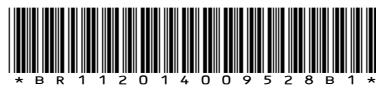




República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112014009528-0 B1**



**(22) Data do Depósito: 17/10/2012**

**(45) Data de Concessão: 29/12/2020**

**(54) Título:** USOS DE POLIPEPTÍDEOS ACTRIIB PARA A FABRICAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA TRATAR ERITROPOESE INEFICAZ

**(51) Int.Cl.:** A61K 38/18; A61P 7/06.

**(30) Prioridade Unionista:** 17/10/2011 US 61/547,932.

**(73) Titular(es):** ACCELERON PHARMA, INC..

**(72) Inventor(es):** RAVINDRA KUMAR; NAGA VENKATA SAI RAJASEKHAR SURAGANI; JASBIR SEEHRA; ROBERT SCOTT PEARSALL.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2012060650 de 17/10/2012

**(87) Publicação PCT:** WO 2013/059347 de 25/04/2013

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 17/04/2014

**(57) Resumo:** MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA TRATAR ERITROPOESE INEFICAZ. A presente invenção proporciona métodos para tratar eritropoiese ineficaz em um paciente que compreende administrar a um paciente um polipeptídeo ActRIIB pelo menos 90% idêntico à sequência de aminoácidos 109 de SEQ ID NO. 1 em que o dito polipeptídeo compreende um aminoácido acídico na posição 79.

**“USOS DE POLIPEPTÍDEOS ACTRIIB PARA A FABRICAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA TRATAR ERITROPOIESE INEFICAZ”**

**REFERÊNCIA REMISSIVA AOS PEDIDOS DE DEPÓSITO CORRELATOS**

[001]Este pedido reivindica o benefício ao Pedido Provisório Norte-Americano com Número de Série 61/547.932, depositado em 17 de outubro de 2011, estando todos os ensinamentos do pedido supracitado aqui incorporados a título de referência.

**FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

[002]As hemárias maduras, ou eritrócitos, são responsáveis pelo transporte de oxigênio em sistemas circulatórios de vertebrados. As hemárias contêm altas concentrações de hemoglobina, uma proteína que liga oxigênio nos pulmões em pressão parcial relativamente alta de oxigênio ( $pO_2$ ) e distribui oxigênio a áreas do corpo com uma  $pO_2$  relativamente baixa.

[003]As hemárias maduras são produzidas a partir de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes em um processo denominado como eritropoiese. A eritropoiese pós-natal ocorre primariamente na medula óssea e na polpa vermelha do baço. A ação coordenada de várias trajetórias de sinalização controla o equilíbrio da proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte celular. Sob condições normais, as hemárias são produzidas em uma taxa que mantenha uma massa de hemárias constante no corpo, e a produção pode aumentar ou diminuir em resposta a vários estímulos, incluindo tensão de oxigênio ou demanda de tecido aumentadas ou reduzidas. O processo de eritropoiese começa com a formação de células precursoras comprometidas à linhagem e procede através de uma série de tipos de células precursoras distintas. Os estágios finais de eritropoiese ocorrem à medida que os reticulócitos são liberados na corrente sanguínea e perdem suas mitocôndrias e ribossomos enquanto assumem a morfologia de hemárias maduras. Um nível elevado de reticulócitos, ou uma razão elevada de reticulócito:eritrócito, no sangue é indicativo

de taxas de produção de hemácias aumentadas.

[004]A eritropoietina (EPO) é amplamente reconhecida como o regulador positivo mais significativo de eritropoiese pós-natal em vertebrados. A EPO regula a resposta eritropoiética compensatória à tensão de oxigênio em tecido reduzido (hipoxia) e baixos níveis de hemácias ou baixos níveis de hemoglobina. Em seres humanos, níveis elevados de EPO promovem a formação de hemácias estimulando-se a geração de progenitores de eritróide na medula óssea e no baço. Em camundongos, a EPO acentua a eritropoiese primariamente no baço.

[005]Os efeitos da EPO são mediados por um receptor de superfície celular pertencente à superfamília de receptores de citocina. O gene receptor de EPO humano codifica uma proteína transmembranar de 483 aminoácidos, enquanto imagina-se que o receptor de EPO ativo exista como um complexo multimérico mesmo na ausência de um ligante (vide a Patente U.S. No. 6.319.499). O receptor de EPO de comprimento completo clonado expressado em células de mamíferos liga a EPO com uma afinidade similar àquela do receptor nativo em células progenitoras de eritróide. A ligação de EPO a seu receptor causa uma alteração conformacional resultante na ativação de receptor e efeitos biológicos incluindo a proliferação aumentada de eritroblastos imaturos, diferenciação aumentada de eritroblastos imaturos, e apoptose reduzida em células progenitora de eritróide (Liboi et al., 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:11351-11355; Koury et al., 1990, Science 248:378-381).

[006]Várias formas de EPO recombinante são usadas por médicos para aumentar os níveis de hemácias em uma variedade de ajustes clínicos, e particularmente para o tratamento de anemia. A anemia é uma condição amplamente definida caracterizada por níveis abaixo do normal de hemoglobina ou hemácias no sangue. Em alguns casos, a anemia é causada por um distúrbio primário na produção ou sobrevivência de hemácias. Mais comumente, a anemia é secundária a doenças de outros sistemas (Weatherall & Provan (2000) Lancet 355, 1169-1175). A anemia po-

de resultar a partir de uma taxa reduzida de produção ou taxa aumentada de destruição de hemácias ou pela perda de hemácias devido a hemorragias. A anemia pode resultar a partir de uma variedade de distúrbios que incluem, por exemplo, insuficiência renal crônica, tratamento por quimioterapia, síndrome mielodisplásica, artrite reumatoide, e transplante de medula óssea.

[007] Tipicamente, o tratamento com EPO causa um aumento nas hemoglobinas em cerca de 1 a 3 g/dL em seres humanos saudáveis durante um período de semanas. Quando administrado a indivíduos anêmicos, este regime de tratamento geralmente proporciona aumentos substanciais em níveis de hemoglobina e hemácias e leva a aperfeiçoamentos na qualidade de vida e sobrevida prolongada. A EPO não é uniformemente eficaz, e muitos indivíduos são refratários a doses ainda maiores (Horl et al. (2000) Nephrol Dial Transplant 15, 43-50). Mais de 50% dos pacientes com câncer têm uma resposta inadequada a EPO, aproximadamente 10% com doença renal em estágio final são hiporesponsivos (Glaspy et al. (1997) J Clin Oncol 15, 1218-1234; Demetri et al. (1998) J Clin Oncol 16, 3412-3425), e menos de 10% com síndrome mielodisplásica respondem favoravelmente (Estey (2003) Curr Opin Hematol 10, 60-67). Vários fatores, incluindo inflamação, deficiência de ferro e vitaminas, diálise inadequada, toxicidade de alumínio, e hiperparatiroidismo podem prever uma resposta terapêutica fraca. Os mecanismos moleculares de resistência a EPO ainda não são evidentes. Evidências recentes sugerem que doses maiores de EPO podem estar associadas a um risco aumentado de morbidade cardiovascular, crescimento tumoral, e mortalidade em algumas populações de pacientes (Krapf et al., 2009, Clin J Am Soc Nephrol 4:470-480; Glaspy, 2009, Annu Rev Med 60:181-192). Portanto, recomenda-se que os compostos terapêuticos baseados em EPO (agentes estimulantes de eritropoietina, ESAs) sejam administrados na menor dose suficiente para evitar a necessidade por transfusões de hemácias (Jelkmann et al., 2008, Crit Rev Oncol. Hematol 67:39-61).

[008]Eritropoiese ineficaz é um termo usado para descrever um grupo de distúrbios de eritróide no qual a produção de eritrócitos é reduzida apesar de um aumento nos estágios mais precoces de eritropoiese (vide, por exemplo, Tanno, 2010, Adv Hematol 2010:358283). Geralmente, a eritropoiese ineficaz provoca anemia, níveis elevados de eritropoietina, formação de números excessivos de precursores de hemácias e sobrecarga de ferro. Esses fenômenos podem levar a esplenomegalia, distúrbios hepáticos e coronarianos e lesões ósseas, bem como outras complicações. Devido ao fato de os níveis de eritropoietina endógena serem comumente altos em pacientes com eritropoiese ineficaz, terapêuticas baseadas em EPO geralmente não tratarão a anemia nesses pacientes ou podem causar um agravamento de outros aspectos da doença, tal como esplenomegalia e sobrecarga de ferro.

[009]Portanto, um objetivo da presente revelação consiste em proporcionar métodos alternativos para aumentar os níveis de hemácias e/ou endereçar outros distúrbios no contexto de eritropoiese ineficaz.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[010]Em parte, a revelação demonstra que GDF Traps podem ser usados para tratar eritropoiese ineficaz e os distúrbios e sintomas associados à eritropoiese ineficaz, incluindo, mas sem limitar-se a, anemia, esplenomegalia, sobrecarga de ferro, medula óssea hipercelular, níveis de eritropoietina endógena elevados e lesões ósseas. Em particular, a revelação demonstra que um GDF Trap que seja uma forma solúvel de polipeptídeo ActRIIB tendo um resíduo acídico na posição 79 de SEQ ID NO: 1, quando administrado in vivo, aumenta os níveis de hemácias no sangue em indivíduos saudáveis normais, bem como modelos animais de anemia e eritropoiese ineficaz. De modo surpreendente, além de aumentar diretamente os níveis de hemácias, as moléculas reveladas melhoram outros sintomas associados à eritropoiese ineficaz, incluindo esplenomegalia, sobrecarga de ferro e lesões ósseas.

Em alguns casos, esses distúrbios associados têm importância igual ou maior à saúde e à qualidade de vida do paciente como a condição anêmica. Portanto, em determinadas modalidades, a revelação proporciona métodos para usar GDF Traps para aumentar os níveis de hemácias e hemoglobinas em pacientes e tratar distúrbios associados a baixos níveis de hemácias em pacientes em necessidade. Em particular, a revelação proporciona métodos para usar polipeptídeos de GDF Trap para tratar complicações que surgem a partir de distúrbios de eritropoiese ineficaz, incluindo complicações principais como anemia, sobrecarga de ferro tecidual, eritropoiese extramedular, patologia óssea induzida por eritroblasto, e níveis de eritropoietina inapropriadamente elevados. Nesses distúrbios, GDF Traps podem ser usados para aumentar os níveis de hemácias enquanto reduz a necessidade por transfusões de hemácias e terapia por quelação de ferro, e, desse modo, reduzir a morbidez e a mortalidade associadas ao acúmulo de ferro em tecidos vulneráveis. Em parte, um GDF Trap pode ser usado em combinação com terapias assistentes existentes para eritropoiese ineficaz, incluindo transfusão de hemácias e terapia por quelação de ferro. GDF Traps também podem ser usados em combinação com um agonista de hepcidina para tratar eritropoiese ineficaz. Conforme descrito no Pedido de Patente U.S. No. 12/012.652, incorporado a título de referência, GDF Traps também podem ser usados para aumentar a massa muscular e reduzir a massa gordurosa.

[011]Em determinados aspectos, a presente revelação proporciona GDF Traps que sejam polipeptídeos ActRIIB variantes, incluindo polipeptídeos ActRIIB tendo truncamentos e alterações de sequência amino-terminais e carbóxi-terminais. Opcionalmente, GDF Traps da invenção podem ser projetados para antagonizar preferencialmente um ou mais ligantes de receptores ActRIIB, como GDF8 (também denominado como miostatina), GDF11, Nodal, e BMP7 (também denominado como OP-1). Exemplos de GDF Traps incluem um conjunto de variantes derivadas a partir de ActRIIB que tenham reduzido consideravelmente a afinidade por activina. Essas

variantes exibem efeitos desejáveis sobre hemácias enquanto reduz os efeitos em outros tecidos. Exemplos dessas variantes incluem aquelas tendo um aminoácido acídico (por exemplo, ácido aspártico, D, ou ácido glutâmico, E) na posição correspondente à posição 79 de SEQ ID NO:1. Em determinadas modalidades, o polipeptídeo de GDF Trap compreende uma sequência de aminoácido que compreende, consiste em, ou consiste essencialmente em, uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 7, 26, 28, 29, 32, 37 ou 38, e polipeptídeos que sejam pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, ou 99% idênticos a qualquer um dos anteriores.

[012]Em determinados aspectos, a revelação proporciona preparações farmacêuticas que compreende um GDF Trap que se liga a um ligante ActRIIB, como GDF8, GDF11, activina (por exemplo, activina B), BMP7 ou nodal, e um carreador farmaceuticamente aceitável. Opcionalmente, o GDF Trap se liga a um ligante ActRIIB com um Kd menor que 10 micromolar, menor que 1 micromolar, menor que 100 nanomolar, menor que 10 nanomolar, ou menor que 1 nanomolar. Opcionalmente, o GDF Trap inibe a sinalização ActRIIB, como eventos de transdução de sinal intracelular disparados por um ligante ActRIIB. Um GDF Trap para uso em tal preparação pode ser qualquer um daqueles revelados no presente documento, incluindo, por exemplo, GDF Traps tendo uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 ou 40, ou GDF Traps tendo uma sequência de aminoácido que seja pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97% ou 99% idêntica a uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 ou 40, ou GDF Traps tendo uma sequência de aminoácido que seja pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97% ou 99% idêntica a uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 ou 40 em que a posição correspondente a L79 em SEQ ID NO: 1 é um aminoácido acídico. Um GDF Trap preferencial para uso em tal preparação consiste em, ou consiste essencialmente em, uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO:

26. Um GDF Trap pode incluir um fragmento funcional de um polipeptídeo ActRIIB natural, tal como aquele que compreende pelo menos 10, 20 ou 30 aminoácidos de uma sequência selecionada a partir de SEQ ID NOs: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 ou 40 ou uma sequência de SEQ ID NO: 2, desprovida de 1, 2, 3, 4, 5 ou 10 a 15 aminoácidos C-terminais e desprovida de 1, 2, 3, 4 ou 5 aminoácidos na terminação N. Um polipeptídeo preferencial compreenderá um truncamento relativo a SEQ ID NO: 2 ou 40 entre 2 e 5 aminoácidos na terminação N e não mais de 3 aminoácidos na terminação C. Um GDF Trap pode incluir uma ou mais alterações na sequência de aminoácido de um polipeptídeo ActRIIB (por exemplo, no domínio de ligação ao ligante) relativo a um polipeptídeo ActRIIB de ocorrência natural. A alteração na sequência de aminoácido pode, por exemplo, alterar a glicosilação do polipeptídeo quando produzido em um mamífero, inseto ou outra célula eucariótica ou alterar a clivagem proteolítica do polipeptídeo relativo ao polipeptídeo ActRIIB de ocorrência natural.

[013]Um GDF Trap pode ser uma proteína de fusão que tenha, como um domínio, um polipeptídeo ActRIIB (por exemplo, um domínio de ligação ao ligante de um ActRIIB com uma ou mais variações de sequência) e um ou mais domínios adicionais que proporcionem uma propriedade desejável, como uma farmacocinética aperfeiçoada, uma purificação mais fácil, direcionamento a tecidos particulares, etc. Por exemplo, um domínio de uma proteína de fusão pode acentuar um ou mais entre estabilidade *in vivo*, meia-vida *in vivo*, absorção/administração, localização ou distribuição de tecidos, formação de complexos protéicos, multimerização da proteína de fusão, e/ou purificação. As proteínas de fusão de GDF Trap podem incluir um domínio Fc de imunoglobulina (tipo selvagem ou mutante) ou uma albumina sérica. Em determinadas modalidades, uma fusão de GDF Trap compreende um ligador relativamente não-estruturado posicionado entre o domínio Fc e o domínio ActRIIB extracelular. Este ligador não-estruturado pode corresponder a aproximadamente 15 ami-

noácidos com região não-estruturada na extremidade C-terminal do domínio extracelular de ActRIIB (a “cauda”), ou pode ser uma sequência artificial entre 3 e 5, 15, 20, 30, 50 ou mais aminoácidos que sejam relativamente isentos de uma estrutura secundária. Um ligador pode ser rico em resíduos de glicina e prolina e pode, por exemplo, conter sequências de repetição de treonina/serina e glicinas (por exemplo, TG<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 13) ou SG<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 14) singletos ou repetições) ou uma série de três glicinas. Uma proteína de fusão pode incluir uma subsequência de purificação, tal como um marcador de epítopo, um marcador FLAG, uma sequência de polihistidina, e uma fusão GST. Em determinadas modalidades, uma fusão de GDF Trap compreende uma sequência líder. A sequência líder pode ser uma sequência líder ActRIIB nativa ou uma sequência líder heteróloga. Em determinadas modalidades, a sequência líder é uma sequência líder de Ativador do Plasminogênio Tecidual (TPA). Em uma modalidade, uma proteína de fusão de GDF Trap compreende uma sequência de aminoácido conforme apresentado na fórmula A-B-C. A porção B é um polipeptídeo ActRIIB N- e C-terminalmente truncado que consiste em uma sequência de aminoácido correspondente a aminoácidos 25-131 de SEQ ID NO: 2 ou 40. As porções A e C podem ser independentemente iguais a zero, um ou mais de um aminoácido, e ambas as porções A e C são heterólogas a B. As porções A e/ou C podem ser fixadas à porão B através de uma sequência ligante.

[014]Opcionalmente, um GDF Trap inclui um polipeptídeo ActRIIB variante tendo um ou mais resíduos de aminoácido modificado selecionados a partir de: um aminoácido glicosilado, um aminoácido PEGuilado, um aminoácido farnesilado, um aminoácido acetilado, um aminoácido biotinilado, um aminoácido conjugado a uma porção lipídica, e um aminoácido conjugado a um agente de derivatização orgânica. Uma preparação farmacêutica também pode incluir um ou mais compostos adicionais, como um composto que seja usado para tratar um distúrbio associado a ActRIIB. De preferência, uma preparação farmacêutica é substancialmente isenta de

pirogênio. Em geral, é preferível que um GDF Trap seja expresso em uma linhagem celular de mamífero que medie adequadamente a glicosilação natural do GDF Trap a fim de reduzir a probabilidade de uma resposta imune desfavorável em um paciente. Linhagens celulares humanas e CHO foram usadas com sucesso, e espera-se que outros vetores de expressão de mamíferos comuns sejam usados.

[015]Em determinados aspectos, a revelação proporciona composições farmacêuticas embaladas que compreende uma preparação farmacêutica descrita no presente documento e rotulada para uso em níveis crescentes de hemácias em um ser humano.

[016]Em determinados aspectos, a revelação proporciona GDF Traps que sejam polipeptídeos ActRIIB solúveis que compreendem um domínio de ligação ao ligante alterado (por exemplo, ligação GDF8). Os GDF Traps com domínios de ligação ao ligante alterados podem compreender, por exemplo, uma ou mais mutações nos resíduos de aminoácido, como E37, E39, R40, K55, R56, Y60, A64, K74, W78, L79, D80, F82 e F101 e ActRIIB humano (a numeração é relativa a SEQ ID NO: 1). Opcionalmente, o domínio de ligação ao ligante alterado pode ter uma seletividade aumentada por um ligante, como GDF8/GDF11 em relação a um domínio de ligação ao ligante tipo selvagem de um receptor ActRIIB. A título de ilustração, essas mutações são demonstradas por aumentarem a seletividade do domínio de ligação ao ligante alterado por GDF11 (e, portanto, presumidamente, GDF8) sobre activina: K74Y, K74F, K74I, L79D, L79E, e D80I. As mutações a seguir têm o efeito reverso, aumentando a razão de ligação de activina sobre GDF11: D54A, K55A, L79A e F82A. A atividade de ligação geral (GDF11 e activina) pode ser aumentada pela inclusão da região de “cauda” ou, presumidamente, uma região ligante não-estruturada, e também pelo uso de uma mutação K74A. Outras mutações que causaram uma redução geral em afinidade de ligação de ligante incluem: R40A, E37A, R56A, W78A, D80K, D80R, D80A, D80G, D80F, D80M e D80N. As mutações podem

ser combinadas para alcançar os efeitos desejados. Por exemplo, muitas das mutações que afetam a razão de ligação de GDF11:Activina têm um efeito negativo geral sobre a ligação de ligante, e, portanto, estas podem ser combinadas com mutações que aumentem genericamente a ligação de ligante para produzir uma proteína de ligação aperfeiçoada com uma seletividade de ligante. Em uma modalidade exemplificadora, um GDF Trap é um polipeptídeo ActRIIB que compreende uma mutação L79D ou L79E, opcionalmente, em combinação com substituições, adições ou exclusões de aminoácido adicionais.

[017]Opcionalmente, um GDF Trap que compreende um domínio de ligação ao ligante alterado tem uma razão de  $K_d$  para ligação de activina a  $K_d$  para ligação de GDF8 que seja pelo menos 2, 5, 10, ou mesmo 100 vezes maior em relação à razão para o domínio de ligação ao ligante tipo selvagem. Opcionalmente, o GDF Trap que compreende um domínio de ligação ao ligante alterado tem uma razão de  $IC_{50}$  para inibir activina a  $IC_{50}$  para inibir GDF8/GDF11 que seja pelo menos 2, 5, 10, ou mesmo 100 vezes maior em relação ao domínio de ligação ao ligante ActRIIB tipo selvagem. Opcionalmente, o GDF Trap que compreende um domínio de ligação ao ligante alterado inibe GDF8/GDF11 com um  $IC_{50}$  pelo menos 2, 5, 10, ou mesmo 100 vezes menor que  $IC_{50}$  para inibir activina. Esses GDF Traps podem ser proteínas de fusão que incluem um domínio Fc de imunoglobulina (seja tipo selvagem ou mutante). Em determinados casos, os GDF Traps solúveis em questão são antagonistas (inibidores) de GDF8 e/ou GDF11.

[018]Outros GDF Traps são contemplados, tais como os seguintes. Uma proteína de fusão de GDF Trap que compreende uma porção derivada a partir da sequência ActRIIB de SEQ ID NO: 1 ou 39 e uma segunda porção de polipeptídeo, em que a porção derivada a partir de ActRIIB corresponde a uma sequência que começa em qualquer um dos aminoácidos 21-29 de SEQ ID NO: 1 ou 39 (opcionalmente, começando em 22-25 de SEQ ID NO: 1 ou 39) e terminando em qualquer um

dos aminoácidos 109-134 de SEQ ID NO: 1 ou 39, e em que a proteína de fusão de GDF Trap inibe a sinalização por activina, miostatina e/ou GDF11 em um ensaio baseado em células. A proteína de fusão de GDF Trap anterior, em que a porção derivada de ActRIIB corresponde a uma sequência que começa em qualquer um dos aminoácidos 20-29 de SEQ ID NO: 1 ou 39 (opcionalmente, começando em 22-25 de SEQ ID NO: 1 ou 39) e terminando em qualquer um dos aminoácidos 109-133 de SEQ ID NO: 1 ou 39. A proteína de fusão de GDF Trap anterior, em que a porção derivada de ActRIIB corresponde a uma sequência que começa em qualquer um dos aminoácidos 20-24 de SEQ ID NO: 1 ou 39 (opcionalmente, começando em 22-25 de SEQ ID NO: 1 ou 39) e terminando em qualquer um dos aminoácidos 109-133 de SEQ ID NO: 1 ou 39. A proteína de fusão de GDF Trap anterior, em que a porção derivada de ActRIIB corresponde a uma sequência que começa em qualquer um dos aminoácidos 21-24 de SEQ ID NO: 1 ou 39 e terminando em qualquer um dos aminoácidos 109-134 de SEQ ID NO: 1 ou 39. A proteína de fusão de GDF Trap anterior, em que a porção derivada de ActRIIB corresponde a uma sequência que começa em qualquer um dos aminoácidos 20-24 de SEQ ID NO: 1 ou 39 e terminando em qualquer um dos aminoácidos 118-133 de SEQ ID NO: 1 ou 39. A proteína de fusão de GDF Trap anterior, em que a porção derivada de ActRIIB corresponde a uma sequência que começa em qualquer um dos aminoácidos 21-24 de SEQ ID NO: 1 ou 39 e terminando em qualquer um dos aminoácidos 118-134 de SEQ ID NO: 1 ou 39. A proteína de fusão de GDF Trap anterior, em que a porção derivada de ActRIIB corresponde a uma sequência que começa em qualquer um dos aminoácidos 20-24 de SEQ ID NO: 1 ou 39 e terminando em qualquer um dos aminoácidos 128-133 de SEQ ID NO: 1 ou 39. A proteína de fusão de GDF Trap anterior, em que a porção derivada de ActRIIB corresponde a uma sequência que começa em qualquer um dos aminoácidos 20-24 de SEQ ID NO: 1 ou 39 e terminando em qualquer um dos aminoácidos 128-133 de SEQ ID NO: 1 ou 39. A proteína de fusão de GDF Trap anterior,

or, em que a porção derivada de ActRIIB corresponde a uma sequência que começa em qualquer um dos aminoácidos 21-29 de SEQ ID NO: 1 ou 39 e terminando em qualquer um dos aminoácidos 118-134 de SEQ ID NO: 1 ou 39. A proteína de fusão de GDF Trap anterior, em que a porção derivada de ActRIIB corresponde a uma sequência que começa em qualquer um dos aminoácidos 20-29 de SEQ ID NO: 1 ou 39 e terminando em qualquer um dos aminoácidos 118-133 de SEQ ID NO: 1 ou 39. A proteína de fusão de GDF Trap anterior, em que a porção derivada de ActRIIB corresponde a uma sequência que começa em qualquer um dos aminoácidos 21-29 de SEQ ID NO: 1 ou 39 e terminando em qualquer um dos aminoácidos 128-134 de SEQ ID NO: 1 ou 39. A proteína de fusão de GDF Trap anterior, em que a porção derivada de ActRIIB corresponde a uma sequência que começa em qualquer um dos aminoácidos 20-29 de SEQ ID NO: 1 e terminando em qualquer um dos aminoácidos 128-133 de SEQ ID NO: 1 ou 39. Surpreendentemente, construções que começam em 22-25 de SEQ ID NO: 1 ou 39 têm níveis de atividade maiores que as proteínas tendo o domínio extracelular completo de ActRIIB humano. Em uma modalidade preferencial, a proteína de fusão de GDF Trap comprehende, consiste essencialmente em, ou consiste em, uma sequência de aminoácido que começa em uma posição de aminoácido 25 de SEQ ID NO: 1 ou 39 e terminando em uma posição de aminoácido 131 de SEQ ID NO: 1 ou 39. Em outras modalidades preferenciais, o polipeptídeo de GDF Trap consiste em, ou consiste essencialmente em, uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 7, 26, 28, 29, 32, 37 ou 38. Qualquer uma das proteínas de fusão de GDF Trap anteriores pode ser produzida como um homodímero. Qualquer uma das proteínas de fusão de GDF Trap anteriores pode ter uma porção heteróloga que comprehende uma região constante de uma cadeia pesada IgG, tal como um domínio Fc. Qualquer uma das proteínas de fusão de GDF Trap anteriores pode compreender um aminoácido acídico na posição correspondente à posição 79 de SEQ ID NO: 1, opcionalmente, em combinação com uma ou mais substituições, ex-

clusões ou inserções de aminoácido adicionais em relação a SEQ ID NO: 1.

[019]Outras proteínas de GDF Trap são contempladas, tais como as seguintes. Uma proteína de GDF Trap que compreende uma sequência de aminoácido que seja pelo menos 80% idêntica à sequência de aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1 ou 39, em que a posição correspondente a 64 de SEQ ID NO: 1 é um R ou K, e em que a proteína de GDF Trap inibe a sinalização por activina, miostatina e/ou GDF11 em um ensaio baseado em células. A proteína de GDF Trap anterior, em que pelo menos uma alteração em relação à sequência de SEQ ID NO: 1 ou 39 fica posicionada fora da bolsa de ligação do ligante. A proteína de GDF Trap anterior, em que pelo menos uma alteração em relação à sequência de SEQ ID NO: 1 ou 39 é uma alteração conservativa posicionada dentro da bolsa de ligação do ligante. A proteína de GDF Trap anterior, em que pelo menos uma alteração em relação à sequência de SEQ ID NO: 1 ou 39 é uma alteração em uma ou mais posições selecionadas a partir do grupo que consiste em K74, R40, Q53, K55, F82 e L79. A proteína de GDF Trap anterior, em que a proteína compreende pelo menos uma sequência N-X-S/T em uma posição diferente de uma sequência N-X-S/T endógena de ActRIIB, e em uma posição fora da bolsa de ligação do ligante.

[020]Outros GDF Traps são contemplados, tais como os seguintes. A proteína de GDF Trap que compreende uma sequência de aminoácido que seja pelo menos 80% idêntica à sequência de aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1 ou 39, e em que a proteína compreende pelo menos uma sequência N-X-S/T em uma posição diferente de uma sequência N-X-S/T endógena de ActRIIB, e em uma posição fora da bolsa de ligação do ligante. O GDF Trap anterior, em que a proteína de GDF Trap compreende um N na posição correspondente à posição 24 de SEQ ID NO: 1 ou 39 e um S ou T na posição correspondente à posição 26 de SEQ ID NO: 1 ou 39, e em que o GDF Trap inibe a sinalização por activina, miostatina e/ou GDF11 em um ensaio baseado em células. O GDF Trap anterior, em que a proteína de GDF Trap

compreende um R ou K na posição correspondente à posição 64 de SEQ ID NO: 1 ou 39. O GDF Trap anterior, em que a proteína ActRIIB comprehende um D ou E na posição correspondente à posição 79 de SEQ ID NO: 1 ou 39 e em que o GDF Trap inibe a sinalização por activina, miostatina e/ou GDF11 em um ensaio baseado em células. O GDF Trap anterior, em que pelo menos uma alteração em relação à sequência de SEQ ID NO: 1 ou 39 é uma alteração conservativa posicionada dentro da bolsa de ligação do ligante. O GDF Trap anterior, em que pelo menos uma alteração em relação à sequência de SEQ ID NO: 1 ou 39 é uma alteração em uma ou mais posições selecionadas a partir do grupo que consiste em K74, R40, Q53, K55, F82 e L79. O GDF Trap anterior, em que a proteína é uma proteína de fusão que comprehende, ainda, uma porção heteróloga. Qualquer uma das proteínas de fusão de GDF Trap anteriores pode ser produzida como um homodímero. Qualquer uma das proteínas de fusão de GDF Trap pode ter uma porção heteróloga que comprehende uma região constante de uma cadeia pesada IgG, tal como um domínio Fc.

