fc sobre a Massa Muscular e Obesidade em Camundongos Velhos ou Ovariectomizados

A sarcopenia é uma forma de perda muscular associada ao envelhecimento em seres humanos normalmente saudáveis. O distúrbio está associado a uma perda progressiva de massa muscular esquelética e força e mobilidade prejudicadas. As causas da sarcopenia são pouco entendidas. Nas mulheres, a menopausa acelera a perda muscular, tanto quanto a perda óssea. Consequentemente, ActRIIB (R64, 20 a 134)-mFc foi testado em camundongos extremamente velhos (dois anos de vida) e em camundongos ovariectomizados (um modelo do estado pós-menopausa).

Camundongos fêmeas C57BL/6 com 8 semanas de vida foram ovariectomizados (OVX) ou submetidos à cirurgia simulada (sham), depois envelhecidos durante 16 semanas antes do início do estudo. No início do estudo, camundongos sham e OVX foram divididos em grupos tratamento e veículo. Todos os grupos foram pesados e dosados semanalmente com ActRIIB (R64, 20 a 134)-mFc ou controle tampão durante 11 semanas. Todos os camundongos tiveram varreduras por RMN nos dias 0 e 83 do estudo para determinar a composição corporal.

No fim do estudo, camundongos PBS sham apresentaram perda de 4,7 % de sua massa magra original enquanto o grupo sham tratado aumentou sua massa magra em 21 % durante o curso do estudo. Controles OVX perderam 12,1 % (mais significativamente do que o veículo sham) de sua massa magra enquanto os camundongos OVX tratados ganharam 12,9 % até o fim do estudo.

Estes dados indicam que as proteínas de fusão de ActRIIB-Fc podem ser usadas para neutralizar a perda muscular que é comum nas mulheres em pós-menopausa.

Para avaliar os efeitos de ActRIIB-Fc em uma população naturalmente senescente, camundongos machos C57BL/6 foram envelhecidos a 70 semanas antes do início do tratamento. Os camundongos foram divididos em 2 grupos (PBS e ActRIIB (R64, 20 a 134)-mFc10 mg/kg). Cada grupo foi pesado e dosado duas vezes por semana durante 10 semanas. Durante o curso do estudo, os grupos tratados ganharam significativamente mais massa tecidual magra do que o grupo PBS.

% mudança de massa magra	PBS	10 mg/kg
Média (% a partir do valor de referência)	101,76	117,27
desvio Std	3,83	3,91
Valor p para PBS		< 0,001

O grupo tratado também apresentou pesos musculares individuais significativamente maiores em comparação aos camundongos PBS.

Pesos Musculares	Gastroc (L+R)	Femoral (L+R)	Peitoral (L+R)
PBS	0,283 ± 0,07	0,156 ± 0,01	0,241 ± 0,07
ActRIIB-mFc (R64 20 a 134)	0,371 ± 0,03*	0,192 ± 0,021 *	0,33 ± 0,05*
			* p < 0,05

A integridade muscular no grupo tratado também pareceu ser maior do que aquela do grupo PBS, conforme a gordura intramuscular foi aparentemente reduzida e a citoarquitetura aperfeiçoada. (Veja Figura 10).

Estes dados demonstram que as proteínas de fusão de ActRIIB-Fc podem ser usadas para tratar perda muscular associada ao envelhecimento em homens e mulheres.

Exemplo 11: O Efeito de ActRIIB-Fc sobre a Perda Muscular Associada à Castração

O câncer de próstata é comumente tratado com terapia antiandrogênica. Os efeitos colaterais do tratamento incluem perda muscular e obesidade aumentada. Camundongos castrados sofrem mudanças similares, tornando-os bons modelos para o estudo do potencial para ActRIIB-Fc a ser usado neste conjunto clínico.

Camundongos machos C57BL/6 com 8 semanas de vida foram castrados ou submetidos à cirurgia simulada (sham), depois deixados sob recuperação durante 3 semanas antes do início do estudo. Os grupos Sham e castrados foram ainda subdivididos em grupos PBS e ActRIIB (R64, 20 a 134)-mFc (10 mg/kg). Os camundongos foram pesados e subcutaneamente dosados uma vez por semana durante 12 semanas. Os camundongos foram mapeados por RMN nos dias 0 e 83 do estudo.

Durante o curso do estudo, camundongos PBS sham ganharam uma média de 9,72 % ± 3,67 e camundongos ActRIIB (R64, 20 a 134)-mFc sham ganharam 35,79 % ± 3,1 de massa tecidual magra no dia 0 do estudo. Os camundongos castrados tratados com PBS perderam 8,1 % ± 4,22 de sua massa tecidual magra no dia 0 enquanto os camundongos castrados tratados ganharam 17,77 % ± 3,86. Adicionalmente, a castração leva à adiposidade aumentada, porém o tratamento com ActRIIB (R64, 20 a 134)-mFc ajudou a reduzir a extensão do ganho de massa de gordura.

Os músculos gastroc e peitorais de camundongos veículo castrados apresentaram-se menores do que os camundongos PBS sham (gastroc castrado: 0,275 ± 0,03 g, peitoral castrado: 0,196 ± 0,06 g; gastroc sham: 0,313 ± 0,02 g, peitoral sham: 0,254 ± 0,03 g). O tratamento com ActRIIB (R64, 20 a 134)-mFc atenua significativamente esta diminuição induzida pela castração nos pesos musculares (gastroc castrado: 0,421 ± 0,03 g, peitoral castrado: 0,296 ± 0,06 g).

Exemplo 12: Efeitos de ActRIIB-Fc sobre a Caquexia do Câncer

Muitos tumores estão associados à perda de apetite e perda muscular severa. Os pacientes que exibem caquexia têm um prognóstico mais deficiente do que pacientes não caquéticos. A linhagem celular do câncer de cólon CT26 induz caquexia profunda nos camundongos. ActRIIB(R64 20 a 134) foi testado neste modelo quanto aos efeitos sobre a caquexia induzida por xenoenxerto.

Seis grupos de camundongos foram usados no experimento, conforme segue:

Grupo	Tumores	Tratamento	Dose	Paradigma
1	N	VEÍCULO	v/v	Terapêutico
2	N	ActRIIB-Fc	10 mg/kg	Terapêutico
3	Y	VEÍCULO	v/v	Terapêutico
4	Y	ActRIIB-Fc	10 mg/kg	Terapêutico
5	Y	ActRIIB-Fc	10 mg/kg	Terapêutico
6	Y	ActRIIB-Fc	30 mg/kg	Preventivo

Os grupos 3 a 6 receberam células de tumor 5×10^6 subcutaneamente. O grupo 6 iniciou o tratamento imediatamente com ActRIIB-Fc duas vezes por semana. Os grupos 1 a 5 iniciaram a dosagem no dia 28 do estudo quando os tumores atingiram um tamanho de 300 a 500 mm³. Conforme mostrado na Figura 11, ActRIIB-Fc diminuiu marcadamente a perda muscular associada aos tumores CT26, em camundongos com tumores estabelecidos e quando usado em um modelo preventivo antes da introdução do tumor.

Exemplo 13: O Efeito das Variantes de ActRIIB-Fc sobre a Massa Muscular em Camundongos do Tipo Selvagem.

Este estudo mostrou os efeitos dos constructos Fc relacionados a ActRIIB seguintes sobre a massa muscular e outros tecidos em camundongos machos C57BL/6 com 6 semanas de vida. Os camundongos foram pesados e injetados intraperitonealmente, duas vezes por semana com PBS ou constructos Fc relacionados a ActRIIB (10 mg/kg):

ActRIIB (R64 20 a 134)-Fc

ActRIIB (L79D 20 a 134)-Fc

ActRIIB (L79E 20 a 134)-Fc

ActRIIB (A24N 20 a 134)-Fc

ActRIIB (R64K 20 a 134)-Fc

Os camundongos foram mapeados por RMN no início, meio e fim do estudo. Os músculos femorais, peitorais e gastrocnêmicos e o fígado, rins, e baço foram pesados e conservados em formalina.

Uma análise inicial dos dados indica que ActRIIB (R64 20 a 134)-Fc causa um grande aumento na massa muscular e na massa corporal magra, enquanto também tem um grande efeito em outros tecidos. As variantes de L79D e L79E aumentam a massa muscular

em um grau inferior, enquanto têm pouco efeito em outros tecidos. Os constructos de A24N e R64K têm um efeito intermediário no músculo e outros tecidos. Estes dados confirmam que as variantes de ActRIIB com ligação de activina diminuída têm propriedades desejáveis, particularmente um efeito seletivo no tecido muscular.

5 INCORPORAÇÃO COMO REFERÊNCIA

Todas as publicações e patentes mencionadas neste relatório são incorporadas integralmente como referência como se cada publicação ou patente individual fosse específica e individualmente indicada para ser incorporada como referência.