[021]Em determinados aspectos, a revelação proporciona ácidos nucléicos que codificam um polipeptídeo de GDF Trap. Um polinucleotídeo isolado pode compreender uma sequência de codificação para um polipeptídeo de GDF Trap solúvel, tal como descrito anteriormente. Por exemplo, um ácido nucléico isolado pode incluir uma sequência que codifica um GDF Trap que comprehende um domínio extracelular (por exemplo, domínio de ligação ao ligante) de um polipeptídeo ActRIIB tendo uma ou mais variações de sequência e uma sequência que codificaria parte ou todo o domínio transmembranar e/ou o domínio citoplásмico de um polipeptídeo ActRIIB, mas para um códon de parada posicionado dentro do domínio transmembranar ou do domínio citoplásмico, ou posicionado entre o domínio extracelular e o domínio transmembranar ou o domínio citoplásмico. Por exemplo, um polinucleotídeo isolado que codifica um GDF Trap pode compreender uma sequência de polinucleotídeo ActRIIB de comprimento completo, como SEQ ID NO: 4 tendo uma ou mais varia-

ções, ou uma versão parcialmente truncada, sendo que o dito polinucleotídeo isolado compreende, ainda, um códon de terminação de transcrição pelo menos seiscentos nucleotídeos antes da terminação 3' ou, de outro modo, posicionado de modo que a translação do polinucleotídeo produza um domínio extracelular opcionalmente fundido a uma porção truncada de um ActRIIB de comprimento completo. Os ácidos nucléicos revelados no presente documento podem ser operacionalmente ligados a um promotor para expressão, e a revelação proporciona células transformadas com tais polinucleotídeos recombinantes. De preferência, a célula é uma célula de mamífero, tal como uma célula CHO.

[022]Em determinados aspectos, a revelação proporciona métodos para produzir um polipeptídeo de GDF Trap. Esse método pode incluir expressar qualquer um dos ácidos nucléicos (por exemplo, SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 ou 31) revelados no presente documento em uma célula adequada, tal como células do ovário de hamster chinês (CHO). Esse método pode compreender: a) culturar uma célula sob condições adequadas para expressão do polipeptídeo de GDF Trap, em que a dita célula é transformada com uma construção de expressão de GDF Trap; e b) recuperar o polipeptídeo de GDF Trap expresso dessa forma. Os polipeptídeos de GDF Trap podem ser recuperados como fracos brutas, parcialmente purificadas ou altamente purificadas usando qualquer uma das técnicas bem conhecidas para obter proteína a partir de culturas celulares.

[023]Em determinados aspectos, um polipeptídeo de GDF Trap revelado no presente documento pode ser usado em um método para promover a produção de hemácias ou aumentar os níveis de hemácias em um indivíduo. Em determinadas modalidades, a revelação proporciona métodos para tratar um distúrbio associado a baixas contagens de hemácias ou a baixos níveis de hemoglobina (por exemplo, uma anemia, uma síndrome mielodisplásica, etc.), ou promover a produção de hemácias, em pacientes em necessidade. Um método pode compreender administrar a

um indivíduo em necessidade uma quantidade eficaz de um polipeptídeo de GDF Trap. Em determinados aspectos, a revelação proporciona usos de polipeptídeos de GDF Trap para produzir um medicamento para o tratamento de um distúrbio ou condição conforme descrito no presente documento.

[024]Em parte, a revelação demonstra que os Traps podem ser usados em combinação (por exemplo, administrados ao mesmo tempo ou em momentos diferentes, mas, em geral, de modo a alcançar uma sobreposição de efeitos farmacológicos) com ativadores de receptor EPO para aumentar os níveis de hemácias (eritropoiese) ou tratar anemia em pacientes em necessidade. Em parte, a revelação demonstra que um GDF Trap pode ser administrado em combinação com um ativador de receptor EPO para aumentar sinergicamente a formação de hemácias em um paciente. Logo, o efeito deste tratamento combinado pode ser significativamente maior que a soma dos efeitos do GDF Trap e do ativador de receptor EPO quando administrados separadamente em suas respectivas doses. Em determinadas modalidades, este sinergismo pode ser vantajoso visto que permite que níveis alvo de hemácias sejam atingidos com doses menores de um ativador de receptor EPO, evitando, assim, efeitos colaterais potenciais ou outros problemas associados a níveis maiores de ativação de receptor EPO.

[025]Um ativador de receptor EPO pode estimular eritropoiese colocando-se em contato e ativando-se diretamente o receptor EPO. Em determinadas modalidades, o ativador de receptor EPO é de uma classe de compostos com base na sequência de aminoácido 165 de EPO nativo e genericamente conhecidos como agentes estimulantes de eritropoiese (ESAs), exemplos destes são epoetina alfa, epoetina beta, epoetina delta, e epoetina ômega. Em outras modalidades, os ESAs incluem proteínas EPO sintéticas (SEPs) e derivados de EPO com modificações não-peptídicas que conferem propriedades farmacocinéticas desejáveis (meia-vida de circulação alongada), exemplos destes são darbepoetina alfa e metóxi-polietileno-

glicol epoetina beta. Em determinadas modalidades, um ativador de receptor EPO pode ser um agonista de receptor EPO que não incorpora a cadeia principal de polipeptídeo EPO ou não é genericamente classificado como um ESA. Esses agonistas de receptor EPO podem incluir, mas não se limitam a, miméticas peptídicas e não-peptídicas de EPO, anticorpos agonistas que direcionam o receptor EPO, proteínas de fusão que compreendem um domínio mimético de EPO, e agonistas limitados com duração estendida de receptor de eritropoietina (EREDLA).

[026]Em determinadas modalidades, um ativador de receptor EPO pode estimular eritropoiese indiretamente, sem contato com o próprio receptor EPO, acentuando-se a produção de EPO endógeno. Por exemplo, os fatores de transcrição induzíveis por hipóxia (HIFs) são estimulantes endógenos de expressão genética de EPO que são suprimidos (desestabilizados) sob condições normoxicas por mecanismos regulatórios celulares. Em parte, a revelação proporciona eritropoiese aumentada em um paciente por tratamento combinado com um GDF Trap e um ativador de receptor EPO indireto com propriedades estabilizantes de HIF, tal como um inibidor de prolil hidroxilase.

[027]Em determinados aspectos, a revelação proporciona métodos para administrar um polipeptídeo de GDF Trap a um paciente. Em parte, a revelação demonstra que os polipeptídeos de GDF Trap podem ser usados para aumentar os níveis de hemácias e hemoglobinas. Em parte, a revelação demonstra que os polipeptídeos de GDF Trap podem ser usados para tratar pacientes com eritropoiese ineficaz e reduzir uma ou mais condições associadas à eritropoiese ineficaz, tal como anemia, esplenomegalia, sobrecarga de ferro ou distúrbios ósseos. Em determinados aspectos, a revelação proporciona métodos para usar polipeptídeos de GDF Trap para tratar eritropoiese ineficaz em um paciente com talassemia enquanto reduz a necessidade por transfusão de hemácias e reduzir a morbidez e a mortalidade associadas à deposição de ferro em tecidos vulneráveis. Em particular, um polipep-

tídeo de GDF Trap pode ser usado desta forma para tratar síndromes β-talassemia, incluindo β-talassemia intermediaria. Os polipeptídeos de GDF Trap também podem ser usados para tratar ou prevenir outros usos terapêuticos, como promover o crescimento muscular. Em determinados casos, ao administrar um polipeptídeo de GDF Trap para promover o crescimento muscular, pode ser desejável monitorar os efeitos em hemácias durante a administração do polipeptídeo de GDF Trap, ou determinar ou ajustar a dosagem do polipeptídeo de GDF Trap, a fim de reduzir os efeitos indesejados em hemácias. Por exemplo, os aumentos em níveis de hemácias, níveis de hemoglobinas, ou níveis de hematócitos podem causar aumentos na pressão sanguínea.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[028]A Figura 1 mostra um alinhamento dos domínios extracelulares de ActRIIA humano (SEQ ID NO: 15) e ActRIIB humano (SEQ ID NO: 2) com os resíduos que são deduzidos no presente documento, com base em análise compósitas de múltiplas estruturas cristalinas de ActRIIB e ActRIIA para contatar diretamente o grande (a bolsa de ligação do ligante) indicado por caixas.

[029]A Figura 2 mostra um alinhamento de múltiplas sequências de várias proteínas ActRIIB de vertebrados e ActRIIA humano (SEQ ID NOs: 16-23).

[030]A Figura 3 mostra a sequência de aminoácido completa para GDF Trap ActRIIB (L79D 20-134)-hFc (SEQ ID NO: 11), incluindo a sequência líder TPA (sublinhado duplamente), domínio extracelular ActRIIB (resíduos 20-134 em SEQ ID NO: 1; sublinhado), e domínio hFc. O aspartato substituído na posição 79 na sequência nativa é sublinhado duplamente e realçado, assim como a glicina revelada por sequenciamento a ser o resíduo N-terminal na proteína de fusão madura.

[031]A Figura 4 mostra uma sequência de nucleotídeo que codifica ActRIIB (L79D 20-134)-hFc. SEQ ID NO: 25 corresponde ao filamento senso, e SEQ ID NO: 33 corresponde ao filamento anti-senso. O TPA líder (nucleotídeos 1-66) é sublinha-

do duplamente, e o domínio extracelular ActRIIB (nucleotídeos 76-420) é sublinhado.

[032]A Figura 5 mostra a sequência de aminoácido completa para o GDF Trap ActRIIB (L79D 25-131)-hFc truncado (SEQ ID NO: 26), incluindo o TPA líder (sublinhado duplamente), domínio extracelular ActRIIB truncado (resíduos 25-131 em SEQ ID NO: 1; sublinhado), e domínio hFc. O aspartato substituído na posição 79 na sequência nativa é sublinhado duplamente e realçado, assim como o glutamato revelado por sequenciamento a ser o resíduo N-terminal na proteína de fusão madura.

[033]A Figura 6 mostra uma sequência de nucleotídeo que codifica ActRIIB (L79D 25-131)-hFc. SEQ ID NO: 27 corresponde ao filamento senso, e SEQ ID NO: 34 corresponde ao filamento anti-senso. O TPA líder (nucleotídeos 1-66) é sublinhado duplamente, e o domínio extracelular ActRIIB truncado (nucleotídeos 76-396) é sublinhado. A sequência de aminoácido para o domínio extracelular ActRIIB (resíduos 25-131 em SEQ ID NO: 1) também é conhecida.

[034]A Figura 7 mostra a sequência de aminoácido para o GDF Trap ActRIIB (L79D 25-131)-hFc truncado sem um líder (SEQ ID NO: 28). O domínio extracelular ActRIIB truncado (resíduos 25-131 em SEQ ID NO: 1) é sublinhado. O aspartato substituído na posição 79 na sequência nativa é sublinhado duplamente e realçado, assim como o glutamato revelado por sequenciamento a ser o resíduo N-terminal na proteína de fusão madura.

[035]A Figura 8 mostra a sequência de aminoácido para o GDF Trap ActRIIB (L79D 25-131) truncado sem o líder, domínio hFc, e ligante (SEQ ID NO: 29). O aspartato substituído na posição 79 na sequência nativa é sublinhado e realçado, assim como o glutamato revelado por sequenciamento a ser o resíduo N-terminal na proteína de fusão madura.

[036]A Figura 9 mostra uma sequência de nucleotídeo alternativa que codifica ActRIIB (L79D 25-131)-hFc. SEQ ID NO: 30 corresponde ao filamento senso, e

SEQ ID NO: 35 corresponde ao filamento anti-senso. O TPA líder (nucleotídeos 1-66) é sublinhado duplamente, o domínio extracelular ActRIIB truncado (nucleotídeos 76-396) é sublinhado, e as substituições na sequência de nucleotídeo tipo selvagem do domínio extracelular são sublinhadas duplamente e realçadas (compare a SEQ ID NO: 27, Figura 6). A sequência de aminoácido para o domínio extracelular ActRIIB (resíduos 25-131 em SEQ ID NO: 1) também é conhecida.

[037]A Figura 10 mostra os nucleotídeos 76-396 (SEQ ID NO: 31) da sequência de nucleotídeo alternativa mostrada na Figura 9 (SEQ ID NO: 30). As mesmas substituições de nucleotídeo indicadas na Figura 9 também são sublinhadas e realçadas. SEQ ID NO: 31 codifica somente o domínio extracelular ActRIIB truncado (correspondente aos resíduos 25-131 em SEQ ID NO: 1) com uma substituição L79D, por exemplo, ActRIIB (L79D 25-131).

[038]A Figura 11 mostra o efeito de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc na concentração de hemoglobina em um modelo de camundongo de anemia induzida por quimioterapia. Os dados são médias  $\pm$  SEM. \*\*, P < 0,01 vs. paclitaxel no mesmo ponto de tempo. Este GDF Trap deslocou a anemia induzida por tratamento com paclitaxel.

[039]A Figura 12 mostra o efeito de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc nos níveis de hemácias (RBC) em um modelo de camundongo unilateralmente nefrectomizado (NEPHX) com doença renal crônica. Os dados são médias  $\pm$  SEM. \*\*\*, P < 0,001 vs. linha de base. O GDF Trap reverteu a anemia induzida por nefrectomia observada em camundongos de controle.

[040]A Figura 13 mostra o efeito de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc em níveis de hemácias (RBC), hemoglobinas (HGB), e hematócitos (HCT) em um modelo de camundongo unilateralmente nefrectomizado (NEPHX) com doença renal crônica. Os dados são alterações médias a partir da linha de base durante 4 semanas ( $\pm$  SEM). \*, P < 0,05; \*\*, P < 0,01; \*\*\*, P < 0,001 vs. controles NEPHX. Este GDF Trap evitou o declínio associado à nefrectomia nesses parâmetros eritrocíticos, aumentando cada

um por uma magnitude similar àquela em camundongos com rins intactos (simulados).

[041]A Figura 14 mostra o efeito de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc em níveis de hemácias (RBC) em um modelo de rato com anemia induzida por perda de sangue aguda. A remoção de sangue ocorreu no Dia 1, com dosagem nos Dias 0 e 3. Os dados são médias  $\pm$  SEM. \*\*, P < 0,01; \*\*\*, P < 0,001 vs. veículo no mesmo ponto de tempo. Este GDF Trap aperfeiçoou a taxa e a extensão de recuperação a partir da anemia induzida por perda de sangue.

[042]A Figura 15 mostra o efeito de tratamento com ActRIIB (L79D 20-134)-hFc (cinza) ou ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (preto) na alteração absoluta na concentração de hemácias a partir da linha de base em macacos cinomolgos. VEH = veículo. Os dados são médias  $\pm$  SEM. n = 4-8 por grupo.

[043]A Figura 16 mostra o efeito do tratamento com ActRIIB (L79D 20-134)-hFc (cinza) ou ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (preto) na alteração absoluta em hematócitos a partir da linha de base em macacos cinomolgos. VEH = veículo. Os dados são médias  $\pm$  SEM. n = 4-8 por grupo.

[044]A Figura 17 mostra o efeito do tratamento com ActRIIB (L79D 20-134)-hFc (cinza) ou ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (preto) na alteração absoluta na concentração de hemoglobina a partir da linha de base em macacos cinomolgos. VEH = veículo. Os dados são médias  $\pm$  SEM. n = 4-8 por grupo.

[045]A Figura 18 mostra o efeito do tratamento com ActRIIB (L79D 20-134)-hFc (cinza) ou ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (preto) na alteração absoluta na concentração de reticulócito circulante a partir da linha de base em macacos cinomolgos. VEH = veículo. Os dados são médias  $\pm$  SEM. n = 4-8 por grupo.

[046]A Figura 19 mostra o efeito do tratamento combinado com eritropoietina (EPO) e ActRIIB (L79D 25-131)-hFc durante 72 horas em hematócrito em camundongos. Os dados são médias  $\pm$  SEM (n = 4 por grupo), e médias que sejam signifi-

cativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ , teste-t não-pareado) são designadas por letras diferentes. O tratamento combinado aumentou o hematócrito em 23% comparado ao veículo, um aumento sinérgico maior que a soma dos efeitos separados de EPO e ActRIIB (L79D 25-131)-hFc.

[047]A Figura 20 mostra o efeito do tratamento combinado com EPO e ActRIIB (L79D 25-131)-hFc durante 72 horas em concentrações de hemoglobina em camundongos. Os dados são médias  $\pm$  SEM ( $n = 4$  por grupo), e médias que sejam significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ) são designadas por letras diferentes. O tratamento combinado aumentou as concentrações de hemoglobina em 23% comparado ao veículo, que também era um efeito sinérgico.

[048]A Figura 21 mostra o efeito do tratamento combinado com EPO e ActRIIB (L79D 25-131)-hFc durante 72 horas em concentrações de hemácias em camundongos. Os dados são médias  $\pm$  SEM ( $n = 4$  por grupo), e médias que sejam significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ) são designadas por letras diferentes. O tratamento combinado aumentou as concentrações de hemácias em 20% comparado ao veículo, que também era um efeito sinérgico.

[049]A Figura 22 mostra o efeito do tratamento combinado com EPO e ActRIIB (L79D 25-131)-hFc durante 72 horas em várias células precursoras eritropoéticas no baço de camundongos. Os dados são médias  $\pm$  SEM ( $n = 4$  por grupo), e médias que sejam significativamente diferentes entre si ( $p < 0,01$ ) são designadas por letras diferentes. Enquanto o EPO sozinho aumentou o número de eritroblastos basofílicos (BasoE) dramaticamente à custa da maturação de precursor em estágio tardio, o tratamento combinado aumentou os números de BasoE a um mínimo, mas ainda a uma extensão significativa enquanto suportava a maturação não-reduzida de precursores em estágio tardio.

[050]A Figura 23 compara os parâmetros RBC em um modelo de camundongo *Hbb<sup>-/-</sup>* de β-talassemia com aqueles em camundongos tipo selvagem (WT).

Amostras de sangue de camundongos não-tratados em 2 a 6 meses de idade foram analisadas para determinar o número da concentração de hemácias (RBC; A), hematócitos (HCT; B), e hemoglobinas (Hgb; C). Os dados são médias ± SEM ( $n = 4$  por grupo), \*\*\*,  $p < 0,001$ . Confirmou-se que os camundongos  $Hbb^{-/-}$  estavam gravemente anêmicos.

[051]A Figura 24 mostra o efeito de ActRIIB (L79D 25-131)-mFc no número de RBC em um modelo de camundongo  $Hbb^{-/-}$  de β-talassemia. Amostras de sangue foram coletadas após 4 semanas de tratamento. Os dados são médias de 2 por grupo, com barras indicando a faixa. O tratamento com ActRIIB (L79D 25-131)-mFc reduziu pela metade o déficit de RBC presente em camundongos  $Hbb^{-/-}$ .

[052]A Figura 25 mostra o efeito de ActRIIB (L79D 25-131)-mFc na morfologia RBC em um modelo de camundongo  $Hbb^{-/-}$  de β-talassemia. As imagens de manchas de sangue tingidas com Giemsa de camundongos tratados durante 4 semanas foram obtidas em ampliação de 100x. Notou-se hemólise, detritos celulares, e muitos RBCs pequenos ou irregularmente conformados a partir de camundongos  $Hbb^{-/-}$  tratados com veículo. A título de comparação, o tratamento de ActRIIB (L79D 25-131)-mFc reduziu consideravelmente a hemólise, detritos, e a ocorrência de RBCs irregularmente conformados enquanto aumentou o número de RBCs normalmente conformados.

[053]A Figura 26 mostra o efeito do tratamento de ActRIIB (L79D 25-131)-mFc durante 2 meses no número RBC em um modelo de camundongo  $Hbb^{-/-}$  de β-talassemia, com dados dos camundongos tipo selvagem dosados com veículo incluídos para comparação. Os dados são médias ± SEM;  $n = 7$  por grupo. \*\*,  $P < 0,01$  vs. camundongos  $Hbb^{-/-}$  tratados com veículo. O tratamento com ActRIIB (L79D 25-131)-mFc reduziu o déficit RBC médio em camundongos  $Hbb^{-/-}$  em mais de 50%.

[054]A Figura 27 mostra o efeito do tratamento de ActRIIB (L79D 25-131)-mFc durante 2 meses em níveis de bilirrubina sérica em um modelo de camundongo

*Hbb<sup>-/-</sup>* de β-talassemia, com dados de camundongos tipo selvagem dosados com veículo incluídos para comparação. Os dados são médias ± SEM. # # #, P < 0,001 vs. camundongos tipo selvagem tratados com veículo; \*, P < 0,05 vs. camundongos *Hbb<sup>-/-</sup>* tratados com veículo. O tratamento com ActRIIB (L79D 25-131)-mFc reduziu os níveis de bilirrubina total significativamente em camundongos *Hbb<sup>-/-</sup>*.

[055]A Figura 28 mostra o efeito do tratamento de ActRIIB (L79D 25-131)-mFc durante 2 meses em nível EPO sérico em um modelo de camundongo *Hbb<sup>-/-</sup>* de β-talassemia, com dados de camundongos tipo selvagem dosados com veículo incluídos para comparação. Os dados são médias ± SEM. # # #, P < 0,001 vs. camundongos tipo selvagem tratados com veículo; \*, P < 0,05 vs. camundongos *Hbb<sup>-/-</sup>* tratados com veículo. O tratamento com ActRIIB (L79D 25-131)-mFc reduziu os níveis EPO circulantes médios em mais de 60% em camundongos *Hbb<sup>-/-</sup>*.

[056]A Figura 29 mostra o efeito de ActRIIB (L79D 25-131)-mFc em esplenomegalia em um modelo de camundongo *Hbb<sup>-/-</sup>* de β-talassemia, com dados de camundongos tipo selvagem tratados com veículo incluídos para comparação. A. Médias ± SEM de camundongos iniciando em 3 meses de idade após o tratamento com 1 mg/kg duas vezes por semana durante 2 meses. # # #, P < 0,001 vs. camundongos tipo selvagem tratados com veículo; \*, P < 0,05 vs. camundongos - *Hbb<sup>-/-</sup>* tratados com veículo. B. Tamanhos representativos do baço, conforme observado em um estudo separado em camundongos iniciando em 6 a 8 meses de idade após o tratamento com 1 mg/kg duas vezes por semana durante 3 meses. O tratamento com ActRIIB (L79D 25-131)-mFc reduziu o peso do baço significativamente em camundongos *Hbb<sup>-/-</sup>*.

[057]A Figura 30 mostra o efeito do tratamento de ActRIIB (L79D 25-131)-mFc durante 2 meses em densidade mineral óssea em um modelo de camundongo *Hbb<sup>-/-</sup>* de β-talassemia, com dados de camundongos tipo selvagem dosados com veículo incluídos para comparação. Médias ± SEM com base na análise femural. #,

$P < 0,05$  vs. camundongos tipo selvagem tratados com veículo; \*,  $P < 0,05$  vs. camundongos  $Hbb^{-/-}$  tratados com veículo. O tratamento com ActRIIB (L79D 25-131)-mFc normalizou a densidade mineral óssea em camundongos  $Hbb^{-/-}$ .

[058]A Figura 31 mostra o efeito do tratamento de ActRIIB (L79D 25-131)-mFc durante 2 meses em parâmetros de homeostase de ferro em um modelo de camundongo  $Hbb^{-/-}$  de  $\beta$ -talassemia. Médias  $\pm$  SEM para ferro sérico (A), ferritina sérica (B), e saturação de transferina (C). \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$  vs. camundongos  $Hbb^{-/-}$  tratados com veículo. O tratamento com ActRIIB (L79D 25-131)-mFc reduziu cada medida de sobrecarga de ferro significativamente em camundongos  $Hbb^{-/-}$ .

[059]A Figura 32 mostra o efeito do tratamento de ActRIIB (L79D 25-131)-mFc durante 2 meses em sobrecarga de ferro tecidual em um modelo de camundongo  $Hbb^{-/-}$  de  $\beta$ -talassemia. Os níveis de ferro em seções de tecido (200  $\mu\text{m}$ ) do baço (A-C), fígado (D-F), e rins (G-I) foram determinados por coloração com azul da Prússia de Perl. A coloração de ferro em baço tipo selvagem (A) foi abundante na polpa vermelha (setas), mas ausente na polpa branca (\*). Uma coloração de ferro aumentada no baço de camundongos  $Hbb^{-/-}$  (B) reflete a expansão das regiões de polpa vermelha devido à eritropoiese extramedular. ActRIIB (L79D 25-131)-mFc em camundongos  $Hbb^{-/-}$  diminuiu a eritropoiese esplênica e restaurou o padrão tipo selvagem de coloração de ferro esplênica (C). Além disso, uma coloração de ferro anormal em células hepáticas de Kupffer (H, setas) e no córtex renal (E, setas) de camundongos  $Hbb^{-/-}$  foi normalizada por ActRIIB (L79D 25-131)-mFc (F e I). Ampliação, 200x.

[060]A Figura 33 mostra o efeito do tratamento de ActRIIB (L79D 25-131)-mFc durante 2 meses em níveis hepáticos de mRNA de hepcidina em um modelo de camundongo  $Hbb^{-/-}$  de  $\beta$ -talassemia. Médias  $\pm$  SEM; \*,  $P < 0,05$  vs. camundongos  $Hbb^{-/-}$  tratados com veículo. O tratamento com ActRIIB (L79D 25-131)-mFc aumentou a expressão de mRNA de hepcidina significativamente em camundongos  $Hbb^{-/-}$ .

[061]A Figura 34 mostra o efeito de ActRIIB (L79D 25-131)-mFc em níveis circulantes de espécies de oxigênio reativo (ROS) em um modelo de camundongo *Hbb<sup>-/-</sup>* de β-talassemia, com dados de camundongos tipo selvagem dosados com veículo incluídos para comparação. Os dados são médias geométricas ± SEM. # # #, P < 0,001 vs. camundongos tipo selvagem tratados com veículo; \*\*\*, P < 0,001 vs. camundongos *Hbb<sup>-/-</sup>* tratados com veículo. O tratamento com ActRIIB (L79D 25-131)-mFc reduziu ROS significativamente em camundongos *Hbb<sup>-/-</sup>*.

#### DESCRÍÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

##### Visão geral

[062]A superfamília de fator-beta de crescimento de transformação beta (TGF-beta) contém uma variedade de fatores de crescimento que compartilham elementos de sequência e motivos estruturais em comum. Essas proteínas são conhecidas por exercerem efeitos biológicos em uma grande variedade de tipos de células tanto em vertebrados como em invertebrados. Os membros da superfamília realizam funções importantes durante o desenvolvimento embrionário na formação de padrão e especificação de tecido e pode influenciar uma variedade de processos de diferenciação, incluindo adipogênese, miogênese, condrogênese, cardiogênese, hematopoiese, neurogênese, e diferenciação celular epitelial. Manipulando-se a atividade de um membro da família TGF-beta, geralmente é possível induzir alterações fisiológicas significativas em um organismo. Por exemplo, as raças de gado Piedmontese e Belgian Blue portam uma mutação de perda de função no gene GDF8 (também denominado como miostatina) que causa um aumento considerável na massa muscular. Grobet et al., Nat Genet. 1997, 17(1):71-4. Adicionalmente, em seres humanos, alelos inativos de GDF8 estão associados a uma massa muscular aumentada e, conforme relatado, excepcional força. Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350:2682-8.

[063]Os sinais TGF-β são mediados por complexos heteroméricos de recep-

tores de quinase serina/treonina tipo I e tipo II, que fosforilam e ativam a jusante proteínas Smad mediante um estímulo ligante (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178). Esses receptores tipo I e tipo II são proteínas transmembranares, compostas por um domínio extracelular de ligação ao ligante com uma região rica em cisteína, um domínio transmembranar, e um domínio citoplásmico com especificidade prevista de serina/treonina. Os receptores tipo I são essenciais para sinalização. Os receptores tipo II são necessários para ligar ligantes e para expressão de receptores tipo I. Os receptores de activinas tipos I e II formam um complexo estável após a ligação de ligante, resultando em fosforilação de receptores tipo I pelos receptores tipo II.

[064]Dois receptores tipo II relacionados (ActRII), ActRIIA e ActRIIB foram identificados como os receptores tipo II para activinas (Mathews and 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- $\beta$ , incluindo BMP7, Nodal, GDF8, e GDF11 (Yamashita et al., 1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee and McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311; Yeo and Whitman, 2001, Mol. Cell 7: 949-957; Oh et al., 2002, Genes Dev. 16:2749-54). ALK4 é o receptor tipo I primário para activinas, particularmente para activina A, e ALK-7 pode servir como um receptor para activinas, particularmente para activina B. Em determinadas modalidades, a presente invenção se refere a antagonizar um ligante de receptores ActRIIB (também referido como um ligante ActRIIB) com um polipeptídeo de GDF Trap em questão. Ligantes exemplificadores de receptores ActRIIB incluem alguns dos membros da família TGF- $\beta$ , como activina A, activina B, Nodal, GDF8, GDF11, e BMP7.

[065]As activinas são fatores de crescimento de polipeptídeo dimérico que pertencem à superfamília TGF-beta. Existem três formas de activina principal (A, B, e AB) que são homo/heterodímeros de duas subunidades  $\beta$  estritamente relaciona-

das ( $\beta_A\beta_A$ ,  $\beta_B\beta_B$ , e  $\beta_A\beta_B$ , respectivamente). O genoma humano também codifica uma activina C e uma activina E, que são primariamente expressos no fígado, e formas heterodiméricas contendo  $\beta_C$  ou  $\beta_E$  também são conhecidas. Na superfamília TGF-beta, as activinas são fatores exclusivos e multifuncionais que podem estimular a produção de hormônios em células ovarianas e placentárias, suportar a sobrevivência de células neuronais, influenciar no progresso de ciclo celular positiva ou negativamente dependendo do tipo de célula, e induzir diferenciação mesodermal pelo menos em embriões de anfíbios (DePaolo et al., 1991, Proc Soc Ep Biol Med. 198:500-512; Dyson et al., 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963). Ademais, constatou-se que o fator de diferenciação de eritróide (EDF) isolado das células leucêmicas monocíticas humanas estimuladas é idêntico à activina A (Murata et al., 1988, PNAS, 85:2434). Sugeriu-se que a activina A promove eritropoiese 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) proveniente da glândula pituitária, a activina promove secreção e síntese de FSH, enquanto a inibina evita a secreção e a síntese de FSH. Outras proteínas que podem regular a bioatividade de activina e/ou se ligarem à activina incluem folistatina (FS), proteína relacionada à folistatina (FSRP) e  $\alpha_2$ -macroglobulina.

[066]As proteínas nodais têm funções na indução e na formação de mesoderma e endoderma, bem como na organização subsequente de estruturas axiais, como coração e estomago em embriogênese precoce. Demonstrou-se que o tecido dorsal em um embrião de vertebrado em desenvolvimento contribui predominantemente para as estruturas axiais da placa notocordal e pré-cordal enquanto recruta células adjacentes para formar estruturas embrionárias não-axiais. Nodal aparenta sinalizar através de receptores tipo I e tipo II e efetores intracelulares conhecidos como proteínas Smad. Estudos recentes apóiam a ideia que ActRIIA e ActRIIB ser-

vem como receptores tipo II para Nodal (Sakuma et al., *Genes Cells.* 2002, 7:401-12). Sugere-se que os ligantes Nodais interagem com seus co-fatores (por exemplo, cripto) para ativar receptores tipo I e tipo II de activina, que fosforilam Smad2. As proteínas Nodais são implicadas em muitos eventos fundamentais aos embriões de vertebrados precoces, incluindo a formação de mesoderma, padronização anterior, e especificação de eixo geométrico esquerdo-direito. Demonstrou-se uma evidência experimental que a sinalização Nodal ativa pAR3-Lux, um repórter de luciferase previamente mostrado por responder especificamente à activina e TGF-beta. No entanto, Nodal é incapaz de induzir pTlx2-Lux, um repórter especificamente responsável pelas proteínas morfogênicas ósseas. Resultados recentes proporcionam uma evidência bioquímica direta que a sinalização Nodal é mediada por Smads de trajetória activina-TGF-beta, Smad2 e Smad3. Mostrou-se uma evidência adicional que a proteína cripto extracelular é necessária para sinalização Nodal, tornando-a distinta da activina ou sinalização TGF-beta.

[067]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 expresso no desenvolvimento de músculos esqueléticos adultos. A mutação nula GDF8 em camundongos transgênicos é caracterizada por uma hiperfrofia e hiperplasia consideráveis do músculo esquelético (McPherron et al., *Nature*, 1997, 387:83-90). Aumentos similares na massa muscular esquelética são evidentes em mutações de ocorrência natural de GDF8 em gado (Ashmore et al., 1974, *Growth*, 38:501-507; Swatland and Kieffer, *J. Anim. Sci.*, 1994, 38:752-757; McPherron and Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94:12457-12461; 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 mostraram que a atrofia muscular associada à infecção por HIV em seres humanos é acompanhada por aumentos na expressão de 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 quinase) e modular a proliferação de células de mioblasto (WO 00/43781). O pró-peptídeo GDF8 pode se ligar de modo não-covalente ao dímero de domínio 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 a GDF8 ou proteínas estruturalmente relacionadas e inibem sua atividade biológica incluem folistatina, e, potencialmente, proteínas relacionadas à folistatina (Gamer et al. (1999) Dev. Biol., 208: 222-232).

[068]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 expresso no broto da cauda, broto dos membros, arcos maxilares e mandibulares, e gânglios da raiz dorsal durante o desenvolvimento do camundongo (Nakashima et al., 1999, Mech. Dev. 80: 185-189). GDF11 representa um papel exclusivo na padronização de tecidos mesodérmicos e neurais (Gamer et al., 1999, Dev Biol., 208:222-32). GDF11 se mostrou ser um regulador negativo de condrogênese e miogênese no desenvolvimento de membros de galinhas (Gamer et al., 2001, Dev Biol. 229:407-20). A expressão de GDF11 nos músculos também sugere seu papel na regulação do crescimento muscular em uma forma similar a GDF8. Além disso, a expressão de GDF11 no cérebro sugere que GDF11 também pode possuir atividades que se referem à função do sistema nervoso. De modo interessante, constatou-se que GDF11 inibe a neurogênese no epitélio olfativo (Wu et al., 2003, Neuron. 37:197-207).

[069]A proteína morfogenética óssea (BMP7), também denominada como proteína-1 osteogênica (OP-1), é bem conhecida por induzir a formação de cartilagens e ossos. Além disso, BMP7 regula uma grande variedade de processos fisiológicos. Por exemplo, BMP7 pode ser o fator osteoindutivo responsável pelo fenômeno

de osteogênese epitelial. Constatou-se, também, que BMP7 representa um papel na regulação de cálcio e homeostase óssea. Assim como a activina, BMP7 se liga a receptores tipo II, ActRIIA e ActRIIB. No entanto, BMP7 e activina recrutam receptores tipo I distintos em complexos receptor heteroméricos. O receptor tipo I BMP7 principal observado era ALK2, enquanto a activina era ligada exclusivamente a ALK4 (ActRIIB). BMP7 e activina produziram respostas biológicas distintas e ativaram diferentes trajetórias Smad (Macias-Silva et al., 1998, J Biol Chem. 273:25628-36).

[070]Conforme demonstrado no presente documento, um polipeptídeo de GDF Trap, que é um polipeptídeo ActRIIB variante (ActRIIB), é mais eficaz em aumentar os níveis de hemácias *in vivo* comparado a um polipeptídeo ActRIIB solúvel tipo selvagem e tem efeitos benéficos em uma variedade de modelos para anemias e eritropoiese ineficaz. Adicionalmente, mostrou-se que o uso de um polipeptídeo de GDF Trap em combinação com um ativador de receptor EPO causa um aumento substancial na formação de hemácias. Deve-se notar que a hematopoiese é um processo complexo, regulado por uma variedade de fatores, incluindo eritropoietina, G-CSF e homeostase de ferro. Os termos “aumentar os níveis de hemácias” e “promover a formação de hemácias” se referem a métricas clinicamente observáveis, como contagens de hematócitos, hemácias e medições e hemoglobinas, e são destinados a serem neutros quanto ao mecanismo pelo qual as alterações ocorrem.

[071]Além de estimular os níveis de hemácias, os polipeptídeos de GDF Trap são úteis para uma variedade de aplicações terapêuticas, incluindo, por exemplo, promover o crescimento muscular (vide as Publicações PCT Nos. WO 2006/012627 e WO 2008/097541, que se encontram aqui incorporadas em suas totalidades a título de referência). Em determinados casos, ao administrar um polipeptídeo de GDF Trap para o propósito de aumentar os músculos, pode ser desejável reduzir ou minimizar os efeitos sobre as hemácias. Monitorando-se vários parâmetros hematológicos em pacientes sendo tratados, ou que sejam candidatos para o

tratamento com um polipeptídeo de GDF Trap, uma dosagem apropriada (incluindo quantidades e frequência de administração) pode ser determinada com base nas necessidades de um paciente individual, parâmetros hematológicos de linha de base, e propósito para o tratamento. Adicionalmente, o progresso e efeitos terapêuticos em um ou mais parâmetros hematológicos com o passar do tempo podem ser úteis no gerenciamento de pacientes sendo dosados com um polipeptídeo de GDF Trap facilitando-se os cuidados do paciente, determinando a dosagem de manutenção apropriada (tanto quantidades como frequência), etc.

[072]EPO é um hormônio de glicoproteína envolvido no crescimento e maturação de células progenitoras de eritróide em eritrócitos. EPO é produzido pelo fígado durante a vida fetal e pelos rins em adultos. A produção reduzida de EPO, que comumente ocorre em adultos como consequência de insuficiência renal, leva à anemia. EPO vem sendo produzida por técnicas de engenharia genética com base na expressão e secreção da proteína a partir de uma célula hospedeira transfetada com o gene EPO. A administração de tal EPO recombinante vem sendo eficaz no tratamento de anemia. Por exemplo, Eschbach et al. (1987, N Engl J Med 316:73) descreve o uso de EPO para corrigir a anemia causada por insuficiência crônica renal.

[073]Os efeitos de EPO são mediados através de saída ligação, e ativação, a um receptor de superfície celular pertencente à superfamília de receptores de citocina e designados como receptor EPO. Os receptores EPO de humanos e murinos foram clonados e expressados (D'Andrea et al., 1989, Cell 57:277; Jones et al., 1990, Blood 76:31; Winkelman et al., 1990, Blood 76:24; WO 90/08822/Patente U.S. No. 5.278.065). O gene de receptor EPO humano codifica uma proteína transmembranar de aminoácido 483 que compreende um domínio extracelular de aproximadamente 224 aminoácidos e exibe aproximadamente 82% de identidade de sequência de aminoácido ao receptor EPO de murino (vide a Patente U.S. No. 6.319.499).

O receptor EPO de comprimento completo clonado expressado em células de mamíferos (66-72 kDa) se liga a EPO com uma afinidade ( $K_D = 100\text{-}300 \text{ nM}$ ) similar àquela do receptor nativo em células progenitoras de eritróide. Logo, imagina-se que esta forma contenha o determinante de ligação de EPO principal e seja referida como receptor EPO. Por analogia com outros receptores de citocina estritamente relacionados, imagina-se que o receptor EPO se dimerize mediante uma ligação de agonista. Todavia, a estrutura detalhada do receptor EPO, que pode ser um complexo multimérico, e seu mecanismo específico de ativação não são completamente compreendidos (Patente U.S. No. 6.319.499).

[074]A ativação do receptor EPO resulta em vários efeitos biológicos. Estes incluem a proliferação aumentada de eritroblastos imaturos, diferenciação aumentada de eritroblastos imaturos, e apoptose reduzida em células progenitoras de eritróide (Liboi et al., 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:11351-11355; Koury et al., 1990, Science 248:378-381). As trajetórias de transdução de sinal de receptor EPO que mediavam a proliferação e a diferenciação aparentam ser distintas (Noguchi et al., 1988, Mol Cell Biol 8:2604; Patel et al., 1992, J Biol Chem 1992, 267:21300; Liboi et al., ibid). Alguns resultados sugerem que uma proteína acessória pode ser necessária para mediação do sinal de diferenciação (Chiba et al., 1993, Nature 362:646; Chiba et al., 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:11593); no entanto, há controvérsia referente ao papel das proteínas acessórias na diferenciação visto que uma forma constitutivamente ativada do receptor pode estimular tanto a proliferação como a diferenciação (Pharr et al., 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:938).

[075]Os ativadores de receptor EPO incluem agentes estimulantes de eritropoiese de moléculas pequenas (ESAs) bem como compostos à base de EPO. Um exemplo do primeiro é um agonista à base de peptídeo dimérico covalentemente ligado a polietileno glicol (nome proprietário Hematida), que mostrou propriedades estimulantes de eritropoiese em voluntários saudáveis e em pacientes com doença

renal crônica e anticorpos anti-EPO endógenos (Stead et al., 2006, Blood 108:1830-1834; Macdougall et al., 2009, N Engl J Med 361:1848-1855). Outros exemplos incluem ESAs à base de não-peptídeo (Qureshi et al., 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96:12156-12161).

[076]Os ativadores de receptor EPO também incluem compostos que estimulam eritropoiese indiretamente, sem contatar o próprio receptor EPO, acentuando a produção de EPO endógeno. Por exemplo, os fatores de transcrição induzíveis por hipoxia (HIFs) são estimulantes endógenos de expressão de gene EPO que são suprimidos (desestabilizados) sob condições normóxicas por mecanismos regulatórios celulares. Portanto, os inibidores de enzimas HIF prolil hidroxilase estão sendo investigados para determinação da atividade de indução de EPO in vivo. Outros ativadores indiretos de receptor EPO incluem inibidores de fator de transcrição GATA-2 (Nakano et al., 2004, Blood 104:4300-4307), que inibem tonicamente a expressão de gene EPO, e inibidores de fosfatase de célula hemopoietica (HCP ou SHP-1), que funcionam como um regulador negativo de transdução de sinal de receptor EPO (Klingmuller et al., 1995, Cell 80:729-738).

[077]Os termos usados neste relatório descritivo têm, em geral, significados comuns na técnica, dentro do contexto desta invenção e no contexto específico onde cada termo é usado. Determinados termos serão discutidos abaixo ou em qualquer parte deste relatório descritivo, para proporcionar diretrizes adicionais ao médico ao descrever as composições e métodos da invenção e como produzi-los e usá-los. O escopo ou significado de qualquer uso de um termo ficará aparente a partir do contexto específico no qual o termo é usado.

[078]“Cerca de” e “aproximadamente” devem significar genericamente um grau aceitável de erro para a quantidade medida dada a natureza ou a precisão das medições. Tipicamente, graus exemplificadores de erro estão dentro de 20 por cento (%), de preferência, dentro de 10%, e, com mais preferência, dentro de 5% de um

dado valor ou faixa de valores.

[079]Alternativamente, e particularmente em sistemas biológicos, os termos “cerca de” e “aproximadamente” podem significar valores que estejam dentro de uma ordem de magnitude, de preferência, dentro de 5 vezes e, com mais preferência, dentro de 2 vezes de um dado valor. As quantidades numéricas dadas são aproximadas exceto onde declarado em contrário, significando que o termo “cerca de” ou “aproximadamente” pode ser inferido quando não expressamente declarado.

[080]Os métodos da invenção podem incluir etapas de comparar sequências entre si, incluindo uma sequência tipo selvagem a um ou mais mutantes (variantes de sequência). Essas comparações compreendem tipicamente alinhamentos de sequências poliméricas, por exemplo, usando programas e/ou algoritmos de alinhamento de sequências que sejam bem conhecidos na técnica (por exemplo, BLAST, FASTA e MEGALIGN, para citar alguns). Um indivíduo versado pode avaliar prontamente que, nesses alinhamentos, onde uma mutação contém uma inserção ou exclusão de resíduo, o alinhamento de sequência introduzirá uma “lacuna” (tipicamente representada por um traço, ou “A”) na sequência de polímero não contendo o resíduo inserido ou excluído.

[081]“Homólogo” em todas as formas gramaticais e variações de ortografia, se refere à relação entre duas proteínas que possuem uma “origem evolucionária comum” incluindo proteínas das superfamílias na mesma espécie de organismo, bem como proteínas homólogas de diferentes espécies de organismos. Essas proteínas (e seus ácidos nucléicos de codificação) 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.

[082]O termo “similaridade de sequência” em todas as formas gramaticais, se refere ao grau de identidade ou correspondência entre sequências de ácidos nu-

cléicos ou aminoácidos que podem ou não compartilhar uma origem evolucionária comum.

[083]No entanto, em uso comum e no pedido instantâneo, o termo “homólogo” quando modificado com um advérbio, como “altamente”, pode se referir a uma similaridade de sequência e pode ou não se relacionar a uma origem evolucionária comum.

## 2. Polipeptídeos de GDF Trap

[084]Em determinados aspectos, a invenção se refere a polipeptídeos de GDF Trap, por exemplo, polipeptídeos ActRIIB variantes solúveis, incluindo, por exemplo, fragmentos, variantes funcionais, e formas modificadas de polipeptídeos ActRIIB. Em determinadas modalidades, os polipeptídeos de GDF Trap têm pelo menos uma atividade biológica similar ou igual a um polipeptídeo ActRIIB tipo selvagem correspondente. Por exemplo, um polipeptídeo de GDF Trap da invenção pode se ligar a, e inibir a função de, um ligante ActRIIB (por exemplo, activina A, activina AB, activina B, Nodal, GDF8, GDF11 ou BMP7). Opcionalmente, um polipeptídeo de GDF Trap aumenta os níveis de hemácias. Exemplos de polipeptídeos de GDF Trap incluem polipeptídeos precursores ActRIIB humanos (SEQ ID NO: 1 ou 39) tendo uma ou mais variações de sequência, e polipeptídeos ActRIIB humanos solúveis (por exemplo, SEQ ID NOs: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 e 41) tendo uma ou mais variações de sequência.

[085]Conforme o uso em questão, o termo “ActRIIB” se refere a uma família de proteínas de receptor de activina tipo IIb (ActRIIB) de qualquer espécie e variantes derivadas de tais proteínas ActRIIB por mutagênese ou outra modificação. Compreende-se que a referência a ActRIIB no presente documento é uma referência a qualquer uma das formas atualmente identificadas. Os membros da família ActRIIB são geralmente proteínas transmembranares, compostas por um domínio extracelular de ligação ao ligante com uma região rica em cisteína, um domínio transmembra-

nar, e um domínio citoplásmico com atividade de serina/treonina quinase prevista. As sequências de aminoácidos de domínio extracelular solúvel ActRIIA humano (proporcionadas para comparação) e domínio extracelular solúvel ActRIIB são ilustradas na Figura 1.

[086]O termo “polipeptídeo ActRIIB” inclui polipeptídeos que compreendem qualquer polipeptídeo de ocorrência natural de um membro da família ActRIIB, bem como quaisquer variantes deste (incluindo mutantes, fragmentos, fusões, e formas peptidomiméticas) que retenham uma atividade útil. Vide, por exemplo, o documento WO 2006/012627. Por exemplo, polipeptídeos ActRIIB incluem polipeptídeos derivados a partir da sequência de qualquer ActRIIB conhecido tendo uma sequência pelo menos cerca de 80% idêntica à sequência de um polipeptídeo ActRIIB, e opcionalmente pelo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% ou mais de identidade. Por exemplo, um polipeptídeo ActRIIB pode se ligar a, e inibir a função de, uma proteína ActRIIB e/ou activina. Um polipeptídeo ActRIIB que é um GDF Trap pode ser selecionado por atividade em promover a formação de hemácias *in vivo*. Exemplos de polipeptídeos ActRIIB incluem um polipeptídeo precursor ActRIIB humano (SEQ ID NO: 1 e 39) e polipeptídeos solúveis ActRIIB humanos (por exemplo, SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 e 41). A numeração de aminoácidos para todos os polipeptídeos relacionados a ActRIIB descritos o presente documento se baseia na numeração para SEQ ID NO:1, exceto onde especificamente designado em contrário.

[087]A sequência de proteína precursora ActRIIB humana é a seguinte:

[088]MTAPWVALALLW GSLWPGS GRGEAETRECIYYNANWELERT**NQSG**  
**LERCEGEQDKRLHCYASWR**NSSGTIELVKKGCWLDDNCYDRQECVATEENPQV  
YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT**LLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAF**  
WMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRGCVWKAQLMND  
FVAVKIFPLQDKQSWSEREIFSTPGMKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHD  
KGSLTDYLKGNIITWNELCHVAETMSRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSK

NVLLKSDLTAVLADFGLAVRFEPGKPPGDTHQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAF  
 LRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEETIGQHPSLEELQEVVVKMR  
 PTIKDHWLKHPLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTSDCL  
 VSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEQ ID NO: 1)

[089]O peptídeo de sinal é sublinhado uma vez; o domínio extracelular está em negrito e os sítios de glicosilação N-ligados potenciais estão em caixas.

[090]Uma forma com uma alanina na posição 64 também é reportada na literatura, da seguinte forma:

[091]MTAPWVALALLW GSLWPGS**GRGEAETRECIYYNANWELERT**NQSG  
LERCEGEQDKRLHCYASWA**NSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQV**  
**YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT**LLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAF  
 WMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRGCVWKAQLMND  
 FVAVKIFPLQDKQSWSEREIFSTPGMKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHD  
 KGSLTDYLKGNIITWNELCHVAETMSRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSK  
 NVLLKSDLTAVLADFGLAVRFEPGKPPGDTHQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAF  
 LRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEETIGQHPSLEELQEVVVKMR  
 PTIKDHWLKHPLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTSDCL  
 VSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEQ ID NO: 39)

[092]A sequência de polipeptídeo processado solúvel (extracelular) ActRIIB humano é a seguinte:

[093]GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSG**LERCEGEQDKRLHCYASWRN**  
**SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVY**FCCCEGNFCNERFTHLPEAG  
GPEVTYEPPPTAPT (SEQ ID NO: 2)

[094]A forma alternativa com um A64 é a seguinte:

[095]GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSG**LERCEGEQDKRLHCYASWA**  
**NNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVY**FCCCEGNFCNERFTHLPEAG  
GPEVTYEPPPTAPT (SEQ ID NO: 40)

[096] Em algumas condições, a proteína pode ser produzida com uma sequência “SGR...” na terminação N. A “cauda” C-terminal do domínio extracelular é sublinhada. A sequência com a “cauda” excluída (uma sequência Δ15) é a seguinte:

[097] GRGEAETRECIYYNANWEERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRN  
 SSGTIELVKKGWCWLDLDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA  
 (SEQ ID NO: 3)

[098] A forma alternativa com um A64 é a seguinte:

[099] GRGEAETRECIYYNANWEERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWAN  
 SSGTIELVKKGWCWLDLDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA  
 (SEQ ID NO: 41)

[0100] Em algumas condições, a proteína pode ser produzida com uma sequência “SGR...” na terminação N. A sequência de ácido nucléico que codifica uma proteína precursora ActRIIB humana é a seguinte: (nucleotídeos 5-1543 de entrada Genbank NM\_001106) (a sequência conforme mostrada proporciona uma alanina na posição 64, e pode ser modificada para proporcionar uma arginina no lugar)

[0101] ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTGCCCTCCTCTGGGGATCGCT  
 GTGGCCCGGCTCTGGCGTGGGAGGCTGAGACACGGAGTCATCTACTAC  
 AACGCCAACTGGGAGCTGGAGCCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCG  
 AAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCCTGGCCAACAGCTCT  
 GGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTCAAUTGCTA  
 CGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTACTTCTGCT  
 GCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTGCCAGAGGCTGG  
 GGCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCGACAGCCCCCACCCCTGCTCACGG  
 TGCTGGCCTACTCACTGCTGCCATGGGGCCTTCCCTCATCGCCTGCTG  
 GCCTTTGGATGTACCGGCATCGCAAGCCCCCTACGGTCATGTGGACATCCAT  
 GAGGACCTGGCCTCCACCAACCATCCCCTGGTGGCCTGAAGCCACTGCA  
 GCTGCTGGAGATCAAGGCTGGGGCGTTGGCTGTCTGGAAGGCCAG

CTCATGAATGACTTTGTAGCTGTCAAGATCTTCCCCTCCAGGACAAGCAGTCG  
 TGGCAGAGTGAACGGGAGATCTTCAGCACACCTGGCATGAAGCAGCAGAACCT  
 GCTACAGTTCATTGCTGCCGAGAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAGCTGT  
 GGCTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCCTCACGGATTACCTCAAGGGG  
 AACATCATCACATGGAACGAACGTGTCATGTAGCAGAGACGATGTCACGAGGC  
 CTCTCATACTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGCCGTGGCGAGGGCCACAAGCC  
 GTCTATTGCCACAGGGACTTAAAAGTAAGAATGTATTGCTGAAGAGCGACCT  
 CACAGCCGTGCTGGCTGACTTGGCTGGCTGTTGAGCCAGGGAAAC  
 CTCCAGGGGACACCCACGGACAGGTAGGCACGAGACGGTACATGGCTCCTGA  
 GGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTCCAGAGAGATGCCTCCTGCGCATTGACA  
 TGTATGCCATGGGTTGGTGCCTGTGGAGCTTGTCTCGCTGCAAGGCTGCA  
 GACGGACCCGTGGATGAGTACATGCTGCCCTTGAGGAAGAGATTGCCAGCA  
 CCCTCGTTGGAGGAGCTGCAGGAGGTGGTGCACAAGAAGATGAGGCCCA  
 CCATTAAGATCACTGGTTGAAACACCCGGGCCTGGCCCAGCTTGTGACCA  
 TCGAGGAGTGCTGGACCAGATGATGCAGAGGCTCGCTGTCCGCGGGCTGTG  
 GAGGAGCGGGTGTCCCTGATTGGAGGTGGTCAACGGCACTACCTCGGACTG  
 TCTCGTTCCCTGGTACCTCTGTCACCAATGTGGACCTGCCCTAAAGAGTC  
 AAGCATCTAA (SEQ ID NO: 4)

[0102]A sequência de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo (extrace-  
 lular) solúvel ActRIIB humano é a seguinte (a sequência conforme mostrada propor-  
 ciona uma alanina na posição 64, e pode ser modificada para proporcionar uma ar-  
 ginina no lugar):

[0103]GGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGAGTGCATCTACTACAACG  
 CCAACTGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGG  
 CGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCCTGGCCAACAGCTCTGGCA  
 CCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACTGCTACGATA  
 GGCAGGAGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTACTTCTGCTGCTGT

GAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTGCCAGAGGCTGGGGGCC  
GGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGACAGCCCCACC (SEQ ID NO: 5)

[0104]Em uma modalidade específica, a invenção se refere a polipeptídeos de GDF Trap que sejam formas variantes de polipeptídeos ActRIIB solúveis. Conforme descrito no presente documento, o termo “polipeptídeo ActRIIB solúvel” se refere, em geral, a polipeptídeos que compreendem um domínio extracelular de uma proteína ActRIIB. O termo “polipeptídeo ActRIIB solúvel” conforme o uso em questão, inclui qualquer domínio extracelular de ocorrência natural de uma proteína ActRIIB bem como quaisquer variantes desta (incluindo mutantes, fragmentos e formas peptidomiméticas) que tenham uma atividade útil. Por exemplo, o domínio extracelular de uma proteína ActRIIB se liga a um ligante e é genericamente solúvel. Exemplos de polipeptídeos ActRIIB solúveis incluem polipeptídeos ActRIIB solúveis (por exemplo, SEQ ID NOs: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 e 41). Outros exemplos de polipeptídeos ActRIIB solúveis compreendem uma sequência de sinal além do domínio extracelular de uma proteína ActRIIB, vide o Exemplo 1. A sequência de sinal pode ser uma sequência de sinal nativa de um ActRIIB, ou uma sequência de sinal de outra proteína, tal como uma sequência de sinal do ativador de plasminogênio tecidual (TPA) ou uma sequência de sinal de melitina de mel de abelha (HBM).

[0105]A revelação identifica porções e variantes funcionalmente ativas de ActRIIB. Os Requerentes certificaram que uma proteína de fusão Fc tendo a sequência revelada por Hilden et al. (Blood. 15 de abril de 1994;83(8):2163-70), que tem Alanina na posição correspondente ao aminoácido 64 de SEQ ID NO: 1 (A64), tem uma afinidade relativamente baixa por activina e GDF-11. Em contrapartida, a mesma proteína de fusão Fc com uma Arginina na posição 64 (R64) tem uma afinidade por activina e GDF-11 na faixa nanomolar baixa à picomolar alta. Portanto, uma sequência com um R64 é usada como uma sequência de referência tipo selva-gem para ActRIIB humano nesta revelação.

[0106]Attisano et al. (Cell. 1992 Jan 10;68(1):97-108) mostrou que uma exclusão do nó de prolina na terminação C do domínio extracelular de ActRIIB reduziu a afinidade do receptor por activina. Uma proteína de fusão ActRIIB-Fc contendo aminoácidos 20-119 de SEQ ID NO: 1, "ActRIIB (20-119)-Fc", reduziu a ligação a GDF-11 e activina em relação a um ActRIIB (20-134)-Fc, que inclui a região de nó de prolina e o domínio justamembranar completo. No entanto, uma proteína ActRIIB (20-129)-Fc retém uma atividade similar, mas de alguma forma reduzida, em relação ao tipo selvagem, mesmo que a região de nó de prolina seja interrompida. Logo, espera-se que todos os domínios extracelulares ActRIIB que param no aminoácido 134, 133, 132, 131, 130 e 129 sejam ativos, mas as construções que param em 134 ou 133 podem ser mais ativas. De modo similar, não se espera que as mutações em qualquer um dos resíduos 129-134 alterem a afinidade de ligação ao ligante por margens grandes. Suportando isto, as mutações de P129 e P130 não reduzem substancialmente a ligação ao ligante. Portanto, um polipeptídeo de GDF Trap que seja uma proteína de fusão ActRIIB-Fc pode terminar tão precoce quanto o aminoácido 109 (a cisteína final), no entanto, espera-se que as formas que terminam em ou entre 109 e 119 tenham uma ligação ao ligante reduzida. O aminoácido 119 é fracamente conservado e, logo, é prontamente alterado ou truncado. As formas que terminam em 128 ou depois retêm uma afinidade de ligação ao ligante. As formas que terminam em ou entre 119 e 127 terão uma capacidade de ligação intermediária. Qualquer uma dessas formas pode ser desejável de usar, dependendo do ajuste clínico ou experimental.