10 Embora as modalidades específicas da matéria objeto sejam debatidas, o relatório descritivo acima é ilustrativo e não restritivo. Muitas variações tornar-se-ão evidentes àqueles habilitados na técnica sob a revisão deste relatório descritivo e das reivindicações abaixo. O escopo total da invenção deve ser determinado como referência às reivindicações, com seu escopo total de equivalentes, e o relatório descritivo, com tais variações.

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de ActRIIB variante, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80 % idêntica à sequência de aminoácidos 29 a 109 da SEQ ID NO: 2, e em que a proteína compreende pelo menos uma
5 sequência N-X-S/T em uma posição, a não ser uma sequência N-X-S/T endógena de ActRIIB, e em uma posição fora do sítio de ligação ao ligante.

2. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína compreende um N na posição correspondente à posição 24 da SEQ ID NO: 2 e um S ou T na posição correspondente à
10 posição 26 da SEQ ID NO: 2, e em que a proteína de ActRIIB variante inibe a sinalização por activina, miostatina e/ou GDF11 em um ensaio de base celular.

3. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína compreende um R ou K na posição correspondente à posição 64 da SEQ ID NO: 2.

4. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma alteração com respeito à sequência da SEQ ID NO: 2 é uma alteração conservativa posicionada dentro do sítio de ligação ao
15 ligante.

5. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma alteração com respeito à sequência da SEQ ID NO: 2 é uma alteração em uma ou mais posições selecionadas do grupo que
20 consiste de K74, R40, Q53, K55, F82 e L79.

6. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína compreende uma sequência de aminoácidos iniciando em um aminoácido correspondente a qualquer um dos aminoácidos 22 a 25 da
25 SEQ ID NO: 2 e terminando em um aminoácido correspondente a qualquer um dos aminoácidos 129 a 134 da SEQ ID NO: 2.

7. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6 ou 121, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína é uma proteína de fusão
30 compreendendo ainda uma porção heteróloga.

8. Proteína de fusão de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína é um homodímero.

9. Variante da proteína de fusão de ActRIIB, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a porção heteróloga compreende uma região constante
35 de uma cadeia pesada de IgG.

10. Proteína de ActRIIB variante, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80 % idêntica à sequência de

aminoácidos 29 a 109 da SEQ ID NO: 2, e em que a proteína compreende um aminoácido ácido na posição correspondente à posição 79 da SEQ ID NO: 2, e em que a proteína de ActRIIB variante inibe a sinalização por miostatina e/ou GDF11 em um ensaio de base celular.

- 5 11. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína compreende pelo menos uma sequência N-X-S/T em uma posição, a não ser uma sequência N-X-S/T endógena de ActRIIB, e em uma posição fora do sítio de ligação ao ligante.
- 10 12. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína compreende um N na posição correspondente à posição 24 da SEQ ID NO: 2 e um S ou T na posição correspondente à posição 26 da SEQ ID NO: 2.
- 15 13. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína compreende um R ou K na posição correspondente à posição 64 da SEQ ID NO: 2.
- 20 14. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma alteração com respeito à sequência da SEQ ID NO: 2 é uma alteração conservativa posicionada dentro do sítio de ligação ao ligante.
- 25 15. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma alteração com respeito à sequência da SEQ ID NO: 2 é uma alteração em uma ou mais posições selecionadas do grupo que consiste de K74, R40, Q53, K55, e F82.
- 30 16. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 10 ou 122, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína compreende uma sequência de aminoácidos iniciando em um aminoácido correspondente a qualquer um dos aminoácidos 22 a 25 da SEQ ID NO: 2 e terminando em um aminoácido correspondente a qualquer um dos aminoácidos 129 a 134 da SEQ ID NO: 2.
- 35 17. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 10 a 16, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína é uma proteína de fusão compreendendo ainda uma porção heteróloga.
18. Proteína de fusão de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína é um homodímero.
19. Variante da proteína de fusão de ActRIIB, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a porção heteróloga compreende uma região constante de uma cadeia pesada de IgG.
20. Proteína de ActRIIB variante, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende

uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80 % idêntica à sequência de aminoácidos 29 a 109 da SEQ ID NO: 2, e em que a proteína compreende pelo menos uma sequência N-X-S/T em uma posição, a não ser uma sequência N-X-S/T endógena de ActRIIB, e em uma posição fora do sítio de ligação ao ligante.

5 21. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína compreende um N na posição correspondente à posição 24 da SEQ ID NO: 2 e um S ou T na posição correspondente à posição 26 da SEQ ID NO: 2, e em que a proteína de ActRIIB variante inibe a sinalização por activina, miostatina e/ou GDF11 em um ensaio de base celular.

10 22. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 21, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína compreende um R ou K na posição correspondente à posição 64 da SEQ ID NO: 2.

 23. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 21, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma alteração com respeito à sequência da SEQ ID NO: 2 é uma alteração conservativa posicionada dentro do sítio de ligação ao ligante.

 24. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 21, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma alteração com respeito à sequência da SEQ ID NO: 2 é uma alteração em uma ou mais posições selecionadas do grupo que consiste de K74, R40, Q53, K55, F82 e L79.

 25. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 21, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína compreende uma sequência de aminoácidos iniciando em um aminoácido correspondente a qualquer um dos aminoácidos 22 a 24 da SEQ ID NO: 2 e terminando em um aminoácido correspondente a qualquer um dos aminoácidos 133 ou 134 da SEQ ID NO: 2.

 26. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 20 a 25, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína é uma proteína de fusão compreendendo ainda uma porção heteróloga.

 27. Proteína de fusão de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 26, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína é um homodímero.

 28. Variante da proteína de fusão de ActRIIB, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a porção heteróloga compreende uma região constante de uma cadeia pesada de IgG.

 29. Proteína de fusão de ActRIIB, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende uma porção derivada da sequência de ActRIIB da SEQ ID NO: 2 e uma segunda porção polipeptídica, em que a porção derivada da SEQ ID NO: 2 corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 22 a 25 da SEQ ID NO: 2 e terminado em

qualquer um dos aminoácidos 129 a 134 da SEQ ID NO: 2, e em que a porção derivada da sequência de ActRIIB difere em não mais do que cinco posições de aminoácidos adicionais a partir da sequência da SEQ ID NO: 2, e em que a proteína de ActRIIB inibe a sinalização por miostatina e/ou GDF11 em um ensaio de base celular.

5 30. Proteína de fusão de ActRIIB, de acordo com a reivindicação 29, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína compreende pelo menos uma sequência N-X-S/T em uma posição, a não ser uma sequência N-X-S/T endógena de ActRIIB, e em uma posição fora do sítio de ligação ao ligante.

10 31. Proteína de fusão de ActRIIB, de acordo com a reivindicação 30, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína compreende um N na posição correspondente à posição 24 da SEQ ID NO: 2 e um S ou T na posição correspondente à posição 26 da SEQ ID NO: 2.

15 32. Proteína de fusão de ActRIIB, de acordo com a reivindicação 29, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína compreende um R ou K na posição correspondente à posição 64 da SEQ ID NO: 2.

 33. Proteína de fusão de ActRIIB, de acordo com a reivindicação 29, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma alteração com respeito à sequência da SEQ ID NO: 2 é uma alteração conservativa posicionada dentro do sítio de ligação ao ligante.

20 34. Proteína de fusão de ActRIIB, de acordo com a reivindicação 29, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma alteração com respeito à sequência da SEQ ID NO: 2 é uma alteração em uma ou mais posições selecionadas do grupo que consiste de K74, R40, Q53, K55, F82 e L79.

25 35. Proteína de fusão de ActRIIB, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 29 a 34, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a segunda porção é heteróloga à porção derivada da ActRIIB.

 36. Proteína de fusão de ActRIIB, de acordo com a reivindicação 35, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína é um homodímero.

30 37. Proteína de fusão de ActRIIB, de acordo com a reivindicação 35, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a segunda porção compreende uma região constante de uma cadeia pesada de IgG.

35 38. Proteína de fusão de ActRIIB variante, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende uma porção derivada da sequência de ActRIIB da SEQ ID NO: 2 e uma segunda porção polipeptídica, em que a porção derivada da SEQ ID NO: 2 corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 20 a 29 da SEQ ID NO: 2 e terminado em qualquer um dos aminoácidos 109 a 134 da SEQ ID NO: 2, e em que a proteína de fusão de ActRIIB tem uma arginina (R), lisina (K) ou histidina (H) na posição 64

da SEQ ID NO: 2 e inibe a sinalização por activina, miostatina e/ou GDF11 em um ensaio de base celular.