[0107]Na terminação N de ActRIIB, espera-se que uma proteína que começa no aminoácido 29 ou antes retenha a atividade de ligação ao ligante. O aminoácido 29 representa a cisteína inicial. Uma mutação de alanina em asparagina na posição 24 introduz uma sequência de glicosilação N-ligada sem afetar substancialmente a ligação ao ligante. Isto confirma que as mutações na região entre o peptídeo de cli-

vagem de sina e a região reticulada de cisteína, correspondente a aminoácidos 20-29 são bem toleradas. Em particular, as construções que começam na posição 20, 21, 22, 23 e 24 retêm a atividade, e também se espera que as construções que começam nas posições 25, 26, 27, 28 e 29 retenham a atividade. Os dados mostrados nos Exemplos demonstram que, surpreendentemente, uma construção que começa em 22, 23, 24 ou 25 terá a maior atividade.

[0108]Tomadas juntas, uma porção ativa de ActRIIB compreende aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1, e construções de GDF Trap podem, por exemplo, compreender uma porção de ActRIIB que começa em um resíduo correspondente a aminoácidos 20-29 de SEQ ID NO: 1 ou 39 e terminando em uma posição correspondente a aminoácidos 109-134 de SEQ ID NO: 1 ou 39. Outros exemplos incluem construções que começam em uma posição de 20-29 ou 21-29 e terminam em uma posição de 119-134, 119-133, 129-134, ou 129-133 de SEQ ID NO: 1 ou 39. Outros exemplos incluem construções que começam em uma posição de 20-24 (ou 21-24, ou 22-25) e terminam em uma posição de 109-134 (ou 109-133), 119-134 (ou 119-133) ou 129-134 (ou 129-133) de SEQ ID NO: 1 ou 39. As variantes dentro dessas faixas também são contempladas, particularmente aquelas tendo pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% de identidade à porção correspondente de SEQ ID NO: 1 ou 39. Em determinadas modalidades, o polipeptídeo de GDF Trap compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em, um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácido que seja pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica aos resíduos de aminoácido 25-131 de SEQ ID NO: 1 ou 39. Em determinadas modalidades, o polipeptídeo de GDF Trap compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em, um polipeptídeo tendo uma sequência de aminoácido que seja pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a SEQ ID NOs: 7, 26, 28, 29, 32, 37 ou 38. Em modalidades preferenciais, o polipeptídeo de GDF Trap consiste em, ou consiste essencialmente em, uma sequência de

aminoácido de SEQ ID NO: 7, 26, 28, 29, 32, 37 ou 38.

[0109]A revelação inclui os resultados de uma análise de estruturas ActRIIB compósitas, mostradas na Figura 1, demonstrando que a bolsa de ligação do ligante é definida por 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. Nessas posições, espera-se que as mutações conservativas sejam toleradas, embora uma mutação K74A seja bem tolerada, assim como são R40A, K55A, F82A e as mutações na posição L79. R40 é um K em *Xenopus*, indicando que os aminoácidos básicos nesta posição serão tolerados. Q53 é R em ActRIIB bovino e K em *Xenopus* ActRIIB, e, portanto, aminoácidos incluindo R, K, Q, N e H serão tolerados nesta posição. Logo, uma fórmula geral para uma proteína de GDF Trap é aquela que comprehende aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1 ou 39, mas opcionalmente, começando em uma posição variando de 20-24 ou 22-25 e terminando em uma posição variando de 129-134, e que comprehende não mais de 1, 2, 5, 10 ou 15 alterações de aminoácido conservativo na bolsa de ligação do ligante, e zero, uma ou mais alterações não-conservativas nas posições 40, 53, 55, 74, 79 e/ou 82 na bolsa de ligação do ligante. Essa proteína pode reter mais de 80%, 90%, 95% ou 99% de identidade de sequência à sequência de aminoácidos 29-109 de SEQ ID NO: 1 ou 39. Sítios fora da bolsa de ligação, onde a variabilidade pode ser particularmente bem tolerada, incluem as terminações amino e carbóxi do domínio extracelular (conforme notado anteriormente), e nas posições 42-46 e 65-73. Uma alteração de asparagina em alanina na posição 65 (N65A) realmente aperfeiçoa a ligação ao ligante nos fundamentos A64, e, logo, espera-se não ter efeitos prejudiciais na ligação ao ligante nos fundamentos R64. Esta alteração provavelmente elimina a glicosilação em N65 nos fundamentos A64, demonstrando, assim, que uma alteração significativa nesta região é provavelmente tolerada. Embora uma alteração R64A seja fracamente tolerada, R64K é bem tolerado, e, logo, outro resíduo básico, como H pode ser tolerado na posição 64.

[0110]ActRIIB é bem conservado em quase todos os vertebrados, com grandes extensões do domínio extracelular conservado completamente. Muitos dos ligan tes que se ligam a ActRIIB também são altamente conservados. De modo corres pondente, as comparações de sequências ActRIIB de vários organismos vertebrados proporcionam as percepções em resíduos que podem ser alterados. Portanto, um polipeptídeo variante ActRIIB humano ativo útil como um GDF Trap pode incluir um ou mais aminoácidos em posições correspondentes a partir da sequência de outro ActRIIB de vertebrado, ou pode incluir um resíduo que seja similar àquele na se quência de seres humanos ou de outros vertebrados. Os exemplos a seguir ilustram esta abordagem para definir uma variante ActRIIB ativa. L46 é uma valina em Xenopus ActRIIB, e, logo, esta posição pode ser alterada, e opcionalmente pode ser alte rada para outro resíduo hidrofóbico, como V, I ou F, ou um resíduo não-polar, como A. E52 é um K em Xenopus, indicando que este sítio pode ser tolerante de uma am pla variedade de alterações, incluindo resíduos polares, como E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y e provavelmente A. T93 é um K em Xenopus, indicando que uma ampla varia ção estrutural é tolerada nesta posição, com resíduos polares favorecidos, 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, como I, V ou L deve ser tolerado. E111 é K em Xenopus, indicando que os resíduos alterados serão tolerados nesta posição, incluindo D, R, K e H, bem co mo Q e N. R112 é K em Xenopus, indicando que os resíduos básicos são tolerados nesta posição, incluindo R e H. A na posição 119 é conservado de modo relativa mente fraco, e aparece como P em roedores e V em Xenopus, logo, essencialmente qualquer aminoácido deve ser tolerado nesta.

[0111]A revelação demonstra que a adição de um sítio de glicosilação N ligado adicional (N-X-S/T) aumenta a meia-vida sérica de uma proteína de fusão Ac tRIIB-Fc, em relação à forma ActRIIB (R64)-Fc. Introduzindo-se uma asparagina na posição 24 (construção A24N), cria-se uma sequência NXT que pode conferir uma

meia-vida mais longa. Outras sequências NX(T/S) são encontradas em 42-44 (NQS) e 65-67 (NSS), embora a última possa não ser eficientemente glicosilada com R na posição 64. As sequências N-X-S/T podem ser genericamente introduzidas em posições fora da bolsa de ligação do ligante definida na Figura 1. Os sítios particularmente adequados para a introdução de sequências N-X-S/T não-endógenas incluem aminoácidos 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 ou 129-134. As sequências N-X-S/T também podem ser introduzidas no ligador entre a sequência ActRIIB e Fc ou outro componente de fusão. Esses sítios podem ser introduzidos com mínimo esforço introduzindo-se um N na posição correta em relação a um S ou T preexistente, ou introduzindo-se um S ou T em uma posição correspondente a um N preexistente. Logo, as alterações desejáveis que criariam um sítio de glicosilação N-ligado são: A24N, R64N, S67N (possivelmente combinadas com uma alteração N65A), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S e R112T. Qualquer S que seja previsto como sendo glicosilado pode ser alterado para um T sem criar um sítio imunogênico, por causa da proteção produzida pela glicosilação. De modo similar, qualquer T que seja previsto como sendo glicosilado pode ser alterado para um S. Logo, as alterações S67T e S44T são contempladas. De modo similar, em uma variante A24N, uma alteração S26T pode ser usada. De modo correspondente, um GDF Trap pode ser uma variante ActRIIB tendo uma ou mais sequências consenso de glicosilação N-ligada não-endógenas adicionais.

[0112]A posição L79 de ActRIIB pode ser alterada para conferir propriedades de ligação alteradas de activina – miostatina (GDF-11). L79P reduz a ligação de GDF-11 a uma extensão maior do que a ligação de activina. L79E ou L79D retém a ligação de GDF-11. De modo considerável, as variantes L79E e L79D têm uma atividade de activina consideravelmente reduzida. Experimentos *in vivo* indicam que estes receptores de não-activina retêm uma capacidade significativa de aumentar as hemácias, mas mostram efeitos reduzidos em outros tecidos. Esses dados demons-

tram a desejabilidade e a praticabilidade de obter polipeptídeos com efeitos reduzidos em activina. Em modalidades exemplificadoras, os métodos descritos no presente documento utilizam um polipeptídeo de GDF Trap que é um polipeptídeo ActRIIB variante que comprehende um aminoácido acídico (por exemplo, D ou E) na posição correspondente à posição 79 de SEQ ID NO: 1 ou 39, opcionalmente em combinação com uma ou mais substituições, adições ou exclusões de aminoácido adicionais.

[0113]As variações descritas podem ser combinadas de várias formas. Adicionalmente, os resultados do programa de mutagênese descritos no presente documento indicam que existem posições de aminoácido em ActRIIB que são geralmente benéficas de conservar. Estas incluem a posição 64 (aminoácido básico), posição 80 (aminoácido acídico ou hidrofóbico), posição 78 (hidrofóbico, e particularmente triptofano), posição 37 (acídico, e particularmente ácido aspártico ou glutâmico), posição 56 (aminoácido básico), posição 60 (aminoácido hidrofóbico, particularmente fenilalanina ou tirosina). Logo, em cada uma das variantes aqui reveladas, a revelação proporciona um arcabouço de aminoácidos que podem ser conservados. Outras porções que podem ser desejáveis de conservar são as seguintes: posição 52 (aminoácido acídico), posição 55 (aminoácido básico), posição 81 (acídico), 98 (polar ou carregado, particularmente E, D, R ou K).

[0114]Em determinadas modalidades, os fragmentos isolados de polipeptídeos ActRIIB podem ser obtidos triando-se polipeptídeos recombinantemente produzidos a partir do fragmento correspondente do ácido nucléico que codifica um polipeptídeo ActRIIB (por exemplo, SEQ ID NOs: 4 e 5). Além disso, os fragmentos podem ser quimicamente sintetizados usando técnicas conhecidas na arte, como química f-Moc ou t-Boc em fase sólida de Merrifield convencional. Os fragmentos podem ser produzidos (recombinantemente ou por síntese química) e testados para identificar os fragmentos de peptidil que podem funcionar, por exemplo, como antagonistas (inibidores) ou agonistas (ativadores) de uma proteína ActRIIB ou um ligan-

te ActRIIB.

[0115]Em determinadas modalidades, o polipeptídeo de GDF Trap é um polipeptídeo ActRIIB variante tendo uma sequência de aminoácido que seja pelo menos 75% idêntica a uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 ou 41. Em determinados casos, o GDF Trap tem uma sequência de aminoácido pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 ou 41. Em determinadas modalidades, o GDF Trap comprehende, consiste essencialmente em, ou consiste em, uma sequência de aminoácido pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácido selecionada a partir de SEQ ID NOs: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 ou 41, em que a posição correspondente a L79 de SEQ ID NO: 1 é um aminoácido acídico (por exemplo, um resíduo de aminoácido D ou E).

[0116]Em determinadas modalidades, a presente invenção contempla a produção de variantes funcionais modificando-se a estrutura de um polipeptídeo de GDF Trap para tais propósitos como acentuar a eficácia terapêutica, ou a estabilidade (por exemplo, vida de prateleira ex vivo e resistência à degradação proteolítica *in vivo*). Os polipeptídeos de GDF Trap também podem ser produzidos por substituição, exclusão ou adição de aminoácido. Por exemplo, é razoável esperar que uma substituição isolada de uma leucina por uma isoleucina ou valina, um aspartato por um glutamato, uma treonina por uma serina, ou uma substituição similar de um aminoácido por um aminoácido estruturalmente relacionado (por exemplo, mutações conservativas) não terá um efeito principal sobre a atividade biológica da molécula resultante. As substituições conservativas são aquelas que ocorrem dentro de uma família de aminoácidos que são relacionados a suas cadeias secundárias. Pode-se determinar prontamente se uma alteração na sequência de aminoácido de um poli-

peptídeo de GDF Trap resulta em uma variante funcional avaliando-se a capacidade de o polipeptídeo de GDF Trap produzir uma resposta em células relativas ao polipeptídeo de GDF Trap não-modificado ou um polipeptídeo ActRIIB tipo selvagem, ou se ligar a um ou mais ligantes, como activina, GDF-11 ou miostatina comparado ao polipeptídeo de GDF Trap não-modificado ou a um polipeptídeo ActRIIB tipo selvagem.

[0117]Em determinadas modalidades específicas, a presente invenção contempla a produção de mutações no domínio extracelular (também referido como domínio de ligação ao ligante) de um polipeptídeo ActRIIB de modo que o polipeptídeo ActRIIB tenha alterado as atividades de ligação ao ligante (por exemplo, afinidade de ligação ou especificidade de ligação). Em determinados casos, esses polipeptídeos de GDF Trap alteraram (elevaram ou reduziram) a afinidade de ligação por um ligante específico. Em outros casos, os polipeptídeos de GDF Trap alteraram a especificidade de ligação por ligantes ActRIIB.

[0118]Por exemplo, a revelação proporciona polipeptídeos de GDF Trap que se ligam preferencialmente a GDF8/GDF11 em relação a activinas. A revelação estabelece, ainda, a desejabilidade de tais polipeptídeos reduzirem efeitos fora do alvo (off-target), embora tais variantes seletivas possam ser menos desejáveis para o tratamento de doenças graves onde ganhos muito grandes em níveis de hemácias podem ser necessários para efeito terapêutico e onde algum nível de efeito fora do alvo é aceitável. Por exemplo, os resíduos de aminoácido da proteína ActRIIB, como E39, K55, Y60, K74, W78, D80, e F101, estão na bolsa de ligação do ligante e mediam a ligação a seus ligantes, como activina e GDF8. Logo, a presente invenção proporciona um GDF Trap que compreende um domínio de ligação ao ligante alterado (por exemplo, domínio de ligação GDF8) de um receptor ActRIIB, que comprehende uma ou mais mutações nesses resíduos de aminoácido. Opcionalmente, o domínio de ligação ao ligante alterado pode ter aumentado a seletividade por um ligante,

como GDF8 em relação a um domínio de ligação ao ligante tipo selvagem de um receptor ActRIIB. Para ilustrar, essas mutações aumentam a seletividade do domínio de ligação ao ligante alterado por GDF8 em relação à activina. Opcionalmente, o domínio de ligação ao ligante alterado tem uma razão entre  $K_d$  para ligação de activina e  $K_d$  para ligação de GDF8 que seja pelo menos 2, 5, 10, ou até mesmo 100 vezes maior em relação à razão para o domínio de ligação ao ligante tipo selvagem. Opcionalmente, o domínio de ligação ao ligante alterado tem uma razão entre  $IC_{50}$  para inibir activina e  $IC_{50}$  para inibir GDF8 que seja pelo menos 2, 5, 10, ou até mesmo 100 vezes maior em relação ao domínio de ligação ao ligante tipo selvagem. Opcionalmente, o domínio de ligação ao ligante alterado inibe GDF8 com um  $IC_{50}$  pelo menos 2, 5, 10, ou até mesmo 100 vezes menor que o  $IC_{50}$  para inibição de activina.

[0119]Como um exemplo específico, o resíduo Asp de aminoácido positivamente carregado (D80) do domínio de ligação ao ligante de ActRIIB pode ser mutado a um resíduo de aminoácido diferente para produzir um polipeptídeo de GDF Trap que se liga preferencialmente a GDF8, mas não à activina. De preferência, o resíduo D80 é alterado para um resíduo de aminoácido selecionado a partir do grupo que consiste em: um resíduo de aminoácido inalterado, 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 acídicos de ácido aspártico ou ácido glutâmico para reduzir consideravelmente a ligação de activina enquanto retém a ligação de GDF11. Conforme será reconhecido por um indivíduo versado na técnica, a maioria das mutações, variantes ou modificações descritas podem ser feitas a nível de ácido nucléico ou, em alguns casos, por modificação pós-translacional ou síntese química. Essas técnicas são bem conhecidas na técnica.

[0120]Em determinadas modalidades, a presente invenção contempla poli-

peptídeos de GDF Trap tendo mutações específicas em ActRIIB a fim de alterar a glicosilação do polipeptídeo ActRIIB. Os sítios de glicosilação exemplificadores em polipeptídeos de GDF Trap são ilustrados na Figura 1 (por exemplo, os sítios NX(S/T) sublinhados). Essas mutações podem ser selecionadas a fim de introduzir ou eliminar um ou mais sítios de glicosilação, como sítios de glicosilação O-ligados ou N-ligados. Os sítios de reconhecimento de glicosilação asparagina-ligados compreendem, em geral, uma sequência de tripeptídeo, asparagina-X-treonina (onde "X" é qualquer aminoácido) que seja especificamente reconhecido 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 ActRIIB tipo selvagem (para sítios de glicosilação O-ligados). Uma variedade de substituições ou exclusões de aminoácido em uma ou em ambas as primeiras ou terceiras posições de aminoácido de um sítio de reconhecimento de glicosilação (e/ou exclusão de aminoácido na segunda posição) resulta em não-glicosilação na sequência de tripeptídeo modificada. Outro meio para aumentar o número de porções de carboidrato em um polipeptídeo de GDF Trap é por acoplamento químico ou enzimático de glicosídeos ao polipeptídeo de GDF Trap. Dependendo do modo de acoplamento usado, o(s) açúcar(es) pode(m) ser fixado(s) a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxila livres; (c) grupos sulfidrila livres, como aqueles de cisteína; (d) grupos hidroxila livres, como aqueles de serina, treonina, ou hidroxiprolina; (e) resíduos aromáticos, como aqueles de fenilalanina, tirosina, ou triptofano; ou (f) o grupo amida de glutamina. Estes métodos são descritos em WO 87/05330 e em Aplin and Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306, aqui incorporados a título de referência. A remoção de uma ou mais porções de carboidrato presentes em um polipeptídeo de GDF Trap pode ser realizada química e/ou enzimaticamente. A desglicosilação química pode envolver, por exemplo, a exposição do polipeptídeo de GDF Trap ao composto de ácido trifluorometanossulfônico, ou um composto equivalente.

Este tratamento resulta na clivagem de maioria ou de todos os açúcares exceto o açúcar ligante (N-acetilglucosamina ou N-acetilgalactosamina), enquanto deixa a sequência de aminoácido intacta. A desglicosilação química é adicionalmente descrita 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 carboidrato em polipeptídeos de GDF Trap pode ser alcançada pelo uso de uma variedade de endo- e exo-glicosidases conforme descrito por Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. A sequência de um polipeptídeo de GDF Trap pode ser ajustada, conforme apropriado, dependendo do tipo de sistema de expressão usado, visto que células de mamífero, levedura, inseto e planta podem introduzir padrões de glicosilação diferentes que podem ser afetados pela sequência de aminoácido do peptídeo. Em geral, os polipeptídeos de GDF Trap para uso em seres humanos serão expressos em uma linhagem celular de mamífero que proporciona a glicosilação apropriada, como HEK293 ou linhagens celulares de CHO, embora espera-se que outras linhagens celulares de expressão de mamíferos também sejam úteis.

[0121]Esta revelação contempla, ainda, um método para gerar variantes, particularmente conjuntos de variantes combinatórias de um polipeptídeo de GDF Trap, incluindo, opcionalmente, variantes de truncamento; pools de mutantes combinatórios são especialmente úteis para identificar sequências de GDF Trap. O propósito de triar tais bibliotecas combinatórias pode ser gerar, por exemplo, variantes de polipeptídeo de GDF Trap que tenham propriedades alteradas, como farmacocinética alterada, ou ligação ao ligante alterada. Proporciona-se uma variedade de ensaios de triagem abaixo, e tais ensaios podem ser usados para avaliar as variantes. Por exemplo, uma variante de polipeptídeo de GDF Trap pode ser triada para a determinação da capacidade de se ligar a um polipeptídeo ActRIIB, evitar a ligação de um ligante ActRIIB a um polipeptídeo ActRIIB ou interferir na sinalização causada por um ligante ActRIIB.

[0122]A atividade de um polipeptídeo de GDF Trap ou suas variantes também pode ser testada em um ensaio baseado em células ou *in vivo*. Por exemplo, o efeito de uma variante de polipeptídeo de GDF Trap sobre a expressão de genes envolvidos em hematopoiese pode ser avaliado. Isto pode, conforme necessário, ser realizado na presença de uma ou mais proteínas ligantes ActRIIB recombinantes (por exemplo, activina), e as células podem ser transfetadas a fim de produzir um polipeptídeo de GDF Trap e/ou variantes deste, e, opcionalmente, um ligante ActRIIB. De modo similar, um polipeptídeo de GDF Trap pode ser administrado a um camundongo ou a outro animal, e uma ou mais medições sanguíneas, como uma contagem de RBC, níveis de hemoglobinas, níveis de hematócitos, armazenamentos de ferro, ou contagem de reticulócitos, podem ser avaliadas usando os métodos reconhecidos na técnica.

[0123]Podem-se gerar variantes combinatoriamente derivadas que tenham uma potência seletiva relativa a um polipeptídeo de GDF Trap de referência. Essas proteínas variantes, quando expressas a partir de construções de DNA recombinante, podem ser usadas em protocolos de terapia genética. De modo similar, a mutagenese pode produzir variantes que tenham meias-vidas intracelulares dramaticamente diferentes do polipeptídeo de GDF Trap não-modificado correspondente. Por exemplo, a proteína alterada pode se tornar mais estável ou menos estável à degradação proteolítica ou outros processos que resultam na destruição, ou, de outro modo, na inativação, de um polipeptídeo de GDF Trap não-modificado. Essas variantes, e os genes que as codificam, podem ser utilizadas para alterar os níveis de polipeptídeo de GDF Trap modulando-se a meia-vida dos polipeptídeos de GDF Trap. Por exemplo, uma meia-vida curta pode produzir efeitos biológicos mais transientes e, quando parte de um sistema de expressão induzível, pode permitir um controle mais estrito de níveis de polipeptídeo de GDF Trap recombinante dentro da célula. Em uma proteína de fusão Fc, as mutações podem ser feitas no ligador (caso exista)

e/ou na porção Fc para alterar a meia-vida da proteína.

[0124]Em determinadas modalidades, os polipeptídeos de GDF Trap da invenção podem compreender, ainda, modificações pós-translacionais de qualquer que esteja naturalmente presente nos polipeptídeos ActRIIB. Essas modificações incluem, mas não se limitam a, acetilação, carboxilação, glicosilação, fosforilação, lipidação, e acilação. Como resultado, os polipeptídeos de GDF Trap podem conter elementos não-aminoácido, como polietileno glicóis, lipídeos, poli- ou monosacarídeos, e fosfatos. Os efeitos de tais elementos não-aminoácido sobre a funcionalidade de um polipeptídeo de GDF Trap podem ser testados conforme descrito no presente documento para outras variantes de polipeptídeo de GDF Trap. Quando um polipeptídeo de GDF Trap for produzido em células clivando-se uma forma nascente do polipeptídeo de GDF Trap, um processamento pós-translacional também pode ser importante para corrigir o enovelamento e/ou função da proteína. Células diferentes (como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 ou HEK293) têm mecanismos celulares específicos e característicos para tais atividades pós-translacionais e podem ser escolhidos para garantir a modificação e o processamento corretos dos polipeptídeos de GDF Trap.

[0125]Em determinados aspectos, os polipeptídeos de GDF Trap incluem proteínas de fusão tendo pelo menos uma porção de um polipeptídeo ActRIIB e um ou mais domínios de fusão. Exemplos bem conhecidos de tais domínios de fusão incluem, mas não se limitam a, poliistidina, Glu-Glu, glutationa S transferase (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G, uma região constante de cadeia pesada de imunoglobulina (por exemplo, um Fc), proteína de ligação de maltose (MBP), ou albumina sérica humana. Um domínio de fusão pode ser selecionado a fim de conferir uma propriedade desejada. Por exemplo, alguns domínios de fusão são particularmente úteis para isolamento das proteínas de fusão por cromatografia de afinidade. Para o propósito de purificação de afinidade, as matrizes relevantes para cromatografia de

afinidade, como resinas conjugadas por glutationa, amilase, e níquel ou cobalto são usadas. Muitas dessas matrizes se encontram disponíveis sob a forma de "kits", como o sistema de purificação Pharmacia GST e o sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil com parceiros de fusão (HIS<sub>6</sub>). Como outro exemplo, um domínio de fusão pode ser selecionado a fim de facilitar a detecção dos polipeptídeos de GDF Trap. Exemplos desses domínios de detecção incluem as várias proteínas fluorescentes (por exemplo, GFP) bem como "marcadores de epítopo," que são geralmente sequências peptídicas curtas às quais um anticorpo específico encontra-se disponível. Marcadores de epítopo bem conhecidos aos quais anticorpos monoclonais específicos se encontram prontamente disponíveis incluem marcadores FLAG, hemaglutinina do vírus influenza (HA), e c-myc. Em alguns casos, os domínios de fusão têm um sítio de clivagem de protease, como para Fator Xa ou Trombina, que permitem que uma protease digira parcialmente as proteínas de fusão e, desse modo, liberem as proteínas recombinantes a partir destas. As proteínas liberadas podem, então, ser isoladas do domínio de fusão por separação cromatográfica subsequente. Em determinadas modalidades preferenciais, um polipeptídeo de GDF Trap é fundido a um domínio que estabiliza o polipeptídeo de GDF Trap *in vivo* (um domínio "estabilizador"). O termo "estabilizar" significa qualquer coisa que aumente a meia-vida sérica, independentemente se isto ocorrer por destruição reduzida, compensação reduzida pelos rins, ou outro efeito farmacocinético. As fusões com a porção Fc de uma imunoglobulina são conhecidas por conferirem propriedades farmacocinéticas desejáveis em uma ampla faixa de proteínas. De modo similar, as fusões em 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, como aumentar níveis de hemácias).

[0126]Como um exemplo específico, a presente invenção proporciona GDF

Trap que seja uma proteína de fusão ActRIIB-Fc que compreende um domínio extracelular (por exemplo, ligação ao ligante) de polipeptídeo ActRIIB fundido a um domínio Fc. A sequência de um domínio Fc exemplificador é mostrada abaixo (SEQ ID NO: 6).

[0127]THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD(A)VS  
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC  
K(A)VSNKALPVPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD  
IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGPFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA  
LHN(A)HYTQKSLSLSPGK\*

[0128]Opcionalmente, o domínio Fc tem uma ou mais mutações em resíduos, como Asp-265, lisina 322, e Asn-434. Em determinados casos, o domínio Fc mutante tendo uma ou mais dessas mutações (por exemplo, mutação Asp-265) tem uma capacidade reduzida de ligação ao receptor Fcγ em relação a um domínio Fc tipo selvagem. Em outros casos, o domínio Fc mutante tendo uma ou mais dessas mutações (por exemplo, mutação Asn-434) tem uma capacidade aumentada de se ligar ao receptor Fc relacionado a MHC classe I (FcRN) em relação a um domínio Fc tipo selvagem.

[0129]Compreende-se que diferentes elementos das proteínas de fusão podem ser dispostos de qualquer maneira que seja consistente à funcionalidade desejada. Por exemplo, um polipeptídeo de GDF Trap pode ser colocado C-terminal a um domínio heterólogo, ou, alternativamente, um domínio heterólogo pode ser colocado C-terminal a um polipeptídeo de GDF Trap. O domínio do polipeptídeo de GDF Trap e o domínio heterólogo não precisam ser adjacentes em uma proteína de fusão, e domínios ou sequências de aminoácidos adicionais podem ser incluídos C- ou N-terminal a qualquer domínio ou entre os domínios.

[0130]Em determinadas modalidades, uma proteína de fusão de GDF Trap compreende uma sequência de aminoácido conforme apresentado na fórmula A-B-

C. A porção B é um polipeptídeo ActRIIB N- e C-terminalmente truncado que consiste em uma sequência de aminoácido correspondente a aminoácidos 26-132 de SEQ ID NO: 26. As porções A e C podem ter independentemente zero, um ou mais aminoácidos, e ambas as porções A e C quando presentes são heterólogas a B. As porções A e/ou C podem ser fixadas à porção B através de uma sequência ligante. Ligadores exemplificadores incluem ligadores de polipeptídeo curto, como 2-10, 2-5, 2-4, 2-3 resíduos de Glicina, como, por exemplo, um ligador Gly-Gly-Gly. Outros ligadores adequados são descritos acima. Em determinadas modalidades, uma proteína de fusão de GDF Trap compreende uma sequência de aminoácido conforme apresentado na fórmula A-B-C, em que A é uma sequência líder, B consiste em aminoácidos 26-132 de SEQ ID NO: 26, e C é uma porção de polipeptídeo que acentua um ou mais entre a estabilidade *in vivo*, meia-vida *in vivo*, absorção/administração, localização ou distribuição tecidual, formação de complexos protéicos, e/ou purificação. Em determinadas modalidades, uma proteína de fusão de GDF Trap compreende uma sequência de aminoácido conforme apresentado na fórmula A-B-C, em que A é uma sequência TPA líder, B consiste em aminoácidos 26-132 de SEQ ID NO: 26, e C é um domínio Fc de imunoglobulina. Uma proteína de fusão de GDF Trap preferencial compreende a sequência de aminoácido apresentada em SEQ ID NO: 26.