39. Proteína de fusão de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 38, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a porção derivada da SEQ ID NO: 2 corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 21 a 29 da SEQ ID NO: 2 e terminado em qualquer um dos aminoácidos 118 a 134 da SEQ ID NO: 4.

40. Proteína de fusão de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 38, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a porção derivada da SEQ ID NO: 2 corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 21 a 29 da SEQ ID NO: 2 e terminado em qualquer um dos aminoácidos 128 a 134 da SEQ ID NO: 2.

41. Proteína de fusão de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 38, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a porção derivada da SEQ ID NO: 2 corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 21 a 24 da SEQ ID NO: 2 e terminado em qualquer um dos aminoácidos 109 a 134 da SEQ ID NO: 2.

42. Proteína de fusão de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 38, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a porção derivada da SEQ ID NO: 2 corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 21 a 24 da SEQ ID NO: 2 e terminado em qualquer um dos aminoácidos 118 a 134 da SEQ ID NO: 2.

43. Proteína de fusão de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 38, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a porção derivada da SEQ ID NO: 2 corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 21 a 25 da SEQ ID NO: 2 e terminado em qualquer um dos aminoácidos 128 a 134 da SEQ ID NO: 2.

44. Proteína de fusão de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 38, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende ainda uma ou mais modificações em relação à sequência da SEQ ID NO: 2 que conferem uma propriedade selecionada do grupo que consiste de: (a) uma inibição maior da sinalização de GDF11 ou GDF8 em relação à inibição da sinalização de activina; (b) uma meia vida do soro aumentada; e (c) tanto (a) quanto (b).

45. Proteína de fusão de ActRIIB variante, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende uma porção derivada da sequência de ActRIIB da SEQ ID NO: 2 e uma segunda porção polipeptídica, em que a porção derivada da SEQ ID NO: 2 corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 20 a 29 da SEQ ID NO: 2 e terminado em qualquer um dos aminoácidos 109 a 133 da SEQ ID NO: 2, e em que a proteína de fusão de ActRIIB tem uma arginina (R), lisina (K) ou histidina (H) na posição 64 da SEQ ID NO: 2 e inibe a sinalização por activina, miostatina e/ou GDF11 em um ensaio de base celular.

46. Proteína de fusão de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 45,

CARACTERIZADA pelo fato de que a porção derivada da SEQ ID NO: 2 corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 20 a 29 da SEQ ID NO: 2 e terminado em qualquer um dos aminoácidos 118 a 133 da SEQ ID NO: 2.

47. Proteína de fusão de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 45,
5 **CARACTERIZADA** pelo fato de que a porção derivada da SEQ ID NO: 2 corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 20 a 29 da SEQ ID NO: 2 e terminado em qualquer um dos aminoácidos 128 a 133 da SEQ ID NO: 2.

48. Proteína de fusão de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 45,
10 **CARACTERIZADA** pelo fato de que a porção derivada da SEQ ID NO: 2 corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 20 a 24 da SEQ ID NO: 2 e terminado em qualquer um dos aminoácidos 109 a 133 da SEQ ID NO: 2.

49. Proteína de fusão de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 45,
15 **CARACTERIZADA** pelo fato de que a porção derivada da SEQ ID NO: 2 corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 20 a 24 da SEQ ID NO: 2 e terminado em qualquer um dos aminoácidos 118 a 133 da SEQ ID NO: 2.

50. Proteína de fusão de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 45,
CARACTERIZADA pelo fato de que a porção derivada da SEQ ID NO: 2 corresponde a uma sequência iniciando em qualquer um dos aminoácidos 20 a 24 da SEQ ID NO: 2 e terminado em qualquer um dos aminoácidos 128 a 133 da SEQ ID NO: 2.

20 51. Proteína de fusão de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 45,
CARACTERIZADA pelo fato de que compreende ainda uma ou mais modificações em relação à sequência da SEQ ID NO: 2 que conferem uma propriedade selecionada do grupo que consiste de: (a) uma inibição maior da sinalização de GDF11 ou GDF8 em relação à inibição da sinalização de activina; (b) uma meia vida do soro aumentada; e (c) tanto (a)
25 quanto (b).

52. Proteína de fusão de ActRIIB variante, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 38 a 51, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína é um homodímero.

30 53. Proteína de fusão de ActRIIB variante, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 38 a 51, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a segunda porção polipeptídica compreende uma região constante de uma cadeia pesada de IgG.

54. Proteína de fusão de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 53, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a segunda porção polipeptídica é um domínio Fc.

35 55. Proteína de ActRIIB variante, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80 % idêntica, porém não 100 % idêntica à sequência de aminoácidos 29 a 109 da SEQ ID NO: 2, em que a posição correspondente a 64 da SEQ ID NO: 2 é um K, e em que a proteína de ActRIIB variante inibe a sinalização

por activina, miostatina e/ou GDF11 em um ensaio de base celular.

56. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 55, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma alteração com respeito à sequência da SEQ ID NO: 2 está posicionada fora do sítio de ligação ao ligante.

5 57. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 55, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma alteração com respeito à sequência da SEQ ID NO: 2 é uma alteração conservativa posicionada dentro do sítio de ligação ao ligante.

10 58. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 55, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos uma alteração com respeito à sequência da SEQ ID NO: 2 é uma alteração em uma ou mais posições selecionadas do grupo que consiste de K74, R40, Q53, K55, F82 e L79.

15 59. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 55, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína compreende pelo menos uma sequência N-X-S/T em uma posição, a não ser uma sequência N-X-S/T endógena da SEQ ID NO: 2, e em uma posição fora do sítio de ligação ao ligante.

20 60. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 55, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína compreende uma ou mais modificações em relação à sequência da SEQ ID NO: 2 que conferem uma propriedade selecionada do grupo que consiste de: (a) uma inibição maior da sinalização de GDF11 ou GDF8 em relação à inibição da sinalização de activina; (b) uma meia vida do soro aumentada; e (c) tanto (a) quanto (b).

25 61. Preparação farmacêutica, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende a proteína de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 60.

62. Método para tratar um paciente tendo um distúrbio associado à perda muscular ou crescimento insuficiente do músculo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar ao paciente uma quantidade eficaz de uma preparação farmacêutica de acordo com a reivindicação 61.

30 63. Método, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente tem atrofia muscular.

64. Método, de acordo com a reivindicação 62, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente tem uma distrofia muscular.

65. Método, de acordo com a reivindicação 64, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a distrofia muscular é Distrofia Muscular de Duchenne.

35 66. Método, de acordo com a reivindicação 64, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente é um jovem e o tratamento inicia dentro de um a cinco anos da data do diagnóstico com Distrofia Muscular de Duchenne.

67. Método, de acordo com a reivindicação 62, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a distrofia muscular é distrofia muscular FSH.

68. Método, de acordo com a reivindicação 62, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente tem ALS.

5 69. Método, de acordo com a reivindicação 68, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente recebe tratamento depois do diagnóstico com ALS.

70. Método, de acordo com a reivindicação 62, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o distúrbio é caquexia associada ao câncer ou terapia de câncer.

10 71. Método, de acordo com a reivindicação 70, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o distúrbio é perda muscular associada à terapia de câncer de próstata.

72. Método, de acordo com a reivindicação 70, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o distúrbio é perda muscular associada a um tumor.

73. Método, de acordo com a reivindicação 72, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um tumor de câncer de cólon.

15 74. Método para tratar um paciente tendo um distúrbio associado à neurodegeneração, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar ao paciente uma quantidade eficaz de uma preparação farmacêutica de acordo com a reivindicação 61.

20 75. Método, de acordo com a reivindicação 74, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o distúrbio é Esclerose Lateral Amiotrófica.

76. Método para diminuir o teor de gordura corporal ou reduzir a taxa de aumento no teor de gordura corporal em um paciente, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar a um paciente uma quantidade eficaz de uma preparação farmacêutica de acordo com a reivindicação 61.

25 77. Método para tratar um distúrbio associado ao ganho de peso corporal indesejável em um paciente, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar a um paciente uma quantidade eficaz de uma preparação farmacêutica de acordo com a reivindicação 61.

30 78. Método, de acordo com a reivindicação 77, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o dito distúrbio é selecionado do grupo que consiste de obesidade, obesidade severa ou mórbida, diabetes melitus não insulino-dependente (NIDDM), doença cardiovascular, câncer, hipertensão, osteoartrite, acidente vascular cerebral, problemas respiratórios, e doença da vesícula biliar.

35 79. Método para reduzir colesterol e/ou triglicerídeos, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar a um paciente uma quantidade eficaz de uma preparação farmacêutica de acordo com a reivindicação 61.

80. Método para tratar sarcopenia, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que

compreende administrar a um paciente uma quantidade eficaz de uma preparação farmacêutica de acordo com a reivindicação 61.

81. Proteína de ActRIIB-Fc, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 5.

5 82. Proteína de ActRIIB-Fc, de acordo com a reivindicação 81, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína tem um N na posição correspondente à posição 5 da SEQ ID NO: 5.

10 83. Proteína de ActRIIB-Fc, de acordo com a reivindicação 81, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína tem um D ou um E na posição correspondente à posição 60 da SEQ ID NO: 5.

84. Proteína de ActRIIB-Fc, de acordo com a reivindicação 82, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína tem um D ou um E na posição correspondente à posição 60 da SEQ ID NO: 5.

15 85. Proteína de ActRIIB-Fc, de acordo com a reivindicação 81, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína é um dímero.

86. Proteína de ActRIIB-Fc, de acordo com a reivindicação 82, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína é um dímero.

87. Proteína de ActRIIB-Fc, de acordo com a reivindicação 83, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína é um dímero.

20 88. Proteína de ActRIIB-Fc, de acordo com a reivindicação 84, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína é um dímero.

89. Preparação farmacêutica, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende as proteínas de acordo com qualquer uma das reivindicações de 81 a 88.

25 90. Método para tratar um paciente tendo um distúrbio associado à perda muscular ou crescimento insuficiente do músculo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar ao paciente uma quantidade eficaz de uma preparação farmacêutica de acordo com a reivindicação 89.

91. Método, de acordo com a reivindicação 90, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente tem atrofia muscular.

30 92. Método, de acordo com a reivindicação 90, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente tem uma distrofia muscular.

93. Método, de acordo com a reivindicação 92, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a distrofia muscular é Distrofia Muscular de Duchenne.

35 94. Método, de acordo com a reivindicação 93, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente é um jovem e o tratamento inicia dentro de um a cinco anos da data do diagnóstico com Distrofia Muscular de Duchenne.

95. Método, de acordo com a reivindicação 92, **CARACTERIZADO** pelo fato de que

a distrofia muscular é distrofia muscular FSH.

96. Método, de acordo com a reivindicação 90, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente tem ALS.

5 97. Método, de acordo com a reivindicação 96, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente recebe tratamento depois do diagnóstico com ALS.

98. Método, de acordo com a reivindicação 90, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o distúrbio é caquexia associada ao câncer ou terapia de câncer.

99. Método, de acordo com a reivindicação 98, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o distúrbio é perda muscular associada à terapia de câncer de próstata.

10 100. Método, de acordo com a reivindicação 98, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o distúrbio é perda muscular associada a um tumor.

101. Método, de acordo com a reivindicação 100, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um tumor de câncer de cólon.

15 102. Método para tratar um paciente tendo um distúrbio associado à neurodegeneração, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar ao paciente uma quantidade eficaz de uma preparação farmacêutica de acordo com a reivindicação 89.

103. Método, de acordo com a reivindicação 102, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o distúrbio é Esclerose Lateral Amiotrófica.

20 104. Método para diminuir o teor de gordura corporal ou reduzir a taxa de aumento no teor de gordura corporal em um paciente, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar a um paciente uma quantidade eficaz de uma preparação farmacêutica de acordo com a reivindicação 89.

25 105. Método para tratar um distúrbio associado ao ganho de peso corporal indesejável em um paciente, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar a um paciente uma quantidade eficaz de uma preparação farmacêutica de acordo com a reivindicação 104.

30 106. Método, de acordo com a reivindicação 105, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o dito distúrbio é selecionado do grupo que consiste de obesidade, obesidade severa ou mórbida, diabetes melitus não insulino-dependente (NIDDM), doença cardiovascular, câncer, hipertensão, osteoartrite, acidente vascular cerebral, problemas respiratórios, e doença da vesícula biliar.

35 107. Método para reduzir colesterol e/ou triglicerídeos, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar a um paciente uma quantidade eficaz de uma preparação farmacêutica de acordo com a reivindicação 89.

108. Método para tratar sarcopenia, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar a um paciente uma quantidade eficaz de uma preparação

farmacêutica de acordo com a reivindicação 107.

109. Uso de uma preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 61 ou 89, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio associado à perda muscular ou crescimento insuficiente do músculo.

110. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 61 ou 89, **CARACTERIZADA** pelo fato de que é para o uso no tratamento de um distúrbio associado à perda muscular ou crescimento insuficiente do músculo.

111. Uso de uma preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 61 ou 89, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio associado à neurodegeneração.

112. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 61 ou 89, **CARACTERIZADA** pelo fato de que é para o uso no tratamento de um distúrbio associado à neurodegeneração.

113. Uso de uma preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 61 ou 89, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para diminuir o teor de gordura corporal ou reduzir a taxa de aumento no teor de gordura corporal em um paciente.

114. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 61 ou 89, **CARACTERIZADA** pelo fato de que é para o uso na diminuição do teor de gordura corporal ou redução da taxa de aumento no teor de gordura corporal em um paciente.

115. Uso de uma preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 61 ou 89, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio associado ao ganho de peso corporal indesejável em um paciente.

116. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 61 ou 89, **CARACTERIZADA** pelo fato de que é para o uso no tratamento de um distúrbio associado ao ganho de peso corporal indesejável em um paciente.

117. Uso de uma preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 61 ou 89, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para reduzir colesterol e/ou triglicerídeos.

118. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 61 ou 89, **CARACTERIZADA** pelo fato de que é para o uso na redução de colesterol e/ou triglicerídeos.

119. Uso de uma preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 61 ou 89, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para o tratamento de sarcopenia.

120. Preparação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 61 ou 89, **CARACTERIZADA** pelo fato de que é para o uso no tratamento de sarcopenia.

5 121. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína de ActRIIB variante compreende uma sequência de aminoácidos correspondente à sequência de aminoácidos 25 a 131 da SEQ ID NO: 2.

122. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o aminoácido ácido na posição 79 da SEQ ID NO: 2 é um D.

10 123. Proteína de ActRIIB variante, de acordo com a reivindicação 16, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína de ActRIIB variante compreende uma sequência de aminoácidos correspondente à sequência de aminoácidos 25 a 131 da SEQ ID NO: 2.

Sequência de polipeptídeo de ActRIIB solúvel humano (extracelular) designada como SEQ ID NO: 1 (116 aa).

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
GC

WLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT

Figura 1

Sequência precursora de ActRIIB humano designada como SEQ ID NO: 2 (NM-
_001106, 512 aa).

MTAPWVALALLWGSLWPG**SGRGEAETRECIYYNANWELERTIN****Q****SGLERCEGEQDKRL**
HC

YASWRN**S****SGTIELVKKG****CWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHL**
PE

AGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLP**IGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHED**
PG

PPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIF
ST

PGMKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGNIITWNELCHVAET
MS

RGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGGLAVRFEPGKPP
GD

THGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVDEYM
LP

FEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIKDHWLKHPLAQLCVTIEECWDHDAEARLS
AG

CVEERVSLIRRSVNGTTSDCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI

Figura 2

Sequência de ácido nucléico codificando um polipeptídeo de ActRIIB solúvel humano (extracelular), designada como SEQ ID NO: 3 (348 bp).

```
tctgggcgtggggaggctgagacacgggagtgcatctactacaacgccaaactgggagctggagcgcacc  
aaccagagcggcctggagcgtgcgaaggcgagcaggacaagcggctgcactgctacgcctcctggcgc  
aacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaagggtgctggctagatgacttcaactgctacgatagg  
caggagtgtgtggccactgaggagaacccccaggtgtacttctgctgctgtgaaggcaacttctgcaac  
gagcgcttcactcatttgccagaggctggggggcccggaagtcacgtacgagccacccccgacagcccc  
acc
```