[0131]Em determinadas modalidades, os polipeptídeos de GDF Trap da presente invenção contêm uma ou mais modificações que sejam capazes de estabilizar os polipeptídeos de GDF Trap. Por exemplo, essas modificações acentuam a meia-vida *in vitro* dos polipeptídeos de GDF Trap, acentuam a meia-vida circulatória dos polipeptídeos de GDF Trap ou reduzem a degradação proteolítica dos polipeptídeos de GDF Trap. Essas modificações de estabilização incluem, mas não se limitam a, proteínas de fusão (incluindo, por exemplo, proteínas de fusão que compreendem um polipeptídeo de GDF Trap e um domínio estabilizador), modificações de um sítio de glicosilação (incluindo, por exemplo, a adição de um sítio de glicosilação a um

polipeptídeo de GDF Trap), e modificações de porção de carboidrato (incluindo, por exemplo, a remoção de porções de carboidrato de um polipeptídeo de GDF Trap). No caso de proteínas de fusão, um polipeptídeo de GDF Trap é fundido a um domínio estabilizador, como uma molécula IgG (por exemplo, um domínio Fc). Conforme o uso em questão, o termo “domínio estabilizador” não se refere somente a um domínio de fusão (por exemplo, Fc) conforme no caso de proteínas de fusão, mas também inclui modificações não-proteináceas, como uma porção de carboidrato, ou um polímero não-proteináceo, como polietileno glicol.

[0132]Em determinadas modalidades, a presente invenção torna disponível formas isoladas e/ou purificadas dos polipeptídeos de GDF Trap, que são isolados, ou, de outro modo, substancialmente isentos, de outras proteínas.

[0133]Em determinadas modalidades, os polipeptídeos de GDF Trap (não-modificados ou modificados) da invenção podem ser produzidos por uma variedade de técnicas conhecidas na arte. Por exemplo, esses polipeptídeos de GDF Trap podem ser sintetizados usando técnicas químicas de proteína padrão, como aquelas descritas em Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993) e Grant G. A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, New York (1992). Além disso, os sintetizadores de peptídeo automatizados se encontram comercialmente disponíveis (por exemplo, Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Bioscience 9600). Alternativamente, os polipeptídeos de GDF Trap, fragmentos ou variantes destes podem ser recombinantemente produzidos usando vários sistemas de expressão (por exemplo, *E. coli*, células do Ovário de Hamster Chinês (CHO), células COS, baculovírus) conforme bem conhecido na técnica. Em uma modalidade adicional, os polipeptídeos de GDF Trap modificados ou não-modificados podem ser produzidos por digestão de polipeptídeos de GDF Trap de comprimento completo recombinantemente produzidos utilizando-se, por exemplo, uma protease, por exemplo, tripsina, termolisina, quimotripsina, pepsina, ou en-

zima de conversão de aminoácido básico pareado (PACE). Uma análise computacional (usando um software comercialmente disponível, por exemplo, MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) pode ser usada para identificar os sítios de clivagem proteolíticos. Alternativamente, esses polipeptídeos de GDF Trap podem ser produzidos a partir de polipeptídeos de GDF Trap de comprimento completo recombinantemente produzidos, como técnicas padrão conhecidas na arte, tal como por clivagem química (por exemplo, brometo de cianogênio, hidroxilamina).

#### Ácidos nucléicos que codificam polipeptídeos de GDF Trap

[0134]Em determinados aspectos, a invenção proporciona ácidos nucléicos isolados e/ou recombinantes que codificam qualquer um dos polipeptídeos de GDF Trap revelados no presente documento. SEQ ID NO: 4 codifica um polipeptídeo precursor ActRIIB de ocorrência natural, enquanto SEQ ID NO: 5 codifica um polipeptídeo ActRIIB solúvel, e SEQ ID NOs: 25, 27, 30 e 31 codificam GDF Traps solúveis. Os ácidos nucléicos em questão podem ter fragmento único ou fragmento duplo. Esses ácidos nucléicos podem ser moléculas de DNA ou RNA. Esses ácidos nucléicos podem ser usados, por exemplo, em métodos para produzir polipeptídeos de GDF Trap ou como agentes terapêuticos diretos (por exemplo, em uma abordagem de terapia genética).

[0135]Em determinados aspectos, os ácidos nucléicos em questão que codificam polipeptídeos de GDF Trap são compreendidos, ainda, por incluírem ácidos nucléicos que sejam variantes de SEQ ID NOs: 5, 25, 27, 30 e 31. As sequências de nucleotídeos variantes incluem sequências que diferem em uma ou mais substituições, adições ou exclusões de nucleotídeo, como variantes alélicas; e, portanto, incluirão sequências de codificação que diferem da sequência de nucleotídeo da sequência de codificação designada em SEQ ID NOs: 5, 25, 27, 30 e 31.

[0136]Em determinadas modalidades, a invenção proporciona sequências de ácido nucléico isoladas ou recombinantes que sejam pelo menos 80%, 85%, 90%,

95%, 97%, 98%, 99% ou 100% idênticas a SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 ou 31. Um indivíduo com conhecimento comum na técnica avaliará que as sequências de ácido nucléico complementares a SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 ou 31, e as variantes de SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 ou 31, também se encontram no escopo desta invenção. Em modalidades adicionais, as sequências de ácido nucléico da invenção podem ser isoladas, recombinantes, e/ou fundidas a uma sequência de nucleotídeo heteróloga, ou em uma biblioteca de DNA.

[0137]Em outras modalidades, os ácidos nucléicos da invenção também incluem sequências de nucleotídeo que se hibridizam sob condições altamente estrinquentes à sequência de nucleotídeo designada em SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 ou 31, sequências complementares de SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 ou 31, ou fragmentos destas. Conforme discutido anteriormente, um indivíduo com conhecimento comum na técnica compreenderá prontamente que condições de estringência apropriadas que promovem hibridização de DNA podem ser variadas. Por exemplo, pode-se realizar a hibridização em 6,0 x cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) a cerca de 45°C, seguida 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 das condições de estringência baixa em temperatura ambiente, cerca de 22°C, a condições de estringência alta em cerca de 65°C. Tanto a temperatura como o sal podem ser variados, ou a temperatura ou concentração de sal podem ser mantidas constantes enquanto a outra variável é alterada. Em uma modalidade, a invenção proporciona ácidos nucléicos que se hibridizam sob condições de estringência baixa de 6 x SSC em temperatura ambiente seguida por uma lavagem a 2 x SSC em temperatura ambiente.

[0138]Os ácidos nucléicos isolados que diferem dos ácidos nucléicos con-

forme apresentado em SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 ou 31 devido à degeneração no código genético também estão no escopo da invenção. Por exemplo, designa-se uma série de aminoácidos em mais de um triplete. Os códons 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 aminoácido da proteína. Em determinadas modalidades, o polipeptídeo de GDF Trap será codificado por uma sequência de nucleotídeo alternativa. As sequências de nucleotídeo alternativas são degeneradas em relação à sequência de ácido nucléico de GDF Trap nativo, mas ainda codificam para a mesma proteína de fusão. Em determinadas modalidades, o GDF Trap tendo SEQ ID NO: 26 é codificado por uma sequência de ácido nucléico alternativa que compreende SEQ ID NO: 30. No entanto, espera-se que os polimorfismos de sequência de DNA que levam a alterações nas sequências de aminoácidos das proteínas em questão estejam presentes entre células de mamíferos. Um indivíduo versado na técnica avalia que essas variações em um ou mais nucleotídeos (até cerca de 3-5% dos nucleotídeos) dos ácidos nucléicos que codificam uma proteína particular podem existir entre indivíduos de uma dada espécie devido à variação alélica natural. Qualquer e todas as variações de nucleotídeo e polimorfismos de aminoácido se encontram no escopo desta invenção.

[0139]Em determinadas modalidades, os ácidos nucléicos recombinantes da invenção podem ser operacionalmente ligados a uma ou mais sequências de nucleotídeos regulatórias em uma construção de expressão. As sequências de nucleotídeos regulatórias serão genericamente apropriadas para células hospedeiras usadas para expressão. Vários tipos de vetores de expressão apropriados e sequências regulatórias adequadas são conhecidos na técnica para uma variedade de células hospedeiras. Tipicamente, as ditas uma ou mais sequências de nucleotídeos regulatórias podem incluir, mas não se limitam a, sequências promotoras, sequências líder ou sequências de sinal, sítios de ligação ribossômica, sequências de início e termi-

nação transcracional, sequências de início e terminação translacional, e sequências acentuadoras ou ativadoras. Os promotores constitutivos ou induzíveis conforme conhecidos na técnica são contemplados pela invenção. Os promotores podem ser promotores de ocorrência natural, ou promotores híbridos que cominam elementos de mais de um promotor. Uma construção de expressão pode estar presente em uma célula em um episso, tal como um plasmídeo, ou a construção de expressão pode ser inserida em um cromossomo. Em uma modalidade preferencial, o vetor de expressão contém um gene marcador selecionável para permitir a seleção de células hospedeiras transformadas. Os genes marcadores selecionáveis são bem conhecidos na técnica e variarão com a célula hospedeira usada.

[0140]Em determinados aspectos da invenção, o ácido nucléico em questão é proporcionado em um vetor de expressão que compreende uma sequência de nucleotídeo que codifica um polipeptídeo de GDF Trap e operacionalmente ligado a pelo menos uma sequência regulatória. As sequências regulatórias são reconhecidas na técnica e são selecionadas para direcionar a expressão do polipeptídeo de GDF Trap. De modo correspondente, o termo “sequência regulatória” inclui promotores, acentuadores, e outros elementos de controle de expressão. As sequências regulatórias exemplificadoras são descritas em Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por exemplo, qualquer entre uma ampla variedade de sequências de controle de expressão que controlam a expressão de uma sequência de DNA quando operacionalmente ligada à mesma pode ser usada nesses vetores para expressar sequências de DNA que codificam um polipeptídeo de GDF Trap. Essas sequências de controle de expressão úteis incluem, por exemplo, os promotores precoces e tardios de SV40, promotor tet, promotor precoce imediato de adenovírus ou citomegalovírus, promotores RSV, o sistema lac, o sistema trp, o sistema TAC ou TRC, promotor T7 cuja expressão é direcionada por T7 RNA polimerase, as regiões de operador e promotor princi-

pal de fago lambda, e regiões de controle para a proteína envoltória fd, o promotor para 3-fosfoglicerato quinase ou outras enzimas glicolíticas, os promotores de fosfatase ácida, por exemplo, Pho5, os promotores dos fatores  $\alpha$ -correspondentes de levedura, o promotor de poliedro do sistema baculovírus e outras sequências conhecidas por controlarem a expressão de genes de células procarióticas ou eucarióticas ou seus vírus, e várias combinações destes. Deve-se compreender que o design do vetor de expressão pode depender de tais fatores como a escolha da célula hospedeira a ser transformada e/ou o tipo de proteína que se deseja expressar. Ademais, o número de cópia do vetor, a capacidade de controlar tal número de cópia e a expressão de qualquer outra proteína codificada pelo vetor, tais como marcadores antibióticos, também deve ser considerado.

[0141]Um ácido nucléico recombinante da invenção pode ser produzido ligando-se o gene clonado, ou uma porção deste, em um vetor adequado para expressão em células procarióticas, células eucarióticas (levedura, aves, insetos ou mamíferos), ou ambos. Os veículos de expressão para produção de um polipeptídeo recombinante de GDF Trap incluem plasmídeos e outros vetores. Por exemplo, os vetores adequados incluem plasmídeos dos tipos: plasmídeos derivados de pBR322, plasmídeos derivados de pEMBL, plasmídeos derivados pEX, plasmídeos derivados de pBTac e plasmídeos derivados de PUC para expressão em células procarióticas, como *E. coli*.

[0142]Alguns vetores de expressão de mamíferos contêm ambas as sequências procarióticas para facilitar a propagação do vetor em bactérias, e uma ou mais unidades de transcrição eucariótica que sejam expressas em células eucarióticas. Os vetores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo e pHg4 são exemplos de vetores de expressão de mamíferos adequados para transfecção de células eucarióticas. Alguns desses vetores são modificados com sequências de plasmídeos

bacterianos, como pBR322, para facilitar a replicação e a seleção de resistência a fármacos em células procarióticas e eucarióticas. Alternativamente, os derivados de vírus, como o vírus do papilloma bovino (BPV-1), ou vírus Epstein-Barr (pHEBo, pREP-derivado e p205) podem ser usados para expressão transiente de proteínas em células eucarióticas. Exemplos de outros sistemas de expressão viral (incluindo retroviral) podem ser encontrados abaixo na descrição de sistemas de distribuição de terapia genética. Os vários métodos empregados 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, bem como procedimentos recombinantes gerais, vide *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2<sup>a</sup> Ed., ed. por Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) Capítulos 16 e 17. Em alguns casos, pode ser desejável expressar os polipeptídeos recombinantes pelo uso de um sistema de expressão de baculovírus. Exemplos de sistemas de expressão de baculovírus incluem vetores derivados de pVL (como pVL1392, pVL1393 e pVL941), vetores derivados de pAcUW (como pAcUW1), e vetores derivados pBlueBac (como β-gal contendo pBlueBac III).

[0143]Em uma modalidade preferencial, um vetor será designado para a produção dos polipeptídeos de GDF Trap em questão em células CHO, como um vetor Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vetores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) e vetores pCI-neo (Promega, Madison, Wisc.). Conforme ficará aparente, as construções de gene em questão podem ser usadas para causar a expressão dos polipeptídeos de GDF Trap em questão em células propagadas em cultura, por exemplo, para produzir proteínas, incluindo proteínas de fusão ou proteínas variantes, para purificação.

[0144]Esta invenção também pertence a uma célula hospedeira transfetada com um gene recombinante incluindo uma sequência de codificação (por exemplo,

SEQ ID NO: 4, 5, 25, 27, 30 ou 31) para um ou mais polipeptídeos de GDF Trap em questão. A célula hospedeira pode ser qualquer célula procariótica ou eucariótica. Por exemplo, um polipeptídeo de GDF Trap da invenção pode ser expresso em células bacterianas, 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 pelos indivíduos versados na técnica.

[0145] De modo correspondente, a presente invenção se refere, ainda, a métodos de produzir os polipeptídeos de GDF Trap em questão. Por exemplo, uma célula hospedeira transfetada com um vetor de expressão que codifica um polipeptídeo de GDF Trap pode ser culturada sob condições apropriadas para permitir que a expressão do polipeptídeo de GDF Trap ocorra. O polipeptídeo de GDF Trap pode ser secretado e isolado a partir de uma mistura de células e meio contendo o polipeptídeo de GDF Trap. Alternativamente, o polipeptídeo de GDF Trap pode ser retirado citoplasmaticamente ou em uma fração de membrana e células coletadas, lisadas e proteínas isoladas. Uma cultura celular inclui células hospedeiras, meios e outros subprodutos. Os meios adequados para cultura celular são bem conhecidos na técnica. Os polipeptídeos de GDF Trap em questão podem ser isolados do meio de cultura celular, células hospedeiras, ou ambas, usando técnicas conhecidas na arte para purificar proteínas, incluindo cromatografia de troca de íons, cromatografia de filtração de gel, ultrafiltração, eletroforese, e purificação de imunoafinidade com anticorpos específicos para epítópos particulares dos polipeptídeos de GDF Trap. Em uma modalidade preferencial, o polipeptídeo de GDF Trap é uma proteína de fusão contendo um domínio que facilita sua purificação.

[0146] Em outra modalidade, uma codificação de gene de fusão para uma sequência líder de purificação, como um sítio de clivagem de poli-(His)/enteroquinase na terminação N da porção desejada do polipeptídeo de GDF Trap recombinante, pode permitir a purificação da proteína de fusão expressa por

cromatografia de afinidade usando uma resina de metal Ni<sup>2+</sup>. A sequência líder de purificação pode, então, ser subsequentemente removida pelo tratamento com enteroquinase para proporcionar o polipeptídeo de GDF Trap purificado (por exemplo, vide Hochuli et al., (1987) *J. Chromatography* 411:177; e Janknecht et al., *PNAS USA* 88:8972).

[0147]As técnicas para produção de genes de fusão são bem conhecidas. Essencialmente, a união de vários fragmentos de DNA que codificam diferentes sequências de polipeptídeo é realizada de acordo com técnicas convencionais, empregando terminações com extremidade cega ou com extremidade irregular para ligação, digestão de enzima de restrição para proporcionar terminações apropriadas, preenchimento de extremidades coesivas conforme apropriado, tratamento com fosfatase alcalina para evitar uniões indesejáveis, e ligação enzimática. Em outra modalidade, o gene de fusão pode ser sintetizado por técnicas convencionais incluindo sintetizadores de DNA automatizados. Alternativamente, a amplificação PCR de fragmentos de gene pode ser realizada usando iniciadores de âncora que provocam protuberâncias complementares entre dois fragmentos de genes consecutivos que podem ser subsequentemente anelados para gerar uma sequência de gene quimérico (vide, por exemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

#### Ensaios de triagem

[0148]Em determinados aspectos, a presente invenção se refere ao uso dos polipeptídeos de GDF Trap em questão (por exemplo, polipeptídeos ActRIIB variante solúveis) para identificar compostos (agentes) que são agonistas ou antagonistas de polipeptídeos ActRIIB. Os compostos identificados através desta triagem podem ser testados para avaliar sua capacidade de modular os níveis de hemácias, hemoglobinas e/ou reticulócitos *in vivo* ou *in vitro*. Esses compostos podem ser testados, por exemplo, em modelos animais.

[0149] Existem várias abordagens para triar agentes terapêuticos para aumentar os níveis de hemácias ou hemoglobinas direcionando-se a sinalização ActRIIB. Em determinadas modalidades, a triagem de alto rendimento de compostos pode ser realizada para identificar agentes que perturbem efeitos mediados por ActRIIB em uma linhagem celular selecionada. Em determinadas modalidades, o ensaio é realizado para triar e identificar compostos que inibam ou reduzam especificamente a ligação de um polipeptídeo ActRIIB a seu parceiro de ligação, como um ligante ActRIIB (por exemplo, activina, Nodal, GDF8, GDF11 ou BMP7). Alternativamente, o ensaio pode ser usado para identificar os compostos que acentuam a ligação de um polipeptídeo ActRIIB a seu parceiro de ligação, como um ligante ActRIIB. Em uma modalidade adicional, os compostos podem ser identificados por sua capacidade de interagir com um polipeptídeo ActRIIB.

[0150] Uma variedade de formatos de ensaio bastará e, em vista da presente revelação, aqueles não expressamente descritos no presente documento serão, todavia, compreendidos por um indivíduo com conhecimento comum na técnica. Conforme descrito no presente documento, os compostos (agentes) de teste da invenção podem ser criados por qualquer método químico combinatório. Alternativamente, os compostos em questão podem ser biomoléculas de ocorrência natural sintetizadas *in vivo* ou *in vitro*. Os compostos (agentes) a serem testados para determinação de sua capacidade para atuar como moduladores de crescimento tecidual podem ser produzidos, por exemplo, por bactérias, levedura, plantas ou outros organismos (por exemplo, produtos naturais), produzidos quimicamente (por exemplo, moléculas pequenas, incluindo peptidomiméticas), ou recombinantemente produzidos. Os compostos de teste contemplados pela presente invenção incluem moléculas orgânicas de não-peptidil, peptídeos, polipeptídeos, peptidomiméticas, açúcares, hormônios, e moléculas de ácido nucléico. Em uma modalidade específica, o agente de teste é uma molécula orgânica pequena tendo um peso molecular menor que cerca de

2.000 Daltons.

[0151]Os compostos de teste da invenção podem ser proporcionados como entidades únicas discretas, ou proporcionados em bibliotecas de maior complexidade, como aquelas feitas por química combinatória. Essas bibliotecas podem compreender, por exemplo, álcoois, haletos de alquila, aminas, amidas, ésteres, aldeídos, éteres e outras classes de compostos orgânicos. A apresentação dos compostos de teste ao sistema de teste pode ser uma forma isolada ou misturas de compostos, especialmente em etapas de triagem iniciais. Opcionalmente, os compostos podem ser opcionalmente derivatizados com outros compostos e ter grupos de derivatização que facilitem o isolamento dos compostos. Exemplos não-limitantes de grupos de derivatização incluem biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína verde fluorescente, isótopos, poliistidina, microesferas magnéticas, glutationa S transferase (GST), reticuladores fotoativáveis ou quaisquer combinações destes.

[0152]Em muitos programas de triagem de fármacos que testam bibliotecas de compostos e extratos naturais, ensaios de alto rendimento são desejáveis a fim de maximizar o número de compostos inspecionados em um dado período de tempo. Os ensaios que são realizados em sistemas livres de células, que podem ser derivados com proteínas purificadas ou semipurificadas, são geralmente preferenciais como triagens “primárias” em que estes podem ser gerados para permitir um rápido desenvolvimento e detecção relativamente fácil de uma alteração em um alvo molecular que é mediado por um composto de teste. Ademais, os efeitos de toxicidade celular ou biodisponibilidade do composto de teste podem ser genericamente ignorados no sistema *in vitro*, sendo que o ensaio é focado primariamente no efeito do fármaco no alvo molecular visto que pode ser manifestado em uma alteração de afinidade de ligação entre um polipeptídeo ActRIIB e seu parceiro de ligação (por exemplo, um ligante ActRIIB).

[0153]Meramente para ilustrar, em um ensaio de triagem exemplificador da

presente invenção, o composto de interesse é colocado em contato com um polipeptídeo ActRIIB isolado e purificado que seja ordinariamente capaz de ligação a um ligante ActRIIB, conforme apropriado pelo propósito do ensaio. À mistura do composto, adiciona-se o polipeptídeo ActRIIB a uma composição contendo um ligante ActRIIB. A detecção e a quantificação de complexos de ligante ActRIIB/ActRIIB proporcionam um meio para determinar a eficácia do composto em inibir (ou potencializar) a formação de complexo entre o polipeptídeo ActRIIB e sua proteína de ligação. A eficácia do composto pode ser avaliada gerando-se curvas de resposta de dose a partir de dados obtidos usando várias concentrações do composto de teste. Ademais, um ensaio de controle também pode ser realizado para proporcionar uma linha de base para comparação. Por exemplo, em um ensaio de controle, adiciona-se um ligante ActRIIB isolado e purificado a uma composição contendo o polipeptídeo ActRIIB, e a formação de um complexo ligante ActRIIB/ActRIIB é quantificada na ausência do composto de teste. Compreender-se que, em geral, a ordem na qual os reagentes podem ser misturados pode ser variada, e podem ser misturados simultaneamente. Ademais, no lugar de proteínas purificadas, extratos e lisatos celulares podem ser usados para fornecer um sistema de ensaio livre de células adequado.

[0154]A formação complexa entre o polipeptídeo 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, como polipeptídeo ActRIIB radiomarcado (por exemplo, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C ou <sup>3</sup>H), marcado de modo fluorescente (por exemplo, FITC), ou enzimaticamente marcado ou sua proteína de ligação, por imunoensaio, ou por detecção cromatográfica.

[0155]Em determinadas modalidades, a presente invenção contempla o uso de ensaios de polarização de fluorescência e ensaios de transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET) em medir, seja direta ou indiretamente, o grau

de interação entre um polipeptídeo ActRIIB e sua proteína de ligação. Ademais, outros modos de detecção, como aqueles baseados em guias de onda óptica (Publicação PCT WO 96/26432 e Patente U.S. No. 5.677.196), ressonância plasmônica superficial (SPR), sensores de carga superficial, e sensores de força superficial, são compatíveis a muitas modalidades da invenção.

[0156]Ademais, a presente invenção contempla o uso de um ensaio de Trap de interação, também conhecido como “ensaio de duplo híbrido”, para identificar agentes que interrompam ou potenciem a interação entre um polipeptídeo ActRIIB e seu parceiro de ligação. Vide, por exemplo, a Patente 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 contempla o uso de sistemas de duplo-híbrido reversos para identificar compostos (por exemplo, moléculas pequenas ou peptídeos) que dissociam interações entre um polipeptídeo ActRIIB e sua proteína de ligação. Vide, por exemplo, Vidal and Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29; Vidal and Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81; e as Patentes U.S. Nos. 5.525.490; 5.955.280; e 5.965.368.

[0157]Em determinadas modalidades, os compostos em questão são identificados por sua capacidade de interagir com um polipeptídeo ActRIIB. A interação entre o composto e o polipeptídeo ActRIIB pode ser covalente ou não-covalente. Por exemplo, essa interação pode ser identificada no nível de proteína usando métodos biomecânicos *in vitro*, incluindo foto-reticulação, ligação ao ligante radiomarcado, e cromatografia de afinidade (Jakoby WB et al., 1974, Methods in Enzymology 46: 1). Em determinados casos, os compostos podem ser triados em um ensaio baseado em mecanismo, como um ensaio para detectar compostos que se ligam a um polipeptídeo ActRIIB. Isto pode incluir um evento de ligação em fase sólida ou em fase fluida. Alternativamente, o gene que codifica um polipeptídeo ActRIIB pode ser trans-

fectado com um sistema repórter (por exemplo,  $\beta$ -galactosidase, luciferase, ou proteína verde fluorescente) em uma célula e triado em relação a uma biblioteca preferencialmente por uma triagem de alto rendimento ou com membros individuais da biblioteca. Outros ensaios de ligação baseados em mecanismo podem ser usados, por exemplo, ensaios de ligação que detectem alterações em energia livre. Ensaio de ligação podem ser realizados com o alvo fixo a um poço, microesfera ou chip ou capturados por um anticorpo imobilizado ou separados por eletroforese capilar. Os compostos ligados podem ser detectados geralmente usando ressonância colorimétrica, ressonância de fluorescência ou ressonância plasmônica superficial.

#### Usos terapêuticos exemplificadores

[0158]Em determinadas modalidades, os polipeptídeos de GDF Trap da presente invenção podem ser usados para aumentar os níveis de hemácias em mamíferos, como roedores e primatas, e particularmente pacientes humanos. Os polipeptídeos de GDF Trap, opcionalmente combinados com um ativador de receptor EPO, podem ser úteis para tratar eritropoiese ineficaz. Originalmente distinguido de anemia aplásica, hemorragia, ou hemólise periférica com base nos estudos de ferrocinética (Ricketts et al., 1978, Clin Nucl Med 3:159-164), a eritropoiese ineficaz descreve um grupo diverso de anemias nas quais a produção de RBCs maduros é menor que seria esperado dado o número de precursores de eritróide (eritroblastos) presentes na medula óssea (Tanno et al., 2010, Adv Hematol 2010:358283). Nessas anemias, a hipoxia tecidual persiste apesar os níveis elevados de eritropoietina devido à produção ineficaz de RBCs maduros. Um ciclo vicioso eventualmente se desenvolve em que os níveis elevados de eritropoietina conduzem uma expansão massiva de eritroblastos, levando potencialmente à esplenomegalia (aumento do baço) devido à eritropoiese extramedular (Aizawa et al, 2003, Am J Hematol 74:68-72), patologia óssea induzida por eritroblasto (Di Matteo et al, 2008, J Biol Regul Homeost Agents 22:211-216), e sobrecarga de ferro tecidual, mesmo na ausência de transfusões de

RBC terapêutico (Pippard et al, 1979, Lancet 2:819-821). Logo, aumentando-se a eficácia eritropoietica, um polipeptídeo de GDF Trap pode quebrar o ciclo supramencionado e pode aliviar não somente a anemia latente, mas também complicações associadas aos níveis elevados de eritropoietina, esplenomegalia, patologia óssea, e sobrecarga de ferro tecidual. Os polipeptídeos de GDF Trap podem tratar eritropoiese ineficaz, incluindo anemia e níveis elevados de EPO, bem como complicações, como esplenomegalia, patologia óssea induzida por eritroblasto, e sobrecarga de ferro, e suas patologias concomitantes. Com esplenomegalia, essas patologias incluem dores torácicas ou abdominais e hiperplasia reticuloendotelial. Hematopoiese extramedular pode ocorrer não somente no baço, mas potencialmente em outros tecidos sob a forma de pseudotumores hematopoiéticos extramedulares (Musallam et al., 2012, Cold Spring Harb Perspect Med 2:a013482). Com patologia óssea induzida por eritroblasto, as patologias concomitantes incluem baixa densidade mineral óssea, osteoporose, e dores ósseas (Haidar et al., 2011, Bone 48:425-432). Com sobrecarga de ferro, as patologias concomitantes incluem supressão de hepcidina e hiperabsorção de ferro alimentar (Musallam et al., 2012, Blood Rev 26(Suppl 1):S16-S19), múltiplas endocrinopatias e fibrose/cirrose hepática (Galanello et al., 2010, Orphanet J Rare Dis 5:11), e cardiomiopatia por sobrecarga de ferro (Lekawanvijit et al., 2009, Can J Cardiol 25:213-218).

[0159]As causas mais comuns de eritropoiese ineficaz são as síndromes de talassemia, hemoglobinopatias hereditárias onde desequilíbrios na produção de cadeias intactas de alfa- e beta-hemoglobina levam a uma apoptose aumentada durante a maturação de eritroblasto (Schrier, 2002, Curr Opin Hematol 9:123-126). As talassemias estão coletivamente entre os distúrbios genéticos mais frequentes no mundo, com padrões epidemiológicos em alteração previstos para contribuir a um problema de saúde pública crescente tanto nos EUA como globalmente (Vichinsky, 2005, Ann NY Acad Sci 1054:18-24). As síndromes de talassemia são nomeadas de

acordo com sua gravidade. Logo, α-talassemias incluem α-talassemia menor (também conhecida como traço α-talassêmico; dois genes de α-globina afetados), doença de hemoglobina H (três genes de α-globina afetados), e α-talassemia maior (também conhecida como hidropsia fetal; quatro genes de α-globina afetados). β-Talassemias incluem β-talassemia menor (também conhecida como traço β-talassêmico; um gene de β-globina afetado), β-talassemia intermediária (dois genes de β-globina afetados), talassemia de hemoglobina E (dois genes de β-globina afetados), e β-talassemia maior (também conhecida como anemia de Cooley; dois genes de β-globina afetados resultando em uma ausência completa de proteína de β-globina). β-Talassemia impacta múltiplos órgãos, é associada a morbidez considerável e à mortalidade, e atualmente requer cuidados a longo prazo. Embora a expectativa de vida em pacientes com β-talassemia tenha aumentado nos últimos anos devido ao uso de transfusões de sangue regulares em combinação com quelação de ferro, sobrecarga de ferro resultando de transfusões e da absorção gastrointestinal excessiva de ferro pode causar complicações sérias, como doenças cardíacas, trombose, hipogonadismo, hipotiroidismo, diabetes, osteoporose, e osteopenia (Rund et al, 2005, N Engl J Med 353:1135-1146). Conforme demonstrado no presente documento com um modelo de camundongo de β-talassemia, um polipeptídeo de GDF Trap, opcionalmente combinado com um ativador de receptor EPO, pode ser usado para tratar síndromes de talassemia.

[0160]Os polipeptídeos de GDF Trap, opcionalmente combinados com um ativador de receptor EPO, podem ser usados para tratar distúrbios de eritropoiese ineficaz além de síndromes de talassemia. Esses distúrbios incluem anemia sideroblástica (herdada ou adquirida); anemia diseritropoiética (Tipos I e II); anemia de célula falsiforme; esferocitose hereditária; deficiência de piruvato quinase; anemias megaloblásticas, potencialmente causadas por condições, como deficiência de folato (devido a doenças congênitas, absorção reduzida, ou exigências aumentadas), defi-

ciência de cobalamina (devido a doenças congênitas, anemia perniciosa, absorção deficiente, insuficiência pancreática, ou absorção reduzida), determinados fármacos, ou causas inexplicadas (anemia diseritropoiética congênita, anemia megaloblástica refratária, ou eritroleucemia); anemias mieloftísicas, incluindo mielofibrose (metaplasia mielóide) e mieloftise; porfíria eritropoética congênita; e envenenamento plúmbeo.

[0161]Conforme o uso em questão, um agente terapêutico que “evita” um distúrbio ou condição se refere a um composto que, em uma amostra estatística, reduz a ocorrência do distúrbio ou condição na amostra tratada em relação a uma amostra de controle não-tratada, ou retarda o princípio ou reduz a gravidade de um ou mais sintomas do distúrbio ou condição em relação à amostra de controle não-tratada. O termo “tratar” conforme o uso em questão inclui a melhora ou a eliminação da condição uma vez que for estabelecida. Em ambos os casos, a prevenção ou tratamento podem ser discernidos no diagnóstico fornecido por um médico ou outro profissional da área de saúde e o resultado destinado de administração do agente terapêutico.

[0162]Conforme mostrado no presente documento, os polipeptídeos de GDF Trap, opcionalmente combinados com um ativador de receptor EPO, podem ser usados para aumentar os níveis de hemácias, hemoglobinas ou reticulócitos em indivíduos saudáveis, e tais polipeptídeos de GDF Trap podem ser usados em populações de pacientes selecionados. Exemplos de populações de pacientes apropriados incluem aqueles com níveis de hemácias ou hemoglobinas indesejavelmente baixos, tais como pacientes tendo uma anemia, e aqueles que estejam em risco de desenvolver níveis de hemácias ou hemoglobinas indesejavelmente baixos, como aqueles pacientes que estão prestes a serem submetidos a uma cirurgia grande ou a outros procedimentos que possam resultar em perda substancial de sangue. Em uma modalidade, um paciente com níveis de hemácias adequados é tratado com um poli-

peptídeo de GDF Trap para aumentar os níveis de hemácias, e, então, o sangue é colhido e armazenado para uso posterior em transfusões.

[0163]Os polipeptídeos de GDF Trap, opcionalmente combinado com um ativador de receptor EPO, revelados no presente documento podem ser usados para aumentar os níveis de hemácias em pacientes com uma anemia. Ao observar os níveis de hemoglobinas em seres humanos, um nível menor que o normal para a categoria apropriada de idade e sexo pode ser indicativo de anemia, embora variações individuais sejam levadas em consideração. Por exemplo, um nível de hemoglobina de 12 g/dl é genericamente considerado o limite inferior normal na população de adultos em geral. As causas potenciais incluem perda de sangue, déficits nutricionais, reações a medicamentos, vários problemas na medula óssea e muitas doenças. Mais particularmente, a anemia é associada a uma variedade de distúrbios que incluem, por exemplo, insuficiência renal crônica, síndrome mielodisplásica, artrite reumatoide, transplante de medula óssea. A anemia também pode estar associada com as seguintes condições: tumores sólidos (por exemplo, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de cólon); tumores do sistema linfático (por exemplo, leucemia linfocitária crônica, linfomas de não-Hodgkin e linfomas de Hodgkin); tumores do sistema hematopoiético (por exemplo, leucemia, síndrome mielodisplásica, mieloma múltiplo); radioterapia; quimioterapia (por exemplo, regimes contendo platina); doenças inflamatórias e autoimunes, incluindo, mas sem limitar-se a, artrite reumatoide, outras artrites inflamatórias, lúpus eritematoso sistêmico (LES), doenças cutâneas agudas ou crônicas (por exemplo, psoríase), doença inflamatória do intestino (por exemplo, doença de Crohn e colite ulcerosa); doença ou insuficiência renal aguda ou crônica, incluindo condições congênitas ou idiopáticas; doenças hepáticas agudas ou crônicas; sangramento agudo ou crônico; situações em que a transfusão de hemácias não é possível devido aos alo -ou auto-anticorpos do paciente e / ou por motivos religiosos (por exemplo, algumas Testemunhas de Jeová); infecções (por

exemplo, malária, osteomielite); hemoglobinopatias, incluindo, por exemplo, doença de células falciformes, talassemias; o uso ou abuso de drogas, por exemplo, alcoolismo; pacientes pediátricos com anemia por qualquer causa para evitar a transfusão; e pacientes idosos ou pacientes com doença cardiopulmonar concomitante à anemia que não podem receber transfusões devido a preocupações com sobrecarga circulatória.

[0164]A síndrome mielodisplásica (MDS) é uma coleção diversa de condições hematológicas pela produção ineficaz de células sanguíneas de mielóide e risco de transformação a leucemia milogenosa aguda. Em pacientes MDS, as células-tronco sanguíneas não se desenvolvem em hemácias, leucócitos, ou plaquetas saudáveis. Os distúrbios MDS incluem, por exemplo, anemia refratária, anemia refratária com sideroblastos em anel, anemia refratária com blastos em excesso, anemia refratária com blastos em excesso em transformação, citopenia refratária com displasia multilinhagem, e síndrome mielodisplásica associada a uma anomalia no cromossomo 5q isolado. À medida que esses distúrbios se manifestam como defeitos irreversíveis tanto em qualidade como em quantidade de células hematopoiéticas, a maioria dos pacientes MDS sofre de anemia crônica. Portanto, os pacientes MDS eventualmente requerem transfusões de sangue e/ou tratamento com fatores de crescimento (por exemplo, eritropoietina ou G-CSF) para aumentar os níveis de hemácias. No entanto, muitos pacientes MDS desenvolvem efeitos colaterais devido à frequência dessas terapias. Por exemplo, os pacientes que recebem transfusões de hemácias frequentes podem ter lesões nos tecidos e órgãos provenientes do acúmulo adicional de ferro. Conforme demonstrado nos Exemplos abaixo, os polipeptídeos de GDF Trap foram usados para tratar anemia em um modelo de camundongo de MDS. De modo correspondente, os polipeptídeos de GDF Trap revelados no presente documento podem ser usados para tratar pacientes com MDS. Em determinadas modalidades, pacientes que sofrem de MDS podem ser tratados usando uma combina-

ção de um polipeptídeo de GDF Trap em combinação com um ativador de receptor EPO. Em outras modalidades, o paciente que sofre de MDS pode ser tratado usando uma combinação de um polipeptídeo de GDF Trap e um ou mais agentes terapêuticos adicionais para tratar MDS incluindo, por exemplo, talidomida, lenalidomida, azacitadina, decitabina, eritropoietinas, deferoxamina, globulina antiimócito, filgrastima (G-CSF) e um agonista de trajetória de sinalização de eritropoietina.

[0165]Os polipeptídeos de GDF Trap, opcionalmente combinados com um ativador de receptor EPO, seriam apropriados para tratar anemias de medula óssea hipoproliferativa, que são tipicamente associadas a pouca alteração na morfologia das hemácias (RBC). As anemias hipoproliferativas incluem: 1) anemia de doença crônica, 2) anemia de doença renal, e 3) anemia associada a estados hipometabolíticos. Em cada um desses tipos, níveis de eritropoietina endógenos são inapropriadamente baixos para o grau de anemia observado. Outras anemias hipoproliferativas incluem: 4) anemia ferro-deficiente em estágio precoce, e 5) anemia causada por lesões à medula óssea. Nesses tipos, os níveis de eritropoietina endógenos são apropriadamente elevados para o grau de anemia observado.

[0166]O tipo mais comum é a anemia de doença crônica, que abrange inflamação, infecção, lesões teciduais, e condições como câncer, e é distinguida por níveis de eritropoietina baixos e por uma resposta inadequada à eritropoietina na medula óssea (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17<sup>a</sup> ed.; McGraw Hill, New York, pp 628-634). Muitos fatores podem contribuir para anemia relacionada a câncer. Alguns estão associados ao próprio processo da doença e à geração de citocinas inflamatórias, como interleucina-1, interferon-gama, e fator de necrose tumoral (Bron et al., 2001, Semin Oncol 28(Suppl 8):1-6). Dentre esses efeitos, a inflamação induz a hepcidina de peptídeo ferro-regulador chave, limitando, assim, a exportação de ferro a partir dos macrófagos e geralmente limitando a disponibilidade de ferro para eritropoiese (Ganz, 2007, J Am Soc Nephrol 18:394-400).

A perda de sangue através de várias rotas também pode contribuir para anemia relacionada a câncer. A prevalência de anemia devida ao progresso de câncer varia com o tipo de câncer, variando de 5% em câncer de próstata até 90% em mieloma múltiplo. A anemia relacionada a câncer tem profundas consequências para pacientes, incluindo fadiga e qualidade de vida reduzida, eficácia de tratamento reduzida, e mortalidade aumentada.

[0167]A doença renal crônica é associada à anemia hipoproliferativa que varia em gravidade com o grau de insuficiência renal. Essa anemia ocorre primariamente devido à produção inapropriada de eritropoietina e sobrevivência reduzida de hemácias. A doença renal crônica geralmente avança gradualmente ao longo de um período de anos ou décadas até a doença em estágio final (Estágio-5), no qual diálise pontual ou transplante de rim é necessário para sobrevivência do paciente. Geralmente, a anemia se desenvolve precocemente neste processo e piora à medida que a doença progride. As consequências clínicas de anemia de doença renal são bem documentados e incluem o desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda, função cognitiva deficiente, qualidade de vida reduzida, e função imune alterada (Levin et al., 1999, Am J Kidney Dis 27:347-354; Nissenson, 1992, Am J Kidney Dis 20(Suppl 1):21-24; Revicki et al., 1995, Am J Kidney Dis 25:548-554; Gafter et al., 1994, Kidney Int 45:224-231). Conforme demonstrado pelos Requerentes em um modelo de camundongo de doença renal crônica (vide o Exemplo abaixo), um polipeptídeo de GDF Trap, opcionalmente combinado com um ativador de receptor EPO, pode ser usado para tratar anemia de doença renal.

[0168]Muitas condições resultantes em uma taxa hipometabólica podem produzir uma anemia hipoproliferativa branda-a-moderada. Dentre essas condições estão os estados de deficiência endócrina. Por exemplo, a anemia pode ocorrer em doença de Addison, hipotiroidismo, hiperparatiroidismo, ou em machos que sejam castrados ou tratados com estrogênio. A anemia branda-a-moderada também pode

ocorrer com ingestão dietética reduzida de proteínas, uma condição particularmente prevalente em idosos. Finalmente, a anemia pode se desenvolver em pacientes com doenças hepáticas crônicas que podem aparecer de qualquer causa (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17<sup>a</sup> ed.; McGraw Hill, New York, pp 628-634).

[0169]A anemia resultante da perda de sangue aguda de volume suficiente, tal como proveniente de hemorragia por trauma ou pós-parto, é conhecida como anemia pós-hemorrágica aguda. A perda de sangue aguda inicialmente causa hipovolemia sem anemia visto que ocorre uma depleção proporcional de RBCs junto a outros constituintes do sangue. No entanto, a hipovolemia irá acionar rapidamente mecanismos fisiológicos que transfere o fluido do compartimento extravascular ao compartimento vascular, que resulta em hemodiluição e em anemia. Caso seja crônica, a perda de sangue esgota gradualmente os armazenamentos de ferro no corpo e eventualmente leva à deficiência de ferro. Conforme demonstrado pelos Requerentes em um modelo de camundongo (vide o Exemplo abaixo), um polipeptídeo de GDF Trap, opcionalmente combinado com um ativador de receptor EPO, pode ser usado para acelerar a recuperação da anemia de perda de sangue aguda.

[0170]A anemia por deficiência de ferro é o estágio final em uma progressão gradual de deficiência de ferro crescente que inclui equilíbrio negativo de ferro e eritropoiese ferro-deficiente como estágios intermediários. A deficiência de ferro pode resultar a partir de uma demanda aumentada por ferro, ingestão reduzida de ferro, ou perda aumentada de ferro, conforme exemplificado em condições, como gravidez, dieta inadequada, falta de absorção intestinal, inflamação aguda ou crônica, e perda de sangue aguda ou crônica. Com anemia branda-a-intermediária deste tipo, a medula óssea permanece hipoproliferativa, e a morfologia de RBC é amplamente normal; no entanto, a anemia branda pode resultar em alguns RBCs hipocrômicos microcíticos, e a transição para anemia ferro-deficiente grave é acompanhada por

hiperproliferação da medula óssea e em RBCs microcíticos e hipocrônicos crescentemente prevalentes (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17<sup>a</sup> ed.; McGraw Hill, New York, pp 628-634). A terapia apropriada para anemia ferro-deficiente depende de sua causa e gravidade, com preparações orais de ferro, formulações parenterais de ferro, e transfusão de RBC como opções convencionais principais. Um polipeptídeo de GDF Trap, opcionalmente combinado com um ativador de receptor EPO, poderia ser usado para tratar anemias ferro-deficientes crônicas sozinho ou em combinação com abordagens terapêuticas convencionais, particularmente para tratar anemias de origem multifatorial.

[0171]As anemias hipoproliferativas podem resultar a partir de disfunção primária ou insuficiência da medula óssea, ao invés de uma disfunção secundária à inflamação, infecção, ou progressão de câncer. Exemplos proeminentes seriam a mielossupressão causada por fármacos quimioterapêuticos contra câncer ou terapia de radiação contra câncer. Uma extensa revisão de testes clínicos constatou que a anemia branda pode ocorrer em 100% dos pacientes após quimioterapia, enquanto uma anemia mais grave pode ocorrer em até 80% desses pacientes (Groopman et al., 1999, J Natl Cancer Inst 91:1616-1634). Os fármacos mielossupressivos incluem: 1) agentes de alquilação, como mostardas de nitrogênio (por exemplo, melfalano) e nitrosoureas (por exemplo, estreptozocina); 2) antimetabólicos, como antagonistas de ácido fólico (por exemplo, metotrexato), análogos de purina (por exemplo, tioguanina), e análogos de pirimidina (por exemplo, gemcitabina); 3) antibióticos citotóxicos, como antraciclinas (por exemplo, doxorubicina); 4) inibidores de quinase (por exemplo, gefitinib); 5) inibidores mióticos, como taxanos (por exemplo, paclitaxel) e alcalóides de vinca (por exemplo, vinorelbina); 6) anticorpos monoclonais (por exemplo, rituximab); e 7) inibidores de topoisomerase (por exemplo, topotecan e etoposida). Conforme demonstrado em um modelo de camundongo de anemia induzida por quimioterapia (vide o Exemplo abaixo), um polipeptídeo de GDF Trap, opci-

ionalmente combinado com um ativador de receptor EPO, pode ser usado para tratar anemia causada por agentes quimioterapêuticos e/ou radioterapia.

[0172]Os polipeptídeos de GDF Trap, opcionalmente combinados com um ativador de receptor EPO, também seriam apropriados para tratar anemias de maturação de RBC desordenada, que são caracterizadas em parte por RBCs de tamanho menor (microcítica), tamanho maior (macrocítica), deformados, ou anormalmente coloridos (hipocrômicos).

[0173]Em determinadas modalidades, os polipeptídeos de GDF Trap podem ser usados em combinação (por exemplo, administrados ao mesmo tempo ou em momentos diferentes, mas geralmente de tal modo a alcançar efeitos farmacológicos sobrepostos) com terapias auxiliares para eritropoiese ineficaz. Essas terapias incluem transfusão com hemácias ou sangue completo para tratar anemia. Em anemias crônicas ou hereditárias, os mecanismos normais para homeostase de ferro são sobrepujados por repetidas transfusões, levando eventualmente a um acúmulo tóxico ou potencialmente fatal de ferro em tecidos vitais, como coração, fígado, e glândulas endócrinas. Logo, as terapias auxiliares para pacientes cronicamente afetados com eritropoiese ineficaz também incluem um tratamento com uma ou mais moléculas ferro-quelantes para promover a excreção de ferro na urina e/ou fezes e, desse modo, evitar, ou reverter, a sobrecarga de ferro tecidual (Hershko, 2006, Haematologica 91:1307-1312; Cao et al, 2011, Pediatr Rep 3(2):e17). Os agentes ferro-quelantes eficazes devem ser capazes de ligarem seletivamente e neutralizarem ferro férrico, a forma oxidada de ferro ligado de não-transferrina que provavelmente representa a maioria da toxicidade de ferro através da produção catalítica de radicais de hidroxila e produtos de oxidação (Esposito et al, 2003, Blood 102:2670-2677). Esses agentes são estruturalmente diversos, mas todos possuem átomos doadores de oxigênio ou nitrogênio capazes de formar complexos de coordenação octaedral neutralizante com átomos de ferro individuais em estequiometrias de 1:1 (agentes de hexadenta-

to), 2:1 (tridentato), ou 3:1 (bidentato) (Kalinowski et al, 2005, Pharmacol Rev 57:547-583). Os agentes ferro-quelantes eficazes também têm um peso molecular relativamente baixo (menor que 700 daltons), com uma solubilidade em água e em lipídeo para permitir o acesso a tecidos afetados. Exemplos específicos de moléculas ferro-quelantes são deferoxamina, um agente de hexadentato de origem bacteriana que requer uma administração parenteral diária, e os agentes sintéticos oralmente ativos, como deferiprona (bidentato) e deferasirox (tridentato). A terapia de combinação que consiste em uma administração no mesmo dia de dois agentes ferro-quelantes se mostra promissora em pacientes indiferentes à monoterapia de queilação e também em superar problemas de fraca compatibilidade de pacientes à deferoxamina sozinha (Cao et al, 2011, Pediatr Rep 3(2):e17; Galanello et al, 2010, Ann NY Acad Sci 1202:79-86).

[0174]Em determinadas modalidades, os polipeptídeos de GDF Trap podem ser usados em combinação com agonistas de hepcidina para eritropoiese ineficaz. Um polipeptídeo circulante produzido principalmente no fígado, hepcidina, é considerado um regulador principal de metabolismo de ferro em virtude da sua capacidade de induzir a degradação de ferroportina, uma proteína de exportação de ferro localizada em enterócitos absorventes, hepatócitos, e macrófagos. Em linhas gerais, a hepcidina reduz a disponibilidade de ferro extracelular, logo, os agonistas de hepcidina podem ser benéficos no tratamento de eritropoiese ineficaz (Nemeth, 2010, Adv Hematol 2010:750643). Esta visão é suportada por efeitos benéficos de expressão de hepcidina aumentada em um modelo de camundongo de β-talassemia (Gargani et al, 2010, J Clin Invest 120:4466-4477).

[0175]Adicionalmente, conforme mostrado no presente documento, os polipeptídeos de GDF Trap podem ser usados em combinação com ativadores de receptor EPO para alcançar um aumento em hemácias em faixas de dosagem reduzidas. Isto pode ser benéfico em reduzir os efeitos fora do alvo conhecidos e riscos

associados a altas doses de ativadores de receptor EPO. Em determinadas modalidades, a presente invenção proporciona métodos para tratar ou prevenir anemia em um indivíduo em necessidade administrando-se ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipeptídeo de GDF Trap ou uma combinação (ou terapia concomitante) de um polipeptídeo de GDF Trap e um ativador de receptor EPO. Esses métodos podem ser usados para tratamentos terapêuticos e profiláticos de mamíferos, e, particularmente, seres humanos.

[0176]Os polipeptídeos de GDF Trap podem ser usados em combinação com ativadores de receptor EPO para reduzir a dose necessária desses ativadores em pacientes que sejam suscetíveis a efeitos colaterais de EPO. Os efeitos colaterais primários de EPO são um aumento excessivo nos níveis de hematócitos ou hemoglobinas e policitemia. Níveis elevados de hematócitos podem levar à hipertensão (mais particularmente, agravamento da hipertensão) e trombose vascular. Outros efeitos colaterais de EPO que foram reportados, alguns desses relacionados à hipertensão, são dores de cabeça, síndrome tipo influenza, obstrução de desvios, infartos do miocárdio e convulsões cerebrais devido à trombose, encefalopatia hipertensiva, e aplasia de hemácias (Singibarti, (1994) J. Clin Investig 72(suppl 6), S36-S43; Horl et al. (2000) Nephrol Dial Transplant 15(suppl 4), 51-56; Delanty et al. (1997) Neurology 49, 686-689; Bunn (2002) N Engl J Med 346(7), 522-523).

[0177]O efeito rápido nos níveis de hemácias dos polipeptídeos de GDF Trap revelados no presente documento indica que esses agentes atuam por um mecanismo diferente do EPO. De modo correspondente, esses antagonistas podem ser úteis para aumentar os níveis de hemácias e hemoglobinas em pacientes que não respondam bem a EPO. Por exemplo, um polipeptídeo de GDF Trap pode ser benéfico a um paciente no qual a administração de uma dose normal à aumentada (>300 IU/kg/semana) de EPO não resulta no aumento do nível de hemoglobina até o nível alvo. Pacientes com uma resposta EPO inadequada são encontrados em todos os

tipos de anemia, mas números maiores de não-respondedores foram observados com uma frequência particular em pacientes com cânceres e em pacientes com doença renal em estágio final. Uma resposta inadequada ao EPO pode ser constitutiva (isto é, observada mediante o primeiro tratamento com EPO) ou adquirida (por exemplo, observada mediante um tratamento repetido com EPO).

[0178]Os pacientes podem ser tratados com um regime de dosagem destinado a restaurar o paciente a um nível de hemoglobina alvo, geralmente entre cerca de 10 g/dl e cerca de 12,5 g/dl, e tipicamente cerca de 11,0 g/dl (vide também Jacobs et al. (2000) Nephrol Dial Transplant 15, 15-19), embora níveis alvo menores possam causar menos efeitos colaterais cardiovasculares. Alternativamente, os níveis de hematócitos (porcentagem do volume de uma amostra de sangue ocupada pelas células) podem ser usados para uma medição para determinação da condição de hemácias. Os níveis de hematócitos para indivíduos saudáveis variam de 41 a 51% para homens adultos e de 35 a 45% para mulheres adultas. Os níveis de hematócitos alvo são geralmente cerca de 30 a 33%. Ademais, os níveis de hemoglobinas/hematócitos variam de pessoa para pessoa. Logo, otimamente, o nível de hemoglobina/hematócrito alvo pode ser individualizado para cada paciente.

[0179]Em determinadas modalidades, a presente invenção proporciona métodos para gerenciar um paciente que tenha sido tratado, ou seja um candidato a ser tratado, com um polipeptídeo de GDF Trap medindo-se um ou mais parâmetros hematológicos no paciente. Os parâmetros hematológicos podem ser usados para avaliar a dosagem adequada para um paciente que seja um candidato a ser tratado com um polipeptídeo de GDF Trap, monitorar os parâmetros hematológicos durante o tratamento com um polipeptídeo de GDF Trap, avaliar se ajusta a dosagem durante o tratamento com um polipeptídeo de GDF Trap, e/ou avaliar uma dose de manutenção adequada de um polipeptídeo de GDF Trap. Se um ou mais parâmetros hematológicos estiverem fora do nível normal, a dosagem com um polipeptídeo de

GDF Trap pode ser reduzida, retardada ou encerrada.

[0180]Os parâmetros hematológicos que podem ser medidos de acordo com os métodos proporcionados no presente documento incluem, por exemplo, níveis de hemácias, pressão sanguínea, armazenamentos de ferro, e outros agentes encontrados em fluidos corporais que se correlacionem a níveis de hemácias aumentados, usando métodos reconhecidos na técnica. Esses parâmetros podem ser determinados usando uma amostra de sangue de um paciente. Os aumentos nos níveis de hemácias, níveis de hemoglobinas, e/ou níveis de hematócitos podem causar aumentos na pressão sanguínea.

[0181]Em uma modalidade, se um ou mais parâmetros hematológicos estiverem fora da faixa normal, ou acima do normal, em um paciente que seja um candidato a ser tratado com um polipeptídeo de GDF Trap, então, o princípio da administração do polipeptídeo de GDF Trap pode ser retardada até que os parâmetros hematológicos tenham retornado a um nível normal ou aceitável seja naturalmente ou através de intervenção terapêutica. Por exemplo, se um paciente candidato for hipertenso ou pré-hipertenso, então, o paciente pode ser tratado com um agente de redução de pressão sanguínea a fim de reduzir a pressão sanguínea do paciente. Qualquer agente de redução de pressão sanguínea apropriado para a condição do paciente individual pode ser usado, incluindo, por exemplo, diuréticos, inibidores adrenérgicos (incluindo alfa bloqueadores e beta bloqueadores), vasodilatadores, bloqueadores de canal de cálcio, inibidores de enzima de conversão de angiotensina (ACE), ou bloqueadores de receptor de angiotensina II. A pressão sanguínea pode ser alternativamente tratada usando um regime de dieta e exercícios. De modo similar, se um paciente candidato tiver armazenamentos de ferro que sejam menores que o normal, ou abaixo do normal, então, o paciente pode ser tratado com um regime apropriado de dieta e/ou suplementos de ferro até que os armazenamentos de ferro do paciente tenham retornado a um nível normal ou aceitável. Para pacientes

tendo níveis de hemácias e/ou níveis de hemoglobinas maiores que o normal, então, a administração do polipeptídeo de GDF Trap pode ser retardada até que os níveis tenham retornado a um nível normal ou aceitável.

[0182]Em determinadas modalidades, se um ou mais parâmetros hematológicos estiverem fora da faixa normal, ou acima do normal, em um paciente que seja um candidato a ser tratado com um polipeptídeo de GDF Trap, então, o princípio da administração pode não ser retardado. No entanto, a quantidade de dosagem ou a frequência de dosagem do polipeptídeo de GDF Trap podem ser ajustadas em uma quantidade que reduziria o risco de um aumento inaceitável nos parâmetros hematológicos resultante da administração do polipeptídeo de GDF Trap. Alternativamente, um regime terapêutico pode ser desenvolvido para o paciente que combina um polipeptídeo de GDF Trap com um agente terapêutico que endereça o nível indesejável do parâmetro hematológico. Por exemplo, se o paciente tiver uma pressão sanguínea elevada, então, um regime terapêutico envolvendo a administração de um polipeptídeo de GDF Trap e um agente de redução de pressão sanguínea podem ser designados. Para um paciente tendo armazenamentos de ferro menores que o desejado, um regime terapêutico de um polipeptídeo de GDF Trap e suplementação de ferro pode ser desenvolvido.

[0183]Em uma modalidade, o(s) parâmetro(s) de linha de base para um ou mais parâmetros hematológicos pode(m) ser estabelecido(s) para um paciente que seja um candidato a ser tratado com um polipeptídeo de GDF Trap e um regime de dosagem apropriado estabelecido para tal paciente com base no(s) valor(es) de linha de base. Alternativamente, os parâmetros de linha de base estabelecidos com base no histórico médico de um paciente poderiam ser usados para informar um regime de dosagem apropriado de polipeptídeo de GDF Trap para um paciente. Por exemplo, se um paciente saudável tiver uma leitura de pressão sanguínea de linha de base estabelecida que esteja acima da faixa normal definida, pode não ser ne-

cessário colocar a pressão sanguínea do paciente na faixa que seja considerada normal para a população em geral antes do tratamento com polipeptídeo de GDF Trap. Os valores de linha de base de um paciente para um ou mais parâmetros hematológicos antes do tratamento com um polipeptídeo de GDF Trap também podem ser usados como valores comparativos relevantes para monitorar quaisquer alterações aos parâmetros hematológicos durante o tratamento com o polipeptídeo de GDF Trap.