Figura 3

Sequência de ácido nucléico codificando uma proteína precursora de ActRIIB humano, designada como SEQ ID NO: 4 (nucleotídeos 5 a 1543 de NM_001106, 1539 bp)

```
atgacggcgccctgggtggccctcgccctcctctggggatcgctgtggcccggtctctgggcgtggggag
gctgagacacgggagtgcatctactacaacgccaaactgggagctggagcgcaccaaccagagcggcctg
gagcgtcggaaggcgagcaggacaagcggctgcactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcacc
atcgagctcgtgaagaagggtgctggctagatgacttcaactgctacgataggcaggagtgtgtggcc
actgaggagaacccccaggtgtacttctgctgctgtgaaggcaacttctgcaacgagcgttcactcat
ttgccagaggctggggggcccggaagtcaagtagagccacccccgacagccccaccctgctcacgggtg
ctggcctactcactgctgcccacggtggcctttccctcatcgctcctgctggccttttggtgtaccgg
catcgcaagccccctacgggtcatgtggacatccatgaggacctgggcctccaccaccatcccctctg
gtgggcctgaagccactgcagctgctggagatcaaggctcgggggcgctttggctgtgtctggaaggcc
cagctcatgaatgactttgtagctgtcaagatcttccactccaggacaagcagtcgtggcagagtga
cgggagatcttcagcacacctggcatgaagcagagaacctgctacagttcattgctgccgagaagcga
ggctccaacctcgaagtagagctgtggctcatcacggccttccatgacaagggtccctcacggattac
ctcaaggggaacatcatcacatggaacgaactgtgtcatgtagcagagacgatgtcacgaggcctctca
tacctgcatgaggatgtgccctgggtgccgtggcgagggccacaagccgtctattgcccacagggacttt
aaaagtaagaatgtattgctgaagagcgacctcacagccgtgctggctgactttggcttggtgttcga
tttgagccagggaaacctccaggggacacccacggacaggtaggcacgagacgggtacatggctcctgag
gtgctcgagggagccatcaacttccagagagatgccttcctgcgcattgacatgtatgccatgggggtg
gtgctgtgggagcttgtgtctcgctgcaaggctgcagacggaccttggtgagtagtacatgctgcccttt
gaggaagagattggccagcaccccttcgttggaggagctgcaggaggtggtggtgcacaagaagatgagg
cccaccattaaagatcactggttgaaacacccgggcctggcccagctttgtgtgaccatcgaggagtgc
tgggaccatgatgcagaggctcgcttgtccgcgggctgtgtggaggagcgggtgtccctgattcggagg
tcggtcaacggcactacctcggaactgtctcggtttccctgggtgacctctgtcaccaatgtggacctgcc
cctaaagagtcaagcatctaa
```