[0184]Em determinadas modalidades, um ou mais parâmetros hematológicos são medidos em pacientes que estejam sendo tratados com um polipeptídeo de GDF Trap. Os parâmetros hematológicos podem ser usados para monitorar o paciente durante o tratamento e permitir um ajuste ou um encerramento da dosagem com o polipeptídeo de GDF Trap ou uma dosagem adicional com outro agente terapêutico. Por exemplo, se a administração de um polipeptídeo de GDF Trap resultar em um aumento na pressão sanguínea, nível de hemácias, ou nível de hemoglobinas, ou uma redução nos armazenamentos de ferro, então, a dose do polipeptídeo de GDF Trap pode ser reduzida em quantidade e frequência a fim de reduzir os efeitos do polipeptídeo de GDF Trap em um ou mais parâmetros hematológicos. Se a administração ou um polipeptídeo de GDF Trap resultar em uma alteração em um ou mais parâmetros hematológicos que seja adversa ao paciente, então, a dosagem do polipeptídeo de GDF Trap pode ser encerrada seja temporariamente, até que os parâmetros hematológicos retornem a um nível aceitável, ou permanentemente. De modo similar, se um ou mais parâmetros hematológicos não foram colocados dentro de uma faixa aceitável após reduzir a dose ou a frequência de administração do polipeptídeo de GDF Trap, então, a dosagem pode ser encerrada. Alternativamente, ou além de reduzir ou encerrar a dosagem com o polipeptídeo de GDF Trap, o paciente pode ser dosado com um agente terapêutico adicional que endereça o nível indesejável nos parâmetros hematológicos, como, por exemplo, um agente de redução de

pressão sanguínea ou um suplemento de ferro. Por exemplo, se um paciente sendo tratado com um polipeptídeo de GDF Trap tiver uma pressão sanguínea elevada, então, a dosagem com o polipeptídeo de GDF Trap pode continuar no mesmo nível e um agente de redução de pressão sanguínea é adicionado ao regime de tratamento, a dosagem com polipeptídeo de GDF Trap pode ser reduzida (por exemplo, em quantidade e/ou frequência) e um agente de redução de pressão sanguínea é adicionado ao regime de tratamento, ou a dosagem com o polipeptídeo de GDF Trap pode ser encerrada e o paciente pode ser tratado com um agente de redução de pressão sanguínea.

#### Composições farmacêuticas

[0185]Em determinadas modalidades, os compostos (por exemplo, polipeptídeos de GDF Trap) da presente invenção são formulados com um carreador farmaceuticamente aceitável. Por exemplo, um polipeptídeo de GDF Trap pode ser administrado sozinho ou como um componente de uma formulação farmacêutica (composição terapêutica). Os compostos em questão podem ser formulados para administração em uma forma conveniente de uso em seres humanos ou na medicina veterinária.

[0186]Em determinadas modalidades, o método terapêutico da invenção inclui administrar a composição sistematicamente, ou localmente como um implante ou dispositivo. Quando administrada, a composição terapêutica para uso nesta invenção se encontra, naturalmente, sob uma forma fisiologicamente aceitável isenta de pirogênio. Os agentes terapeuticamente úteis além dos polipeptídeos de GDF Trap que também podem ser opcionalmente incluídos na composição conforme descrito anteriormente podem ser administrados simultânea ou sequencialmente aos compostos em questão (por exemplo, polipeptídeos de GDF Trap) nos métodos da invenção.

[0187]Tipicamente, os compostos serão administrados parenteralmente. As

composições farmacêuticas adequadas para administração parenteral podem compreender um ou mais polipeptídeos de GDF Trap em combinação com uma ou mais soluções, dispersões, suspensões ou emulsões aquosas ou não-aquosas isotônicas estéreis farmaceuticamente aceitáveis, ou pós estéreis que podem ser reconstituídos em soluções ou dispersões injetáveis estéreis logo antes do uso, que podem conter antioxidantes, tampões, bacteriostatos, solutos que fornecem a formulação isotônica com o sangue do receptor destinado ou agentes de suspensão ou agentes espessantes. Exemplos de carreadores aquosos e não-aquosos adequados que podem ser empregados nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, polióis (como glicerol, propileno glicol, polietileno glicol, e similares), e misturas adequadas destes, óleos vegetais, como azeite de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis, como oleato de etila. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de materiais de revestimento, como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersões, e pelo uso de tensoativos.

[0188]Ademais, a composição pode ser encapsulada ou injetada em uma forma para distribuição a um sítio tecidual alvo (por exemplo, medula óssea). Em determinadas modalidades, as composições da presente invenção podem incluir uma matriz capaz de distribuir um ou mais compostos terapêuticos (por exemplo, polipeptídeos de GDF Trap) a um sítio tecidual alvo (por exemplo, medula óssea), proporcionando uma estrutura para o tecido em desenvolvimento e otimamente capaz de ser reabsorvido no corpo. Por exemplo, a matriz pode proporcionar uma liberação lenta dos polipeptídeos de GDF Trap. Essas matrizes podem ser formadas por materiais presentemente em uso para outras aplicações médicas implantadas.

[0189]A escolha do material de matriz se baseia na biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades mecânicas, aparência cosmética e propriedades de interface. A aplicação particular das composições em questão definirá a formulação apropriada. As matrizes potenciais para as composições podem ser biodegradáveis

e sulfato de cálcio quimicamente definido, fosfato de tricálcio, hidroxiapatita, ácido polilático e polianidridos. Outros materiais potenciais são biodegradáveis e biologicamente bem definidos, como colágeno ósseo ou dérmico. Outras matrizes são compostas por proteínas puras ou componentes de matriz extracelular. Outras matrizes potenciais são não-biodegradáveis e quimicamente definidas, como hidroxiapatita sinterizada, biovidro, aluminatos, ou outras cerâmicas. As matrizes podem ser compostas por combinações de qualquer um dos tipos de material supramencionados, como ácido polilático e hidroxiapatita ou colágeno e fosfato de tricálcio. As bio-cerâmicas podem ser alteradas em composição, como em fosfato-aluminato de cálcio e processando para alterar o tamanho de poro, tamanho de partícula, formato de partícula, e biodegradabilidade.

[0190]Em determinadas modalidades, os métodos da invenção podem ser administradas por via oral, por exemplo, sob a forma de cápsulas, drágeas, pílulas, tabletes, comprimidos (usando uma base flavorizadas, geralmente sacarose e acácia ou tragacanto), pós, grânulos, ou como uma solução ou uma suspensão em um líquido aquoso ou não-aquoso, ou como uma emulsão líquida óleo-em-água ou águas-em-óleo, ou como um elixir ou xarope, ou como pastilhas (usando uma base inerte, como gelatina e glicerina, ou sacarose e acácia) e/ou como enxaguantes bucais, e similares, cada um contendo uma quantidade predeterminada de um agente como ingrediente ativo. Um agente também pode ser administrado como um bolus, electuário ou pasta.

[0191]Em formas de dosagem sólidas para administração oral (cápsulas, tabletes, pílulas, drágeas, pós, grânulos, e similares), um ou mais compostos terapêuticos da presente invenção podem ser misturados com um ou mais carreadores farmaceuticamente aceitáveis, como citrato de sódio ou fosfato de dicálcio, e/ou qualquer um dos seguintes: (1) cargas ou extensores, como amidos, lactose, sacarose, glicose, manitol, e/ou ácido silícico; (2) aglutinantes, como, por exemplo, carboxime-

tilcelulose, alginatos, gelatina, polivinil pirrolidona, sacarose, e/ou acácia; (3) umectantes, como glicerol; (4) agentes de desintegração, como ágar-ágar, carbonato de cálcio, amido de batata ou de tapioca, ácido algínico, determinados silicatos, e carbonato de sódio; (5) agentes retardadores de solução, como parafina; (6) aceleradores de absorção, como compostos de amônio quaternário; (7) agentes umectantes, como, por exemplo, álcool cetílico e monoestearato de glicerol; (8) absorventes, como caulim e argila de bentonita; (9) lubrificantes, como talco, estearato de cálcio, estearato de magnésio, polietileno glicóis sólidos, lauril sulfato de sódio, e misturas desses; e (10) agentes de coloração. No caso de cápsulas, tabletes e pílulas, as composições farmacêuticas também podem compreender agentes de tamponamento. As composições sólidas de um tipo similar também podem ser empregadas como cargas em cápsulas gelatinosas macias e duras usando tais excipientes como lactose ou açúcares do leite, bem como polietileno glicóis com alto peso molecular, e similares.

[0192]As formas de dosagem líquidas para administração oral incluem emulsões, microemulsões, soluções, suspensões, xaropes, e elixires farmaceuticamente aceitáveis. Além do ingrediente ativo, as formas de dosagem líquidas podem conter diluentes inertes comumente usados na técnica, como água ou outros solventes, agentes de solubilização e emulsificantes, como álcool etílico, álcool isopropílico, carbonato de etila, acetato de etila, álcool benzílico, benzoato de benzila, propileno glicol, 1,3-butíleno glicol, óleos (em particular, óleos de semente de algodão, amendoim, milho, gérmen, oliva, castor, e gergelim), glicerol, álcool tetraidrofurílico, polietileno glicóis e ésteres de ácido graxo de sorbitano, e misturas destes. Além dos diluentes inertes, as composições orais também podem incluir adjuvantes como agentes umectantes, agentes de emulsificação e agentes de suspensão, agentes adoçantes, agentes flavorizantes, agentes de coloração, agentes de perfume, e agentes preservativos.

[0193]As suspensões, além dos compostos ativos, podem conter agentes de suspensão, como álcoois de isoestearil etoxilados, polioxietileno sorbitol, e ésteres de sorbitano, celulose microcristalina, metaidróxido de alumínio, bentonita, ágar-ágár e tragacanto, e misturas destes.

[0194]As composições da invenção também podem conter adjuvantes, como preservativos, agentes umectantes, agentes de emulsificação e agentes de dispersão. A prevenção da ação de micro-organismos pode ser garantida pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico, e similares. Também pode ser desejável incluir agentes isotônicos, como açúcares, cloreto de sódio, e similares, nas composições. Além disso, a absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser produzida pela inclusão de agentes que retardem a absorção, como monoestearato de alumínio e gelatina.

[0195]Compreende-se que o regime de dosagem será determinado pelo médico considerando vários fatores que modificam a ação dos compostos em questão da invenção (por exemplo, polipeptídeos de GDF Trap). Os vários fatores incluem, mas não se limitam a, contagem de hemácias do paciente, nível de hemoglobina ou outras avaliações diagnósticas, a contagem de hemácias alvo desejada, a idade, sexo, e dieta do paciente, a gravidade de qualquer doença que possa estar contribuindo para um nível carente de hemácias, o 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 de níveis de hemácias e hemoglobinas, bem como avaliações de níveis de reticulócitos e outros indicadores do processo hematopoiético.

[0196]Em determinadas modalidades, a presente invenção também proporciona uma terapia genética para a produção *in vivo* de polipeptídeos de GDF Trap. Essa terapia alcançaria seu efeito terapêutico pela introdução das sequências de

polinucleotídeo de GDF Trap em células ou tecidos tendo os distúrbios listados anteriormente. A distribuição de sequências de polinucleotídeo de GDF Trap pode ser alcançada usando um vetor de expressão recombinante, como um vírus quimérico ou um sistema de dispersão coloidal. Preferencial para distribuição terapêutica de sequências de polinucleotídeo de GDF Trap é o uso de lipossomos direcionados.

[0197] Vários vetores virais que podem ser utilizados para terapia genética conforme ensinado no presente documento incluem adenovírus, vírus da herpes, vacinia, ou um vírus RNA, como retrovírus. O vetor retroviral pode ser um derivado de um retrovírus de murino ou aves. Exemplos de vetores retrovirais nos quais um gene estranho único pode ser inserido incluem, mas não se limitam a: vírus da leucemia de murinos Moloney (MoMuLV), vírus do sarcoma de murinos Harvey (Ha-MuSV), vírus tumorais mamários de murinos (MuMTV), e Vírus do Sarcoma de Rous (RSV). Uma série de vetores retrovirais adicionais pode incorporar múltiplos genes. Todos esses vetores podem transferir ou incorporar um gene para um marcador selecionável de modo que as células transduzidas possam ser identificadas e geradas. Os vetores retrovirais podem se tornar alvo-específicos fixando-se, por exemplo, a um açúcar, um glicolipídeo, ou uma proteína. O direcionamento preferencial é realizado utilizando-se um anticorpo. Os indivíduos versados na técnica reconhecerão que sequência de polinucleotídeo específicas podem ser inseridas no genoma retroviral ou fixadas a um envelope viral para permitir a distribuição alvo-específica do vetor retroviral contendo o polinucleotídeo de GDF Trap.

[0198] Alternativamente, as células de cultura tecidual podem ser diretamente transfectadas com plasmídeos que codificam os genes estruturais retrovirais gag, pol e env, por transfecção de fosfato de cálcio convencional. Essas células são, então, transfectadas com o plasmídeo de vetor contendo os genes de interesse. As células resultantes liberam o vetor retroviral no meio de cultura.

[0199] Outro sistema de distribuição direcionada para polinucleotídeos de

GDF Trap é um sistema de dispersão coloidal. Os sistemas de dispersão coloidal incluem complexos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, contas, e sistemas à base de lipídeo incluindo emulsões óleo-em-água, micelas, micelas misturadas, e lipossomos. O sistema coloidal preferencial desta invenção é um lipossomo. Os lipossomos são vesículas membranares artificiais que são úteis como veículos de distribuição *in vitro* e *in vivo*. RNA, DNA e vírions intactos podem ser encapsulados no interior aquoso e ser distribuídos às células em uma forma biologicamente ativa (vide, por exemplo, Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Os métodos para transferência de genes eficientes usando um veículo de lipossomo, são conhecidos na técnica, vide, por exemplo, Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988. A composição do lipossomo é geralmente uma combinação de fosfolipídeos, geralmente em combinação com esteróides, especialmente colesterol. Outros fosfolipídeos ou outros lipídeos também podem ser usados. As características físicas de lipossomos dependem do pH, da resistência iônica, e da presença de cátions divalentes.

[0200] Exemplos de lipídeos úteis na produção de lipossomos incluem compostos de fosfatidil, como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolipídeos, cerebrosídeos, e gangliosídeos. Fosfolipídeos ilustrativos incluem fosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, e distearoilfosfatidilcolina do ovo. O direcionamento de lipossomos também é possível com base, por exemplo, na especificidade de órgãos, especificidade de células, e especificidade de organelas e é conhecido na técnica.

#### EXEMPLIFICAÇÃO

[0201] Visto que a presente invenção foi genericamente descrita, a mesma será mais prontamente compreendida com referência aos exemplos a seguir, que estão incluídos meramente para propósitos de ilustração de determinadas modalidades e das modalidades da presente invenção, e não são destinados a limitarem a

invenção.

Exemplo 1. Geração de um GDF Trap.

[0202]Os requerentes construíram um GDF Trap da seguinte forma. Um polipeptídeo tendo um domínio extracelular modificado de ActRIIB com uma ligação de activina A consideravelmente reduzida em relação a GDF11 e/ou miostatina (como consequência de uma substituição de leucina-por-aspartato na posição 79 em SEQ ID NO: 1) foi fundido a um domínio Fc humano ou de camundongo com um ligador mínimo (três aminoácidos de glicina). As construções são referidas como ActRIIB (L79D 20-134)-hFc e ActRIIB (L79D 20-134)-mFc, respectivamente. Formas alternativas com um glutamato ao invés de um aspartato na posição 79 funcionaram de modo similar (L79E). Formas alternativas com uma alanina ao invés de uma valina na posição 226 em relação a SEQ ID NO: 7, abaixo também foram geradas e funcionaram de modo equivalente em todos os aspectos testados. O aspartato na posição 79 (em relação a SEQ ID NO: 1, ou na posição 60 em relação a SEQ ID NO: 7) é realçado em cinza abaixo. A valina na posição 226 em relação a SEQ ID NO: 7 também é realçada em cinza abaixo.

[0203]O GDF Trap ActRIIB (L79D 20-134)-hFc é mostrado abaixo conforme purificado a partir de linhagens celulares de CHO (SEQ ID NO: 7).

[0204]GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWR  
 NSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA  
GGPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT  
CVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
GKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAWESENQQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV  
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0205]A porção derivada de ActRIIB do GDF Trap tem uma sequência de aminoácido apresentada abaixo (SEQ ID NO: 32), e tal porção poderia ser usada

como um monômero ou como uma proteína de fusão não-Fc como um monômero, dímero ou um complexo de ordem maior.

[0206]GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWR  
NSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA  
GGPEVTVYEPPPTAPT (SEQ ID NO: 32)

[0207]A proteína de GDF Trap foi expressa em linhagens celulares de CHO. Consideraram-se três sequências líder diferentes:

[0208]Melittina de mel de abelha (HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA  
(SEQ ID NO: 8)

[0209]Ativador do Plasminogênio Tecidual (TPA):  
MDAMKRG**LCCVLLCGAVFVSP** (SEQ ID NO: 9)

[0210]Nativa: MTAPWVALALLWGSLCAGS (SEQ ID NO: 10).

[0211]A forma selecionada emprega o TPA líder e tem a seguinte sequência de aminoácido não-processada:

[0212]MDAMKRG**LCCVLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELER**  
TNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATE  
ENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTVYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPEL  
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKT  
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREP  
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG  
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:  
11)

[0213]Este polipeptídeo é codificado pela seguinte sequência de ácido nucléico (SEQ ID NO:12):

[0214]A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT  
GTGTGGAGCA GTCTTCGTTT CGCCCCGGCGC CTCTGGCGT GGGGAGGCTG  
AGACACGGGA GTGCATCTAC TACAACGCCA ACTGGGAGCT GGAGCGCACC

AACCAGAGCG GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA AGCGGCTGCA  
 CTGCTACGCC TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA  
 AGGGCTGCTG GGACGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGCA GGAGTGTGTG  
 GCCACTGAGG AGAACCCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT  
 CTGCAACGAG CGCTTCACTC ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA  
 CGTACGAGCC ACCCCCAGACA GCCCCCACCG GTGGTGGAAC TCACACATGC  
 CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG TCTTCCTCTT  
 CCCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA  
 CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC  
 TGGTACGTGG ACGGCGTGG A GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA  
 GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCTGC  
 ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA  
 GCCCTCCCAG TCCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC  
 CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCTC ATCCCAGGGAG GAGATGACCA  
 AGAACCAAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC  
 ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACAA ACTACAAGAC  
 CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TATAGCAAGC  
 TCACCGTGG A CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC  
 GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT  
 GTCTCCGGGT AAATGA

[0215]A purificação poderia ser alcançada por uma série de etapas de cromatografia em coluna, incluindo, por exemplo, três ou mais dos seguintes, em qualquer ordem: cromatografia de proteína A, cromatografia de sefareose Q, cromatografia de fenil sefareose, cromatografia por exclusão de tamanho, e cromatografia por troca catiônica. A purificação poderia ser completa com filtração viral e troca de tampão. Em um exemplo de um esquema de purificação, o meio de cultura celular é passado por uma coluna de proteína A, lavado em 150 mM de Tris/NaCl (pH 8.0),

em seguida, lavado em 50 mM de Tris/NaCl (pH 8,0) e eluído com 0,1 M de glicina, pH 3,0. O eluado com pH baixo é mantido em temperatura ambiente durante 30 minutos como uma etapa de compensação viral. O eluado é, então, neutralizado e passado por uma coluna de troca iônica de sefareose Q e lavado em 50 mM de Tris com pH 8,0, 50 mM de NaCl, e eluado em 50 mM de Tris com pH 8,0, com uma concentração de NaCl entre 150 mM e 300 mM. O eluado é, então, transformado em 50 mM de Tris com pH 8,0, 1,1 M de sulfato de amônia e passado por uma coluna de fenil sefareose, lavado, e eluído em 50 mM de Tris com pH 8,0 com sulfato de amônia entre 150 e 300 mM. O eluado é dialisado e filtrado para uso.

[0216]GDF Traps adicionais (proteínas de fusão ActRIIB-Fc modificadas a fim de reduzir a razão de ligação de activina A em relação à miostatina ou GDF11) são descritos nos documentos PCT/US2008/001506 e WO 2006/012627, aqui incorporados a título de referência.

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

[0217]Um Ensaio de Gene Repórter A-204 foi usado para avaliar os efeitos de proteínas ActRIIB-Fc e GDF Traps na sinalização por GDF-11 e Activina A. Linhagem celular: Rabdomiossarcoma Humano (derivada dos músculos). Vetor repórter: pGL3(CAGA)12 (Descrito em Dennler et al, 1998, EMBO 17: 3091-3100). O motivo CAGA12 está presente em genes responsivos TGF-Beta (gene PAI-1), logo, este vetor serve para uso geral para fatores sinalizando através de Smad2 e 3.

[0218]Dia 1: Dividir as células A-204 em uma placa com 48 poços.

[0219]Dia 2: Células A-204 transfectadas com 10 ug de pGL3(CAGA)12 ou pGL3(CAGA)12(10 ug)+ pRLCMV (1 ug) e Fugeno.

[0220]Dia 3: Adicionar fatores (diluídos em meio + 0,1 % BSA). Os inibidores precisam ser pré-incubados com Fatores durante 1 hora antes de adicionar às células. 6 horas depois, as células foram enxaguadas com PBS, e lisadas.

[0221]Este é seguido por um ensaio de Luciferase. Na ausência de quais-

quer inibidores, a Activina A mostrou um estímulo 10 vezes maior de expressão de gene repórter e um ED50 ~ 2 ng/ml. GDF-11: estímulo 16 vezes maior, ED50: ~ 1,5 ng/ml.

[0222]ActRIIB (20-134) é um inibidor potente da atividade de activina, GDF-8 e GDF-11 neste ensaio. As variantes também foram testadas neste ensaio.

Exemplo 3. Inibição de GDF-11 por truncamentos N-terminais e C-terminais

[0223]As variantes de ActRIIB (20-134)-hFc com truncamentos na terminação N e/ou na terminação C foram geradas e testadas para determinação da atividade como inibidores de GDF-11 e activina. As atividades são mostradas abaixo (conforme medido em meios condicionados):

Truncamentos ActRIIB-hFc C-terminais:

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

[0224]Conforme se pode observar, os truncamentos de três (terminando em ...PPT), seis (terminando em ...YEP) ou mais aminoácidos na terminação C causa uma redução de três vezes ou maior na atividade da molécula. O truncamento dos 15 aminoácidos finais da porção ActRIIB causa uma perda maior de atividade (vide WO2006/012627).

[0225]Os truncamentos amino terminais foram feitos nos fundamentos de uma proteína ActRIIB (20-131)-hFc. As atividades são mostradas abaixo (conforme medido em meios condicionados):

Truncamentos ActRIIB-hFc N-terminais:

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

[0226] De modo correspondente, truncamentos de dois, três ou quatro aminoácidos a partir da terminação N levam à produção de uma proteína mais ativa que as versões com um domínio extracelular de comprimento completo. Experimentos adicionais mostram que um truncamento de cinco aminoácidos, ActRIIB (25-131)-hFc tem uma atividade equivalente à forma não-truncada, e exclusões adicionais na terminação N continuam a degradar a atividade da proteína. Portanto, as construções ótimas terão uma terminação C terminando entre o aminoácido 133-134 de SEQ ID NO: 1 e uma terminação N começando nos aminoácidos 22-24 de SEQ ID NO: 1. Uma terminação N correspondente aos aminoácidos 21 ou 25 fornecerá uma atividade que seja similar à construção ActRIIB (20-134)-hFc. Esses truncamentos também podem ser usados no contexto de GDF Traps, tal como uma variante L79D ou L79E.

Exemplo 4. Variantes de ActRIIB-Fc, atividade baseada em células.

[0227] A atividade de proteínas ActRIIB-Fc e GDF Traps foi testada em um ensaio baseado em células, conforme descrito anteriormente. Os resultados estão

resumidos na tabela abaixo. Algumas variantes foram testadas em construções de truncamento C-terminal diferentes. Conforme discutido anteriormente, os truncamentos de cinco ou quinze aminoácidos causaram uma redução na atividade. Os GDF Traps (variantes L79D e L79E) mostraram uma perda substancial de ligação de activina enquanto retiveram uma inibição quase tipo selvagem de GDF-11.

Ligaçāo de ActRIIB-Fc solúvel a GDF11 e activina A:

Variações ActRIIB-Fc	Porção de ActRIIB (cor- responde aos aminoá- cidos de SEQ ID NO:1)	Atividade de inibi- ção de GDF11	Atividade de inibi- ção de activina
R64	20-134	+++ (aprox. $10^{-8}$ M $K_I$ )	+++ (aprox. $10^{-8}$ M $K_I$ )
A64	20-134	+ (aprox. $10^{-6}$ M $K_I$ )	+ (aprox. $10^{-6}$ M $K_I$ )
R64	20-129	+++	+++
R64 K74A	20-134	++++	++++
R64 A24N	20-134	+++	+++
R64 A24N	20-119	++	++
R64 A24N K74A	20-119	+	+
R64 L79P	20-134	+	+
R64 L79P K74A	20-134	+	+
R64 L79D	20-134	+++	+
R64 L79E	20-134	+++	+
R64K	20-134	+++	+++
R64K	20-129	+++	+++

R64	P129S	20-134	+++	+++
P130A				
R64N		20-134	+	+

[0228]+ Atividade fraca (aproximadamente  $1 \times 10^{-6}$  K<sub>I</sub>)

[0229]++ Atividade moderada (aproximadamente  $1 \times 10^{-7}$  K<sub>I</sub>)

[0230]+++ Atividade boa (tipo selvagem) (aproximadamente  $1 \times 10^{-8}$  K<sub>I</sub>)

[0231]++++ Melhor que a atividade tipo selvagem

[0232]Avaliaram-se diversas variantes para determinação da meia-vida sérica em ratos. ActRIIB (20-134)-Fc tem uma meia-vida sérica de aproximadamente 70 horas. ActRIIB (A24N 20-134)-Fc tem uma meia-vida sérica de aproximadamente 100-150 horas. A variante A24N tem uma atividade no ensaio baseado em células (acima) e ensaios *in vivo* (abaixo) que sejam equivalentes à molécula tipo selvagem. Acoplado à meia-vida mais longa, isto significa que ao longo do tempo uma variante A24N fornecerá um efeito maior por unidade de proteína em relação à molécula tipo selvagem. A variante A24N, e quaisquer outras variantes testadas acima, podem ser combinadas com moléculas GDF Trap, como variantes L79D ou L79E.

#### Exemplo 5. Ligação de GDF-11 e activina A.

[0233]A ligação de determinadas proteínas ActRIIB-Fc e GDF Traps a ligantes foi testada em um ensaio BiaCore™.

[0234]As variantes ActRIIB-Fc ou proteína tipo selvagem foram capturadas no sistema usando um anticorpo anti-hFc. Os ligantes foram injetados e fluidos pelas proteínas receptoras capturadas. Os resultados estão resumidos nas tabelas, abaixo.

#### Variantes IIB de especificidade de ligação ao ligante.

	GDF11		
Proteína	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)

ActRIIB (20-134)-hFc	1,34e-6	1,13e-4	8,42e-11
ActRIIB (A24N 20-134)-hFc	1,21e-6	6,35e-5	5,19e-11
ActRIIB (L79D 20-134)-hFc	6,7e-5	4,39e-4	6,55e-10
ActRIIB (L79E 20-134)-hFc	3,8e-5	2,74e-4	7,16e-10
ActRIIB (R64K 20-134)-hFc	6,77e-5	2,41e-5	3,56e-11
	GDF8		
Proteína	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB (20-134)-hFc	3,69e-5	3,45e-5	9,35e-11
ActRIIB (A24N 20-134)-hFc			
ActRIIB (L79D 20-134)-hFc	3,85e-5	8,3e-4	2,15e-9
ActRIIB (L79E 20-134)-hFc	3,74e-5	9e-4	2,41e-9
ActRIIB (R64K 20-134)-hFc	2,25e-5	4,71e-5	2,1e-10
ActRIIB (R64K 20-129)-hFc	9,74e-4	2,09e-4	2,15e-9
ActRIIB (P129S, P130R 20-134)-hFc	1,08e-5	1,8e-4	1,67e-9
ActRIIB (K74A 20-134)-hFc	2,8e-5	2,03e-5	7,18e-11
	ActivinA		
Proteína	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB (20-134)-hFc	5,94e6	1,59e-4	2,68e-11
ActRIIB (A24N 20-134)-hFc	3,34e6	3,46e-4	1,04e-10

ActRIIB (L79D 20-134)-hFc			Ligaçao baixa
ActRIIB (L79E 20-134)-hFc			Ligaçao baixa
ActRIIB (R64K 20-134)-hFc	6,82e6	3,25e-4	4,76e-11
ActRIIB (R64K 20-129)-hFc	7,46e6	6,28e-4	8,41e-11
ActRIIB (P129S, P130R 20-134)-hFc	5,02e6	4,17e-4	8,31e-11

[0235]Esses dados confirmam os dados do ensaio baseado em células, demonstrando que a variante A24N retém uma atividade de ligação ao ligante que é similar àquela da molécula ActRIIB (20-134)-hFc, e que a molécula L79D ou L79E retém miostatina e ligação de GDF11, mas mostra uma ligação consideravelmente reduzida (não-quantificável) à Activina A.