Figura 4

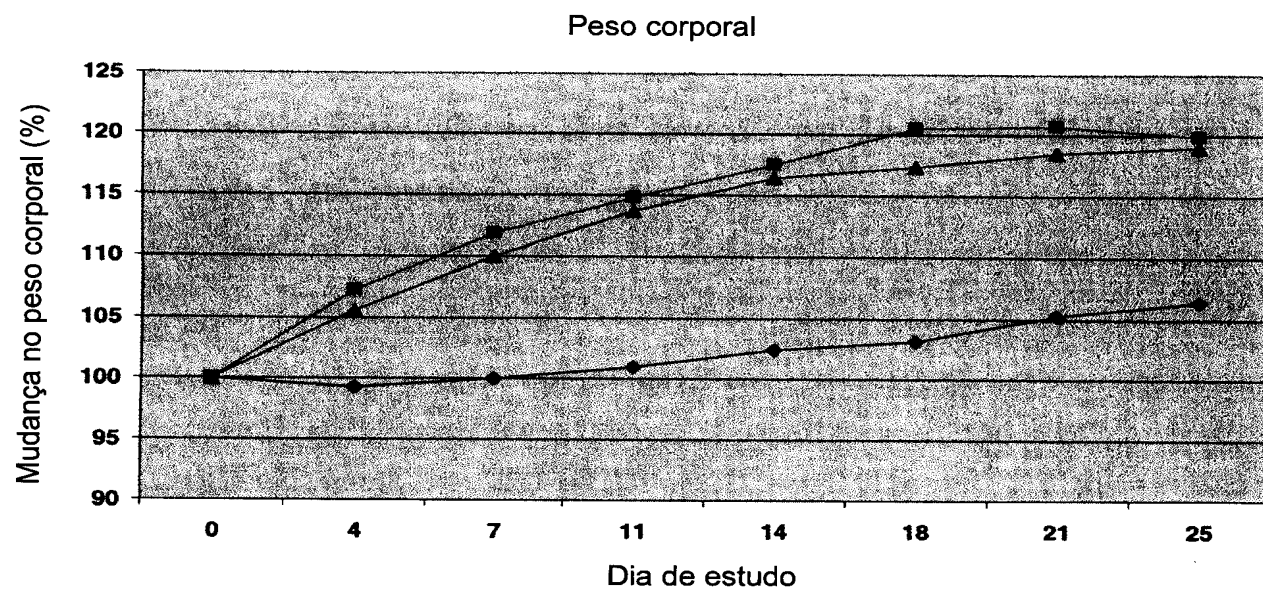


Figura 5

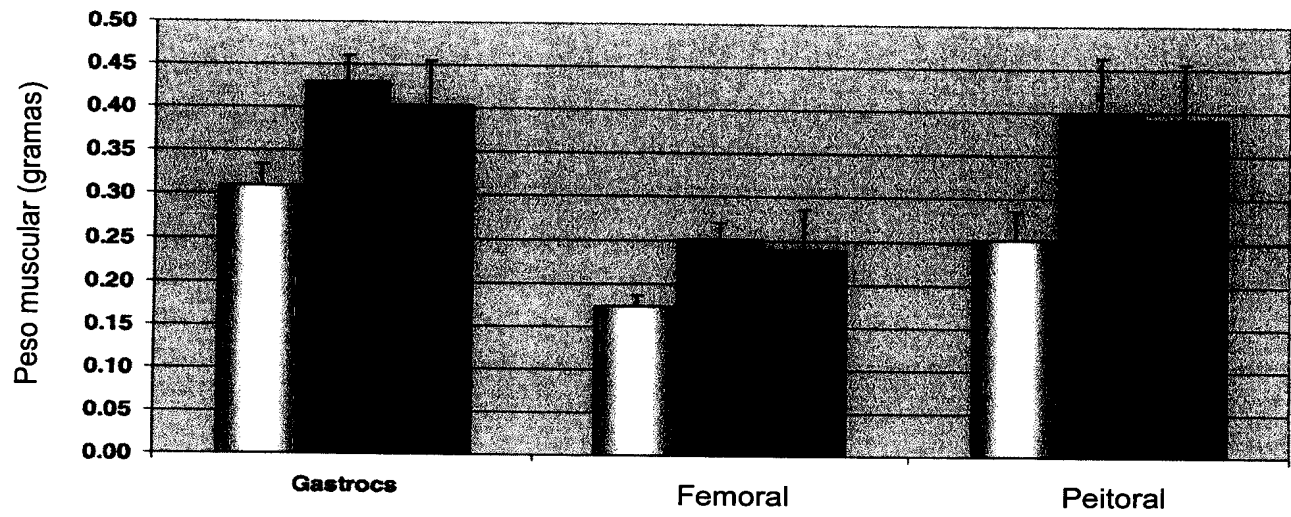


Figura 6

Média de força e preensão - Fêmeas

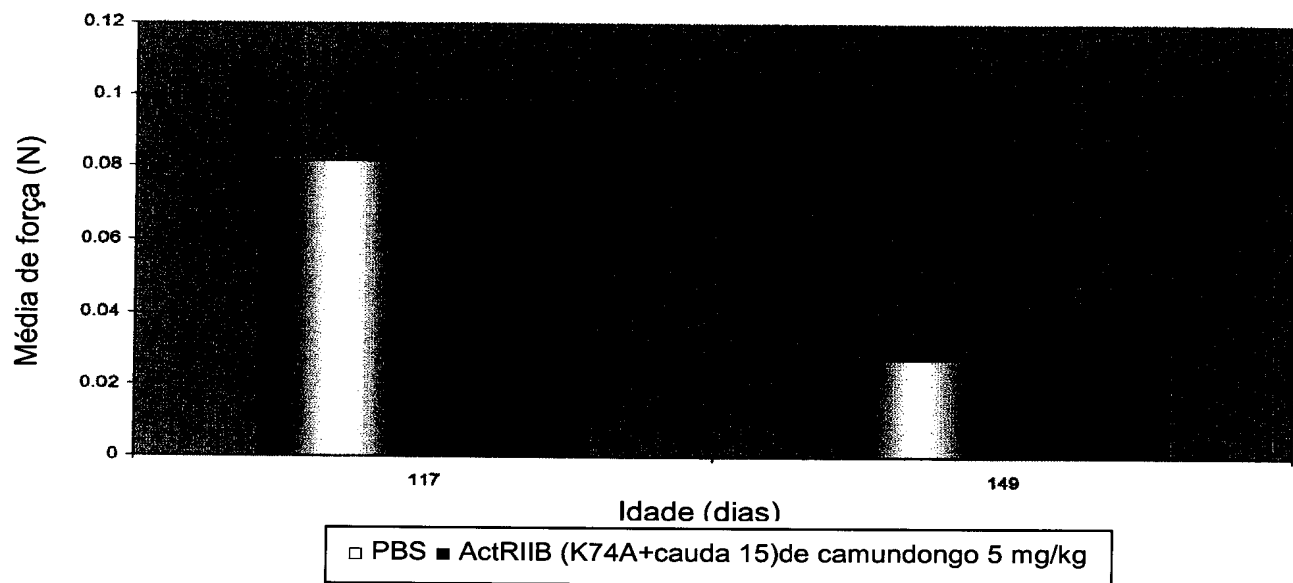


Figura 7

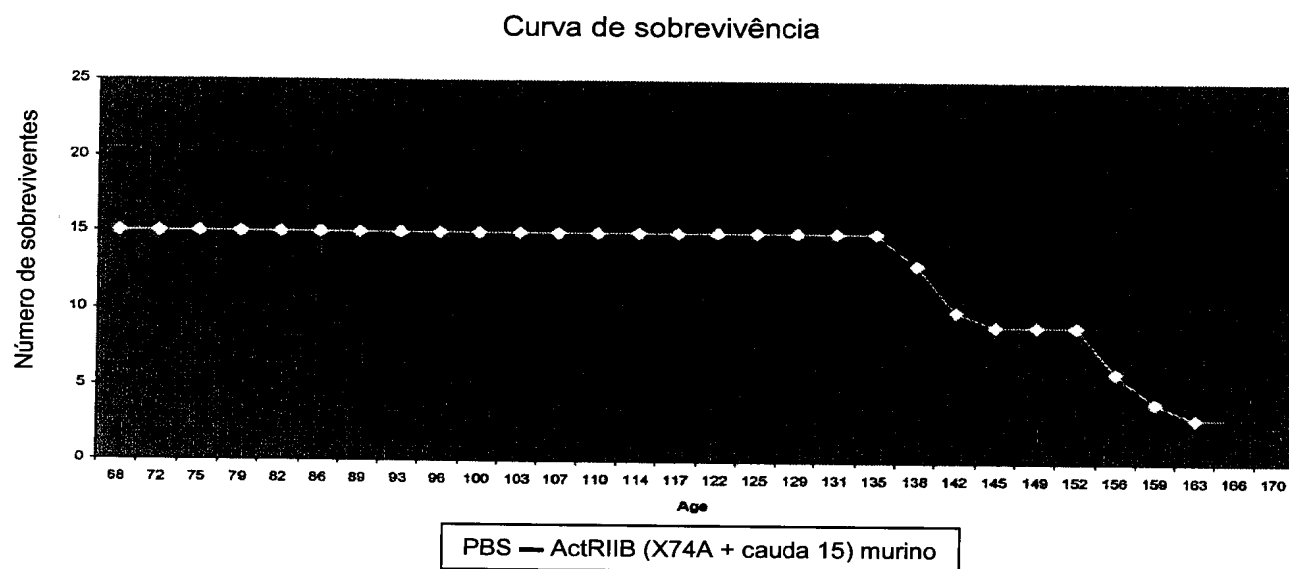


Figura 8

Porcentagem de composição corporal de valor
de referência – alimentados com HFD

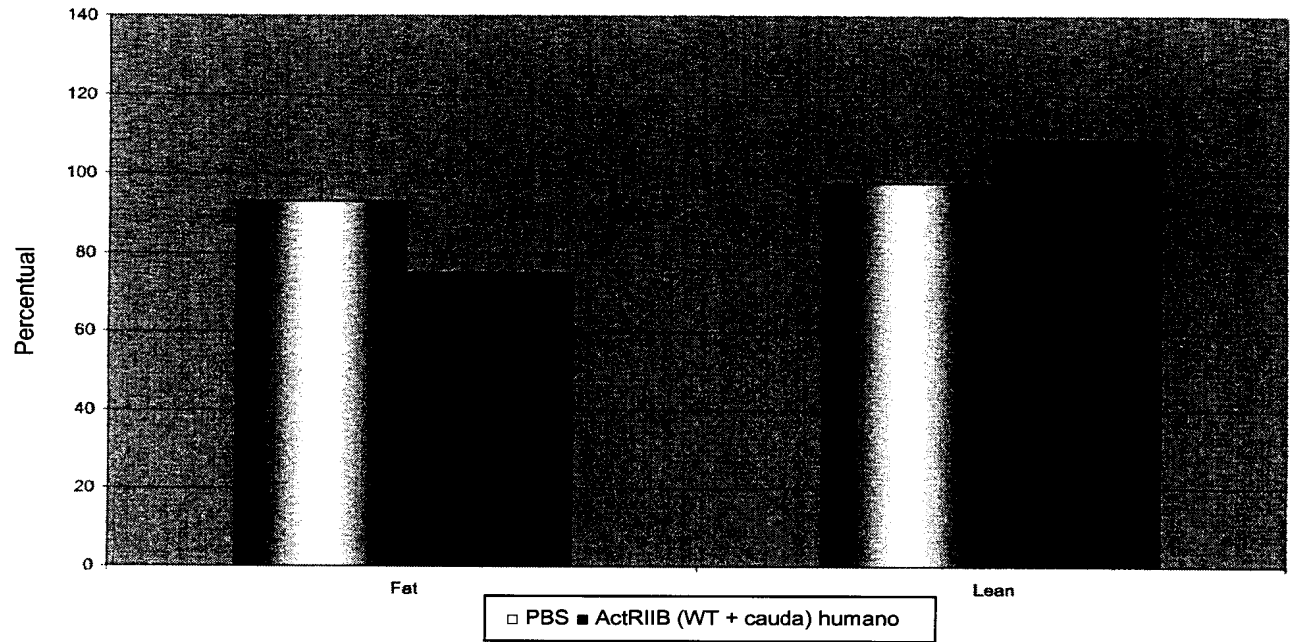


Figura 9

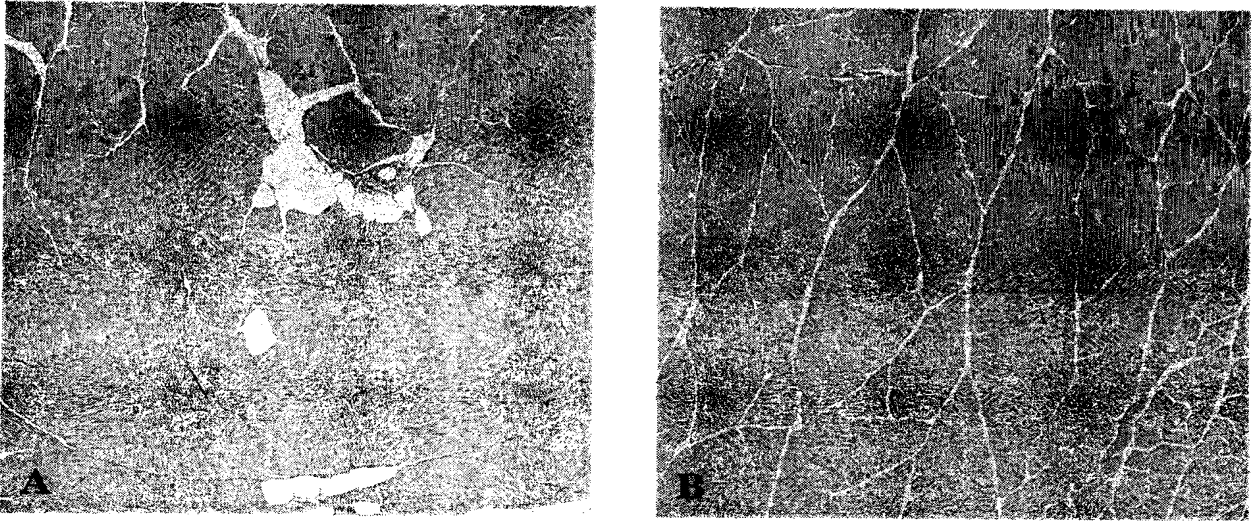


Figura 10

Média de pesos corporais – CT26 implantadas em camundongos machos BALB/c

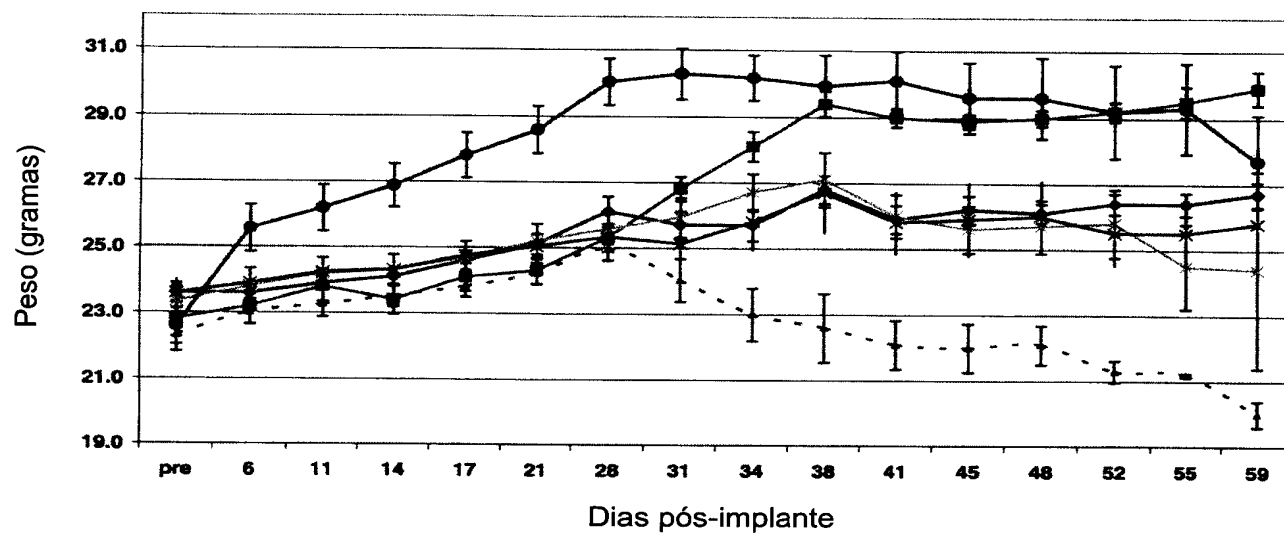


Figura 11

ActRIIa	ILGRSETQEC	ILFFNANWEKD	RTNQTGV	YGD	FATWKNISGS
ActRIIb	GRGEAETREC	IYYNANWELE	RTNQSGLERC	EGEQDKRLHC	YASWRNSSGT
	IEIVKQGCWL	DDINCYDRTD	CVEKKDSPEV	YFCCCEGNMC	NEKFSYFP
	IELVRKGCWL	DDFNCDRQE	CVATEENPQV	YFCCCEGNFC	NERFTHLPEA
	EVTQPTSNPV	TPKPPT			
	GGPEVTYEPP	PTAPT			

Figura 12

Rato IIb	M	A	AA-LALL	G	LCAG	A	G	A	CI	A	L	GL	-C	C
Porco IIb	M	A	AA-LALL	G	LCVQ	G	G	A	CI	A	L	GL	-C	C
Camundongo IIb	M	A	AA-LALL	G	LCAG	C	G	A	CI	A	L	GL	-C	C
Humano IIb	M	A	VA-LALL	G	LCAG	A	G	A	CI	A	L	GL	-C	C
Bovino IIb	M	A	AA-LALL	G	LCAG	A	G	A	CI	A	L	GL	-C	C
Xenopus IIb	MG	A	VAL	LLLLA		AG	D	V	CI	A	L	GL	-C	C
Humano IIA	MG	AAA	LA	AV	LI	C	CA	LLA	CL	A	L	GL	-C	C
Consenso	M	A	AA	LI	LI	A	IC	AG	A	A	I	CI	LC	C

Rat IIb	L	C	A		G	I	LV	GC	L	C		AVA	V	CCG	G	C
Pig IIb	L	C	A		G	I	LV	GC	L	C		AVA	V	CCG	G	C
Mouse IIb	L	C	A		G	I	LV	GC	L	C		AVA	V	CCG	G	C
Humano IIb	L	C	A		G	I	LV	GC	L	C		AVA	V	CCG	G	C
Bovino IIb	L	C	A		G	I	LV	GC	L	C		AVA	V	CCG	G	C
Xenopus IIb	L	C	A		G	I	LV	GC	L	C		IA	V	CCG	G	C
Humano IIA	L	C	A		I	G	I	IV	GC	L	I	C	V	CCG	G	LC
Consensus	I	C	A		G	I	IV	GC	L	C		AVA	V	CCG	G	C

Rat IIb	L		GG	V			A	LL	VLA	LL	IGGL	-
Pig IIb	L		AGG	V			A	LL	VLA	LL	IGGL	-
Mouse IIb	L		GG	V			A	LL	VLA	LL	IGGL	-
Humano IIb	L		AGG	V			A	LL	VLA	LL	IGGL	-
Bovino IIb	L		AGG	V			A	LL	VLA	LL	IGGL	-
Xenopus IIb	L		V	-	-	-	A	VL	ILI	LL	IVGL	M
Humano IIA			M	V		-V		ILL	LV	LM	LI	-
Consensus	I	X	GG	V			A	II	VLA	LI	IGGI	M

Figura 13

RESUMO

“VARIANTES DERIVADAS DE ACTRIIB E SEUS USOS”

5 Em certos aspectos, a presente invenção fornece composições e métodos para modular (promover ou inibir) o crescimento de um tecido, tal como ossos, cartilagens, músculos, gorduras, e/ou tecido neuronal. A presente invenção também fornece métodos de triar compostos que modulam a atividade de uma proteína de ActRIIB e/ou um ligante de ActRIIB. As composições e métodos fornecidos neste relatório são úteis no tratamento de doenças associadas à atividade anormal de uma proteína de ActRIIB e/ou um ligante de ActRIIB.

Listagem de Sequência

<110> ACCELERON PHARMA INC.

<120> "VARIANTES DERIVADAS DE ACTRIIB E SEUS USOS"

<130> PHPH-024-WO1

<140> PCT/US2008/001506

<141> 2008-02-04

<150> 60/899,304

<151> 2007-02-02

<150> 60/927,088

<151> 2007-05-01

<150> 60/931,880

<151> 2007-05-25

<160> 25

<170> Patente na versão 3.3

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

<210> 2

<211> 512

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Thr	Ala	Pro	Trp	Val	Ala	Leu	Ala	Leu	Leu	Trp	Gly	Ser	Leu	Trp	1	5	10	15
Pro	Gly	Ser	Gly	Arg	Gly	Glu	Ala	Glu	Thr	Arg	Glu	Cys	Ile	Tyr	Tyr	20	25	30	
Asn	Ala	Asn	Trp	Glu	Leu	Glu	Arg	Thr	Asn	Gln	Ser	Gly	Leu	Glu	Arg	35	40	45	
Cys	Glu	Gly	Glu	Gln	Asp	Lys	Arg	Leu	His	Cys	Tyr	Ala	Ser	Trp	Arg	50	55	60	
Asn	Ser	Ser	Gly	Thr	Ile	Glu	Leu	Val	Lys	Lys	Gly	Cys	Trp	Leu	Asp	65	70	75	80
Asp	Phe	Asn	Cys	Tyr	Asp	Arg	Gln	Glu	Cys	Val	Ala	Thr	Glu	Glu	Asn	85	90	95	
Pro	Gln	Val	Tyr	Phe	Cys	Cys	Cys	Glu	Gly	Asn	Phe	Cys	Asn	Glu	Arg	100	105	110	
Phe	Thr	His	Leu	Pro	Glu	Ala	Gly	Gly	Pro	Glu	Val	Thr	Tyr	Glu	Pro	115	120	125	
Pro	Pro	Thr	Ala	Pro	Thr	Leu	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Tyr	Ser	Leu	Leu	130	135	140	
Pro	Ile	Gly	Gly	Leu	Ser	Leu	Ile	Val	Leu	Leu	Ala	Phe	Trp	Met	Tyr	145	150	155	160
Arg	His	Arg	Lys	Pro	Pro	Tyr	Gly	His	Val	Asp	Ile	His	Glu	Asp	Pro	165	170	175	
Gly	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	Pro	Leu	Val	Gly	Leu	Lys	Pro	Leu	Gln	Leu	180	185	190	
Leu	Glu	Ile	Lys	Ala	Arg	Gly	Arg	Phe	Gly	Cys	Val	Trp	Lys	Ala	Gln	195	200	205	
Leu	Met	Asn	Asp	Phe	Val	Ala	Val	Lys	Ile	Phe	Pro	Leu	Gln	Asp	Lys	210	215	220	
Gln	Ser	Trp	Gln	Ser	Glu	Arg	Glu	Ile	Phe	Ser	Thr	Pro	Gly	Met	Lys	225	230	235	240
His	Glu	Asn	Leu	Leu	Gln	Phe	Ile	Ala	Ala	Glu	Lys	Arg	Gly	Ser	Asn	245	250	255	
Leu	Glu	Val	Glu	Leu	Trp	Leu	Ile	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Lys	Gly	Ser	260	265	270	
Leu	Thr	Asp	Tyr	Leu	Lys	Gly	Asn	Ile	Ile	Thr	Trp	Asn	Glu	Leu	Cys	275	280	285	
His	Val	Ala	Glu	Thr	Met	Ser	Arg	Gly	Leu	Ser	Tyr	Leu	His	Glu	Asp	290	295	300	
Val	Pro	Trp	Cys	Arg	Gly	Glu	Gly	His	Lys	Pro	Ser	Ile	Ala	His	Arg	305	310	315	320

Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val
 325 330 335
 Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro
 340 345 350
 Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu
 355 360 365
 Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile
 370 375 380
 Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys
 385 390 395 400
 Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu
 405 410 415
 Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val
 420 425 430
 His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro
 435 440 445
 Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp
 450 455 460
 Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu
 465 470 475 480
 Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu
 485 490 495
 Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile
 500 505 510

<210> 3
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 tctgggctg gggaggctga gacacgggag tgcattctact acaacgccaa ctgggagctg 60
 gagcgaccca accagagcgg cctggagcgc tgcgaaggcg agcaggacaa gcggctgcac 120
 tgctacgcct cctggcgcaa cagctctggc accatcgagc tcgtgaagaa gggctgctgg 180
 ctagatgact tcaactgcta cgataggcag gagtgtgtgg ccactgagga gaacccccag 240
 gtgtacttct gctgctgtga aggcaacttc tgcaacgagc gcttcactca ttgcccagag 300
 gctgggggcc cggaagtcac gtacgagcca cccccgacag cccccacc 348

<210> 4
 <211> 1539
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 atgacggcgc cctgggtggc cctcgccctc ctctggggat cgctgtggcc cggctctggg 60
 cgtggggagg ctgagacacg ggagtgcac tactacaacg ccaactggga gctggagcgc 120
 accaaccaga gcggcctgga gcgctgcgaa ggcgagcagg acaagcggct gcactgctac 180
 gcctcctggc gcaacagctc tggcaccatc gagctcgtga agaagggctg ctggctagat 240

```

gacttcaact gctacgatag gcaggagtgt gtggccactg aggagaaccc ccagggtgtac 300
ttctgctgct gtgaaggcaa cttctgcaac gagcgcttca ctcatattgcc agaggctggg 360
ggcccggaag tcacgtacga gccacccccg acagcccccac ccctgctcac ggtgctggcc 420
tactcactgc tgcccatcgg gggcctttcc ctcatcgtcc tgctggcctt ttggatgtac 480
cggcacgcga agcccccta cggtcagtgt gacatccatg aggaccctgg gcctccacca 540
ccatcccttc tgggtgggcct gaagccactg cagctgctgg agatcaagge tcggggggcg 600
tttggctgtg tctggaaggc ccagctcatg aatgactttg tagctgtcaa gatcttccca 660
ctccaggaca agcagtcgtg gcagagtga cgggagatct tcagcacacc tggcatgaag 720
cacgagaacc tgctacagtt cattgctgcc gagaagcgag gctccaacct cgaagtagag 780
ctgtggctca tcacggcctt ccatgacaag ggctccctca cggattacct caaggggaac 840
atcatcacat ggaacgaact gtgtcatgta gcagagacga tgtcacgagg cctctcatac 900
ctgcatgagg atgtgccctg gtgccgtggc gagggccaca agccgtctat tgccacagg 960
gactttaaaa gtaagaatgt attgctgaag agcgacctca cagccgtgct ggctgacttt 1020
ggcttggctg ttcgatttga gccagggaaa cctccagggg acaccacagg acaggtaggc 1080
acgagacggg acatggctcc tgagggtgctc gagggagcca tcaacttcca gagagatgcc 1140
ttcctgcgca ttgacatgta tgccatgggg ttggtgctgt gggagcttgt gtctcgctgc 1200
aaggctgcag acggaccogt ggatgagtac atgctgccct ttgaggaaga gattggccag 1260
cacccttcgt tggaggagct gcaggaggtg gtggtgcaca agaagatgag gccaccatt 1320
aaagatcact ggttgaaaca cccgggcctg gccagcttt gtgtgacct cgaggagtc 1380
tgggacctat atgcagaggc tcgcttgtcc gcgggctgtg tggaggagcg ggtgtccctg 1440
attcggaggt cgggtcaacgg cactacctcg gactgtctcg tttccctggg gacctctgtc 1500
accaatgtgg acctgcccc taaagagtca agcatctaa 1539

```

<210> 5

<211> 343

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 5

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
      85                      90                      95

```

```

Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
      100                      105                      110

```

```

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

```

```

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

```

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

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Peptídeo sintético

<400> 6

Thr Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> Apis mellifera

<400> 7

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
 1 5 10 15

Ser Tyr Ile Tyr Ala
 20

<210> 8

<211> 22

<212> PRT

<213> Organismo desconhecido

<220>

<223> Descrição do organismo desconhecido: ativador tecidual do plasminogênio

<400> 8

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

Ala Val Phe Val Ser Pro
 20

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Organismo desconhecido

<220>

<223> Descrição do organismo desconhecido: peptídeo nativo

<400> 9

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

Ser Ser Gly Ala
 20

<210> 10

<211> 1107

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: constructo sintético

<400> 10

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60
 tcgcccggcg cctctgggag tggggagggt gagacacggg agtgcatcta ctacaacgcc 120
 aactggggagc tggagcgcac caaccagagc ggcctggagc gctgcgaagg cgagcaggac 180
 aagcggctgc actgctacgc ctctctggcg aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag 240
 aagggctgct ggctagatga cttcaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag 300
 gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttcact 360
 catttgccag aggctggggg cccggaagtc acgtacgagc cacccccagc agccccacc 420
 ggtggtggaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 480
 gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 540
 acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 600
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 660

```

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtag 720
aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gtcccatcg agaaaacat ctccaaagcc 780
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgccc catcccggga ggagatgacc 840
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 900
gagtgaggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 960
tccgacggct ccttcttct ctatagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1020
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cagcagaag 1080
agcctctccc tgtctccggg taaatga 1107

```

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: peptídeo sintético

<400> 11

Gly Arg Gly Glu Ala Glu
1 5

<210> 12

<211> 344

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: constructo sintético

<400> 12

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

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

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

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

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

Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr
85 90 95

His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro
100 105 110

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

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

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

<210> 13

<211> 225

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: constructo sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (43)

<223> Asp or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (100)

<223> Lys or Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (212)

<223> Asn or Ala

<400> 13

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

Lys
225

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: peptídeo sintético

<400> 14

Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 15
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Descrição da sequência artificial: Tag 6xHis sintética

<400> 15
 His His His His His His
 1 5

<210> 16
 <211> 368
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da sequência artificial: constructo sintético

<400> 16
 Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15
 Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr
 20 25 30
 Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn
 35 40 45
 Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His
 50 55 60
 Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys
 65 70 75 80
 Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys
 85 90 95
 Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly
 100 105 110
 Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro
 115 120 125
 Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr
 130 135 140
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 145 150 155 160
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 165 170 175

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

 <210> 17
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

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

Lys Pro Pro Thr
 115

<210> 18
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15
 Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30
 Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
 35 40 45
 Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
 50 55 60
 Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 85 90 95
 Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
 100 105 110
 Ala Pro Thr
 115

<210> 19
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 19
 Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1 5 10 15
 Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
 20 25 30
 Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
 35 40 45
 Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Pro
 50 55 60
 Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
 85 90 95

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
 100 105 110

Phe Thr His Leu Pro Glu Pro Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
 115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser
 145 150

<210> 20
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Sus sp.

<400> 20
 Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1 5 10 15

Val Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
 20 25 30

Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
 35 40 45

Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
 50 55 60

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

Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
 85 90 95

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
 100 105 110

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
 115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser
 145 150

<210> 21
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 21
 Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1 5 10 15

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

<210> 22
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1 5 10 15
 Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
 20 25 30
 Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
 35 40 45
 Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
 50 55 60
 Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
 85 90 95
 Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
 100 105 110
 Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
 115 120 125
 Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser
145 150

<210> 23
<211> 150
<212> PRT
<213> Bos sp.

<400> 23
Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
1 5 10 15
Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
20 25 30
Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
35 40 45
Cys Glu Gly Glu Arg Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
50 55 60
Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
65 70 75 80
Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
85 90 95
Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
100 105 110
Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
115 120 125
Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
130 135 140
Pro Val Gly Gly Leu Ser
145 150

<210> 24
<211> 150
<212> PRT
<213> Xenopus sp.

<400> 24
Met Gly Ala Ser Val Ala Leu Thr Phe Leu Leu Leu Leu Ala Thr Phe
1 5 10 15
Arg Ala Gly Ser Gly His Asp Glu Val Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr
20 25 30
Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Lys Thr Asn Gln Ser Gly Val Glu
35 40 45
Arg Leu Val Glu Gly Lys Lys Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser
50 55 60
Trp Arg Asn Asn Ser Gly Phe Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp
65 70 75 80

[illegible]

```
<210> 25
<211> 150
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

```

<400> 25
Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys
  1              5              10              15
Ser Ser Gly Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe
              20              25              30
Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu
              35              40              45
Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp
  50              55              60
Lys Asn Ile Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu
  65              70              75              80
Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp
              85              90              95
Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu
              100              105              110
Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn
              115              120              125
Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Tyr Tyr Asn Ile Leu Leu Tyr Ser Leu
  130              135              140
Val Pro Leu Met Leu Ile
  145              150

```