[0236]Outras variantes foram geradas e testadas, conforme reportado no documento WO2006/012627 (aqui incorporado em sua totalidade a título de referência) vide, por exemplo, pp. 59-60, usando ligantes acoplados ao dispositivo e fluindo um receptor pelos ligantes acoplados. De modo notável, K74Y, K74F, K74I (e, presumidamente, outras substituições hidrofóbicas em K74, como K74L), e D80I, causam uma redução na razão entre a ligação de Activina A e a ligação de GDF11, em relação à molécula K74 tipo selvagem. Uma tabela de dados em relação a essas variantes é reproduzida abaixo:

Ligaçao de variantes ActRIIB-Fc solúveis à GDF11 e activina A (ensaio Bias Core)

ActRIIB	ActA	GDF11
WT (64A)	KD=1,8e-7M (+)	KD= 2,6e-7M (+)
WT (64R)	na	KD= 8,6e-8M

ActRIIB	ActA	GDF11
		(+++)
+15 cauda	KD ~2,6 e-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	*	*

ActRIIB	ActA	GDF11
D80N	*	*
D80I	*	--
F82A	++	-

[0237] Nenhuma ligação observada

[0238]-- Ligação WT < 1/5

[0239]- Ligação WT ~ 1/2

[0240]+ WT

[0241]++ Ligação aumentada < 2x

[0242]+++ Ligação aumentada ~5x

[0243]++++ Ligação aumentada ~10x

[0244]+++++ Ligação aumentada ~40x

#### Exemplo 6. ActRIIB-hFc estimula eritropoiese em primatas não-humanos

[0245] ActRIIB (20-134)-hFc (IgG1) foi administrado uma vez por semana durante 1 mês em macacos cinomolgos machos e fêmeas por injeção subcutânea. Quarenta e oito macacos cinomolgos (24/sexo) foram atribuídos a um dos quatro grupos de tratamento (6 animais/sexo/grupo) e foram administrados com injeções subcutâneas de veículo ou ActRIIB-hFc em 3, 10, ou 30 mg/kg uma vez por semana durante 4 semanas (total de 5 doses). Os parâmetros avaliados incluíam a patologia clínica geral (hematologia, química clínica, coagulação, e urinálise). ActRIIB-hFc causou valores de reticulócito com média absoluta elevada estatisticamente significativos no dia 15 em animais tratados. No dia 36, ActRIIB-hFc causou várias alterações hematológicas, incluindo valores de largura de distribuição de reticulócitos e hemácias com média absoluta elevada e uma concentração de hemoglobina cor-puscular média inferior. Todos os grupos tratados e ambos os sexos foram afetados.

Esses efeitos são consistentes a um efeito positivo de ActRIIB-hFc na liberação de reticulócitos imaturos a partir da medula óssea. Este efeito foi revertido após o fármaco ter sido removido dos animais tratados (no dia de estudo 56). De modo correspondente, conclui-se que ActRIIB-hFc estimula a eritropoiese.

Exemplo 7. ActRIIB-mFc promove aspectos de eritropoiese em camundongos pelo estímulo de atividades eritropoiéticas esplênicas

[0246]Neste estudo, os efeitos da administração *in vivo* de ActRIIB (20-134)-mFc sobre a frequência de progenitores hematopoiéticos na medula óssea e no baço foram analisados. Um grupo de camundongos C57BL/6 foi injetado com PBS como um controle e um segundo grupo de camundongos foi administrado com duas doses de ActRIIB-mFc em 10 mg/kg e ambos os grupos foram sacrificados após 8 dias. Utilizou-se sangue periférico para realizar contagens sanguíneas completas e utilizaram-se os fêmures e os baços para realizar ensaios clonogênicos *in vitro* para avaliar o teor de células progenitoras de linfóide, eritróide e mielóide em cada órgão. No curto período de tempo deste estudo, nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis de hemácias, hemoglobinas ou leucócitos nos camundongos tratados. Nos fêmures, não houve diferença nos números de células nucleadas nem no teor de progenitor entre os grupos de controle e tratados. Nos baços, o grupo tratado com o composto experimentou um aumento estatisticamente significativo no número de colônias progenitoras de eritróide maduro (CFU-E) por placa, frequência e número total de progenitor por baço. Além disso, observou-se um aumento no número de mielóide (CFU-GM), eritróide imaturo (BFU-E) e progenitor total por baço.

Animais:

[0247]Dezesseis camundongos C57BL/6 fêmea com 6 a 8 semanas de idade foram usados no estudo. Oito camundongos foram injetados subcutaneamente com o composto de teste ActRIIB-mFc nos dias 1 e 3 em uma dose de 10 mg/kg e oito camundongos foram injetados subcutaneamente com controle de veículo, solu-

ção salina tamponada de fosfato (PBS), em um volume de 100 µL por camundongo. Todos os camundongos foram sacrificados 8 dias após a primeira injeção de acordo com as Diretrizes para Cuidados de Animais relevantes. Coletaram-se amostras de sangue periférico (PB) a partir de animais individuais por punção cardíaca e usadas para contagens de sangue completo e diferencial (CBC/Diff). Os fêmures e os baços foram removidos de cada camundongo.

Testes realizados:

Contagens CBC/Diff

[0248]Coletou-se PB de cada camundongo através de punção cardíaca e colocado em tubos microtainer apropriados. As amostras foram enviadas a CLV para análise em um contador CellDyn 3500.

Ensaio clonogênico

[0249]Os progenitores clonogênicos das linhagens de mielóide, eritróide e linfóide foram avaliados usando os sistemas à base de metilcelulose *in vitro* descritos anteriormente.

[0250]Progenitores de eritróide maduros:

[0251]Os progenitores clonogênicos das linhagens de eritróide maduros (CFU-E) foram culturados em MethoCult™ 3334, um meio à base de metilcelulose contendo Eritropoietina humana recombinante (rh) (3 U/mL).

[0252]Progenitores de linfóide:

[0253]Os progenitores clonogênicos da linhagem de linfóide (CFU-pre-B) foram culturados em MethoCult® 3630, um meio à base de metilcelulose contendo Interleucina rh 7 (10 ng/mL).

[0254]Progenitores de mielóide e eritróide maduro:

[0255]Os progenitores clonogênicos das linhagens granulócito-momnócito (CFU-GM), eritróide (BFU-E) e multipotencial (CFU-GEMM) foram culturados em MethoCult™ 3434, um meio à base de metilcelulose contendo Fator de Célula-

Tronco de murino recombinante (rm) (50 ng/mL), Interleucina rh 6 (10 ng/mL), Interleucina rm 3 (10 ng/mL) e Eritropoietina rh (3 U/mL).

[0256]Métodos:

[0257]Os fêmures e os baços dos camundongos foram processados por protocolos padrão. Em resumo, a medula óssea foi obtida limpando-se a cavidade femoral com um Meio de Dulbecco Modificado por Iscove contendo soro bovino fetal a 2% (IMDM com FBS a 2%) usando uma agulha calibre 21 e uma seringa de 1 cc. As células do baço foram obtidas comprimindo-se os baços através de um filtro de 70 µM e enxaguando o filtro com IMDM com FBS a 2%. As contagens de células nucleadas em ácido acético glacial a 3% foram, então, realizadas nas suspensões de células únicas usando uma câmara de contagem de Neubauer de modo que as células totais por órgão possam ser calculadas. Para remover as hemácias contaminantes, as células do baço totais foram, então, diluídas com 3 vezes o volume de tampão de lise de cloreto de amônia e incubadas em gelo por 10 minutos. As células foram, então, lavadas e ressuspensas em IMDM com FBS a 2% e uma segunda contagem de células foi realizada para determinar a concentração celular de células após a lise.

[0258]Produziram-se e adicionaram-se estoques de células a cada formulação de meio à base de metilcelulose para obter as concentrações de revestimento ótimas para cada tecido em cada formulação de meio. As células da medula óssea foram revestidas em  $1 \times 10^5$  células por placa em MethoCult™ 3334 para avaliar os progenitores de eritróide maduro,  $2 \times 10^5$  células por placa em MethoCult™ 3630 para avaliar os progenitores de linfóide e  $3 \times 10^4$  células por placa em MethoCult™ 3434 para avaliar os progenitores de eritróide imaturo e mielóide. As células do baço foram revestidas em  $4 \times 10^5$  células por placa em MethoCult™ 3334 para avaliar os progenitores de eritróide maduro,  $4 \times 10^5$  células por placa em MethoCult™ 3630 para avaliar os progenitores de linfóide e  $2 \times 10^5$  células por placa em MethoCult™ 3434 para avaliar os progenitores de eritróide imaturo e mielóide. As culturas reves-

tidas em três placas foram incubadas a 37°C, CO<sub>2</sub> a 5% até que a enumeração e avaliação de colônia fossem realizadas por uma equipe treinada. Os progenitores de eritróide maduro foram culturados durante 2 dias, os progenitores de linfóide foram culturados durante 7 dias e os progenitores de eritróide maduro e mielóide foram culturados durante 12 dias.

[0259]Análise:

[0260]A média +/- 1 desvio padrão foi calculada para as culturas triplicadas dos ensaios clonogênicos e para os grupos de controle e de tratamento para todos os conjuntos de dados.

[0261]A frequência de células formadoras de colônia (CFC) em cada tecido foi calculada da seguinte forma:

[0262]Células revestidas por placa

[0263]CFC médio marcado por placa

[0264]CFC médio por fêmur ou baço foi calculado da seguinte forma:

[0265]CFC total marcado x contagem de célula nucleada por fêmur ou baço (seguindo a lise RBC)

[0266]Número de células nucleadas culturadas

[0267]Realizaram-se testes-t padrão para avaliar se houve diferenças no número médio de células progenitores hematopoiéticos entre os camundongos de controle PBS e os camundongos tratados com composto. Devido à subjetividade potencial da enumeração de colônia, um p valor menor que 0,01 é considerado significante. Os valores médios (+/- DP) para cada grupo são mostrados nas tabelas abaixo.

Tabela: Parâmetros hematológicos

Grupo de tratamento	Leucócitos ( $\times 10^9/L$ )	Hemárias ( $\times 10^9/L$ )	Hemoglobina (g/L)	Hematócrito (L/L)
PBS	9,53 +/- 1,44	10,5 +/- 1,1	160,9 +/- 13,3	0,552 +/- 0,057

(n=8)				
ActRIIB-mFc (n=8)	9,77 +/- 1,19	10,8 +/- 0,3	162,1 +/- 4,1	0,567 +/- 0,019

Tabela: CFC do Fêmur e do Baço

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

análise preliminar indica p<0,05

[0268]O tratamento de camundongos com ActRIIB (20-134)-mFc, no breve período de tempo deste estudo, não resultou em aumentos significativos no teor de hemácias ou hemoglobinas. No entanto, o efeito sobre o teor de células progenitoras foi notável. Nos fêmures não houve diferenças nos números de células nucleadas nem no teor de progenitores entre os grupos de controle e os grupos tratados. Nos baços, o grupo tratado com o composto experimentou um aumento estatisticamente significativo no número de células nucleadas antes de lise de hemácias no número de colônias de progenitor de eritróide maduro (CFU-E) por placa, na frequência e no número total de progenitores por baço. Além disso, observou-se um aumento no número de número de mielóides (CFU-GM), eritróides maduros (BFU-E) e progenitores totais por baço. De modo correspondente, espera-se que ao longo de um curso de tempo mais longo, o tratamento com ActRIIB (20-134)-mFc pode resultar em um teor elevado de hemácias e hemoglobinas.

Exemplo 8: Um GDF Trap aumenta os níveis de hemácias *in vivo*

[0269]Camundongos C57BL/6NTac machos com doze semanas de idade foram atribuídos a um dos dois grupos de tratamento (N=10). Os camundongos foram dosados com veículo ou com um polipeptídeo variante ActRIIB (“GDF Trap”) [ActRIIB (L79D 20-134)-hFc] por injeção subcutânea (SC) em 10 mg/kg duas vezes por semana durante 4 semanas. Ao término do estudo, coletou-se sangue completo por punção cardíaca em tubos contendo EDTA e analisado para determinação da distribuição celular usando um analisador de hematologia HM2 (Abaxis, Inc).

Designação dos grupos

Grupo	N	Camundongos	Injeção	Dose (mg/kg)	Rota	Frequência
1	10	C57BL/6	PBS	0	SC	Duas vezes por semana
2	10	C57BL/6	GDF Trap [ActRIIB (L79D 20-134)-hFc]	10	SC	Duas vezes por semana

[0270]O tratamento com GDF Trap não apresentou um efeito estatisticamente significativo sobre o número de leucócitos (WBC) comparados aos controles de veículo. Os números de hemácias (RBC) aumentaram no grupo tratado em relação aos controles (vide a tabela abaixo). Tanto o teor de hemoglobina (HGB) como o teor de hematócitos (HCT) aumentaram devido às hemácias adicionais. A largura média das hemácias (RDWc) foi maior nos animais tratados, indicando um aumento no pool de hemácias imaturas. Portanto, o tratamento com GDF Trap leva a aumentos nas hemácias, sem efeitos distinguíveis sobre as populações de leucócitos.

Resultados de hematologia

	RBC 10 <sup>12</sup> /L	HGB (g/dL)	HCT (%)	RDWc (%)

	RBC 10 <sup>12</sup> /L	HGB (g/dL)	HCT (%)	RDWc (%)
PBS	10,7 ± 0,1	14,8 ± 0,6	44,8 ± 0,4	17,0 ± 0,1
GDF Trap	12,4 ± 0,4**	17,0 ± 0,7*	48,8 ± 1,8*	18,4 ± 0,2**

\*=p<0,05, \*\*= p<0,01

Exemplo 9: Um GDF Trap é superior a ActRIIB-Fc para níveis de hemácias *in vivo* crescentes.

[0271]Camundongos C57BL/6NTac machos com dezenove semanas de idade foram aleatoriamente atribuídos a um dos três grupos. Os camundongos foram dosados com veículo (10 mM de Solução Salina Tamponada Tris, TBS), ActRIIB tipo selvagem (20-134)-mFc, ou GDF Trap ActRIIB (L79D 20-134)-hFc por injeção subcutânea duas vezes por semana durante três semanas. O sangue foi coletado por sangramento da bochecha em linha de base e após três semanas de dosagem e analisado para determinação da distribuição celular usando um analisador de hematologia (HM2, Abaxis, Inc.)

[0272]O tratamento com ActRIIB-Fc ou GDF Trap não apresentou um efeito significativo nos números de leucócitos (WBC) comparados aos controles de veículo. Os níveis de contagem de hemácias (RBC), hematócitos (HCT), e hemoglobinas foram todos elevados em camundongos tratados com GDF Trap aos controles ou às construções tipo selvagem (vide a tabela abaixo). Portanto, em uma comparação direta, o GDF Trap promove aumentos nas hemácias a uma extensão significativamente maior do que uma proteína ActRIIB-Fc tipo selvagem. De fato, neste experimento, a proteína ActRIIB-Fc tipo selvagem não causou um aumento estatisticamente significativo em hemácias, sugerindo que uma dosagem mais longa ou maior seria necessária para revelar este efeito.

Resultados de hematologia após três semanas de dosagem

	RBC (10 <sup>12</sup> /ml)	HCT %	HGB g/dL
TBS	11,06 ± 0,46	46,78 ± 1,9	15,7 ± 0,7
ActRIIB-mFc	11,64 ± 0,09	49,03 ± 0,3	16,5 ± 1,5
GDF Trap	13,19 ± 0,2**	53,04 ± 0,8**	18,4 ± 0,3**

\*\*=p<0,01

Exemplo 10. Geração de um GDF Trap com domínio extracelular ActRIIB truncado

[0273]Conforme descrito no Exemplo 1, um GDF Trap referido como ActRIIB (L79D 20-134)-hFc foi gerado por fusão N-terminal de TPA líder ao domínio extracelular ActRIIB (resíduos 20-134 em SEQ ID NO: 1) contendo uma substituição de leucina-por-aspartato (no resíduo 79 em SEQ ID NO: 1) e por fusão C-terminal de domínio Fc humano com ligador mínimo (três resíduos de glicina) (Figura 3). Uma sequência de nucleotídeo correspondente a esta proteína de fusão é mostrada na Figura 4.

[0274]Um GDF Trap com domínio extracelular ActRIIB truncado, referido como ActRIIB (L79D 25-131)-hFc, foi gerado por fusão N-terminal de TPA líder a um domínio extracelular truncado (resíduos 25-131 em SEQ ID NO: 1) contendo uma substituição de leucina-por-aspartato (no resíduo 79 em SEQ ID NO: 1) e por fusão C-terminal de domínio Fc humano com ligador mínimo (três resíduos de glicina) (Figura 5). Uma sequência de nucleotídeo correspondente a esta proteína de fusão é mostrada na Figura 6.

Exemplo 11. Ligação ao ligante seletivo por GDF Trap com domínio extracelular ActRIIB duplamente truncado

[0275]A afinidade de GDF Traps e outras proteínas ActRIIB-hFc por vários ligantes foi avaliada *in vitro* com um instrumento Biacore™. Os resultados estão re-

sumidos na tabela abaixo. Os valores Kd foram obtidos por ajuste de afinidade em estado estacionário devido à associação e à dissociação muito rápidas do complexo, que evitou uma determinação precisa de  $k_{on}$  e  $k_{off}$ .

Seletividade de ligante de variantes ActRIIB-hFc:

Construção por fusão	Activina A (Kd e-11)	Activina B (Kd e-11)	GDF11 (Kd e-11)
ActRIIB (L79 20-134)-hFc	1,6	1,2	3,6
ActRIIB (L79D 20-134)-hFc	1350,0	78,8	12,3
ActRIIB (L79 25-131)-hFc	1,8	1,2	3,1
ActRIIB (L79D 25-131)-hFc	2290,0	62,1	7,4

[0276]O GDF Trap com um domínio extracelular truncado, ActRIIB (L79D 25-131)-hFc, se igualou ou ultrapassou a seletividade de ligante exibida pela variante mais longa, ActRIIB (L79D 20-134)-hFc, com uma perda pronunciada de ligação de activina A e activina B e uma retenção quase completa de ligação de GDF11 comparada a contrapartes de ActRIIB-hFc desprovidas de uma substituição L79D. Nota-se que o truncamento sozinho (sem uma substituição L79D) não alterou a seletividade entre os ligantes exibidos no presente documento [compare ActRIIB (L79 25-131)-hFc a ActRIIB (L79 20-134)-hFc].

Exemplo 12. Geração de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc com sequências de nucleotídeo alternativas

[0277]Para gerar ActRIIB (L79D 25-131)-hFc, o domínio extracelular ActRIIB humano com uma substituição de aspartato na posição nativa 79 (SEQ ID NO: 1) e com truncamentos N-terminais e C-terminais (resíduos 25-131 em SEQ ID NO: 1) foi fundido N-terminalmente com uma sequência TPA líder ao invés do líder ActRIIB nativo e C-terminalmente com um domínio Fc humano através de um ligador mínimo (três resíduos de glicina) (Figura 5). Uma sequência de nucleotídeo que codifica esta

proteína de fusão é mostrada na Figura 6 (SEQ ID NO: 27), e uma sequência de nucleotídeo alternativa que codifica exatamente a mesma proteína de fusão é mostrada na Figura 9 (SEQ ID NO: 30). Esta proteína foi expressa e purificada usando a metodologia descrita no Exemplo 1.

Exemplo 13. GDF Trap com um domínio extracelular ActRIIB truncado aumenta a proliferação de progenitores de eritróide em camundongos

[0278]ActRIIB (L79D 25-131)-hFc foi avaliado para determinar seu efeito sobre a proliferação de progenitores de eritróide. Camundongos C57BL/6 machos (8 semanas de idade) foram tratados com ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, s.c.; n = 6) ou veículo (TBS; n = 6) nos Dias 1 e 4, em seguida, eutanasiados no Dia 8 para coleta de baços, tibias, fêmures, e sangue. As células do baço e da medula óssea foram isoladas, diluídas em um meio de Dulbecco modificado por Iscove contendo soro bovino fetal a 5%, suspenso em um meio à base de metilcelulose especializado, e culturado por 2 ou 12 dias para avaliar os níveis de progenitores clonogênicos nos estágios de eritróide unitário formador de colônia (CFU-E) eritróide unitário formador de rajada (BFU-E), respectivamente. O meio à base de metilcelulose para determinação de BFU-E (MethoCult M3434, Stem Cell Technologies) incluiu um fator de célula-tronco de murino recombinante, interleucina-3, e interleucina-6, que não estavam presentes no meio de metilcelulose para determinação de CFU-E (MethoCult M3334, Stem Cell Technologies), enquanto ambos os meios continham eritropoietina, dentre outros constituintes. Para BFU-E e CFU-E, o número de colônias foi determinado em placas de cultura duplicadas derivadas de cada amostra de tecido, e uma análise estatística dos resultados foi baseada no número de camundongos por grupo de tratamento.

[0279]As culturas derivadas do baço de camundongos tratados com ActRIIB (L79D 25-131)-hFc tinha duas vezes o número de colônias CFU-E assim como as culturas correspondentes de camundongos de controle ( $P < 0,05$ ), enquanto o núme-

ro de colônias BFU-E não diferiam significativamente em relação ao tratamento in vivo. O número de colônias CFU-E ou BFU-E de culturas de medula óssea também não diferiam significativamente em relação ao tratamento. Conforme esperado, números aumentados de colônias CFU-E em culturas derivadas do baço foram acompanhados por alterações altamente significativas ( $P < 0,001$ ) no nível de hemácias (aumento de 11,6%), concentração de hemoglobinas (aumento de 12%), e nível de hematócitos (aumento de 11,6%) em eutanásia em camundongos tratados com ActRIIB (L79D 25-131)-hFc comparados aos controles. Esses resultados indicam que a administração in vivo de um GDF Trap com domínio extracelular ActRIIB truncado pode estimular a proliferação de progenitores de eritróide como parte de seu efeito geral para aumentar os níveis de hemácias.

Exemplo 14. GDF Trap com um domínio extracelular ActRIIB truncado compensa anemia induzida por quimioterapia em camundongos

[0280]Os requerentes investigaram o efeito de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc sobre parâmetros eritropoiéticos em um modelo de camundongo de anemia induzida por quimioterapia com base em paclitaxel, que inibe a divisão celular bloqueando-se a polimerização em microtúbulos. Camundongos C57BL/6 machos (8 semanas de idade) foram atribuídos a um dos quatro tratamentos:

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

[0281]Paclitaxel foi administrado no Dia 0, enquanto ActRIIB (L79D 25-131)-hFc ou veículo foram administrados nos Dias 0 e 3. As amostras de sangue foram coletadas para análise CBC a partir de coortes separados nos Dias 1, 3, e 5, e os resultados para os grupos de tratamento 1-3 (acima) foram expressos como uma diferença percentual do veículo em um dado ponto de tempo. O atrito devido à tox-

cidade de paclitaxel era um problema no coorte somente de paclitaxel no Dia 3 (onde n = 1); de outro modo, n = 3-5 por tratamento por ponto de tempo. Comparado ao veículo, o paclitaxel sozinho reduziu a concentração de hemoglobina em quase 13% no Dia 5, enquanto a adição de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc evitou este declínio induzido por paclitaxel (Figura 11). Observaram-se efeitos similares para níveis de hematócitos e RBC. Na ausência de paclitaxel, ActRIIB (L79D 25-131)-hFc aumentou a concentração de hemoglobina em 10% comparada ao o veículo nos Dias 3 e 5 (Figura 11). Logo, um GDF Trap com domínio extracelular ActRIIB truncado pode aumentar os níveis de hemácias suficientemente para compensar a anemia induzida por quimioterapia.

Exemplo 15. GDF Trap com um domínio extracelular ActRIIB truncado reverte a anemia induzida por nefrectomia em camundongos

[0282]Os requerentes investigaram o efeito de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc sobre anemia em um modelo de camundongo nefrectomizado de doença renal crônica. Camundongos C57BL/6 machos (11 semanas de idade) foram submetidos à operação sham ou a uma nefrectomia unilateral para reduzir a capacidade para produção de eritropoietina. Os camundongos foram liberados por uma semana para recuperação pós-cirúrgica e, em seguida, tratados duas vezes por semana com ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, i.p.; n = 15 por condição) ou veículo (TBS; n = 15 por condição) durante um total de 4 semanas. Coletaram-se amostras de sangue antes do princípio da dosagem e após 4 semanas de tratamento. Enquanto os camundongos nefrectomizados tratados com veículo exibiam um declínio significativo no número de hemácias ao longo do período de tratamento de 4 semanas, o tratamento com ActRIIB (L79D 25-131)-hFc não evitou somente o declínio, mas aumentou os níveis de hemácias em 17% ( $P < 0,001$ ) acima da linha de base (Figura 12), apesar da capacidade renal reduzida para produção de eritropoietina. Em camundongos nefrectomizados, ActRIIB (L79D 25-131)-hFc também gerou aumentos signi-

ficativos a partir da linha de base em concentração de hemoglobina e nível de hematócitos e, notavelmente, estimulou cada um desses parâmetros eritropoietícios a aproximadamente a mesma extensão sob condições nefrectomizadas como sob condições submetidas à operação sham (Figura 13). Logo, um GDF Trap com domínio extracelular ActRIIB truncado pode aumentar os níveis de hemácias suficientemente para reverter a anemia em um modelo de doença renal crônica.

Exemplo 16. GDF Trap com um domínio extracelular ActRIIB truncado aperfeiçoaria a recuperação de anemia induzida por perda de sangue em ratos

[0283]Os requerentes investigaram o efeito de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc sobre parâmetros eritropoietícios em um modelo de rato de anemia induzida por perda de sangue aguda (anemia pós-hemorrágica aguda). Ratos Sprague-Dawley machos (aproximadamente 300 g) receberam um cateter jugular crônico no fornecedor (Harlan). No Dia -1, 20% do volume de sangue total foram removidos de cada rato durante um período de 5 minutos através de um cateter sob anestesia de isoflurano. O volume de sangue removido se baseou no valor para volume de sangue total calculado de acordo com a relação seguir derivada por Lee e parceiros (J Nucl Med 25:72-76, 1985) para ratos com peso corporal maior que 120 g:

$$\text{Volume de sangue total (ml)} = 0,062 \times \text{peso corporal (g)} + 0,0012$$

[0284]Um volume igual de solução salina tamponada de fosfato foi substituída através do cateter no momento da remoção de sangue. Os ratos foram tratados com ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, s.c.; n = 5) ou veículo (TBS; n = 5) nos Dias 0 e 3. As amostras de sangue para análise CBC foram removidas através do cateter nos Dias -1 (linha de base), 0, 2, 4, e 6.

[0285]Os ratos de controle responderam à perda de sangue de 20% com uma queda de quase 15% nos níveis de hemácias no Dia 0. Esses níveis permaneceram significativamente menores que a linha de base nos Dias 2 e 4, e não se recuperaram completamente até o Day 6 (Figura 14). Embora os ratos tratados com

ActRIIB (L79D 25-131)-hFc tenham mostrado uma queda quase idêntica em níveis de hemácias após uma perda de sangue de 20%, então, esses ratos exibiram uma recuperação completa em tais níveis até o Dia 2, seguidos por uma elevação adicional nos Dias 4 e 6, representando um aperfeiçoamento altamente significativo em relação aos níveis de controle nos pontos de tempo correspondentes (Figura 14). Resultados similares foram obtidos para concentração de hemoglobina. Essas constatações demonstram que um GDF Trap com domínio extracelular ActRIIB truncado pode produzir uma recuperação mais rápida dos níveis de hemácias a partir de anemia causada por hemorragia aguda.

Exemplo 17. GDF Trap com domínio extracelular ActRIIB truncado aumenta os níveis de hemácias em primatas não-humanos

[0286]Dois GDF Traps, ActRIIB (L79D 20-134)-hFc e ActRIIB (L79D 25-131)-hFc, foram avaliados para determinação de sua capacidade em simular a produção de hemácias em macacos cinomolgos. Os macacos foram tratados subcutaneamente com GDF Trap (10 mg/kg; n = 4 machos/4 fêmeas), ou veículo (n = 2 machos/2 fêmeas) nos Dias 1 e 8. Coletaram-se amostras de sangue nos Dias 1 (linha de base pré-tratamento), 3, 8, 15, 29, e 44, e foram analisadas para determinação dos níveis de hemácias (Figura 15), hematócitos (Figura 16), hemoglobinas (Figura 17), e níveis de reticulócitos (Figura 18). Os macacos tratados com veículo exibiram níveis reduzidos de hemácias, hematócitos, e hemoglobinas em todos os pontos de tempo pós-tratamento, um efeito esperado de amostragem de sangue repetida. Em contrapartida, o tratamento com ActRIIB (L79D 20-134)-hFc ou ActRIIB (L79D 25-131)-hFc aumentou esses parâmetros pelo primeiro ponto de tempo pós-tratamento (Dia 3) e os manteve em níveis substancialmente elevados ao longo da duração do estudo (Figuras 15-17). De modo importante, os níveis de reticulócitos em macacos tratados com ActRIIB (L79D 20-134)-hFc ou ActRIIB (L79D 25-131)-hFc foram substancialmente aumentados nos Dias 8, 15, e 29 comparados ao veículo (Figura 18). Este

resultado demonstrou que o tratamento com GDF Trap aumentou a produção de precursores de hemácias, resultando em níveis elevados de hemácias.

[0287]Tomados juntos, esses dados demonstram que GDF Traps truncados, bem como variantes de comprimento completo, podem ser usados como antagonistas seletivos de GDF11 e ligantes potencialmente relacionados para aumentar a formação de hemácias *in vivo*.

Exemplo 18. GDF Trap derivado a partir de ActRIIB5

[0288]Terceiros reportaram uma forma solúvel alternativa de ActRIIB (designado como ActRIIB5), na qual o exão 4, incluindo o domínio transmembranar ActRIIB, foi substituído por uma sequência C-terminal diferente (WO2007/053775).

[0289]A sequência de ActRIIB5 humano nativo sem seu líder é a seguinte:  
 GRGEAETRECIYYNANWELETNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK  
 KGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAS  
 TTIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCLEGPAHE  
 (SEQ ID NO: 36)

[0290]Uma substituição de leucina-por-aspartato, ou outras substituições acídicas, pode ser realizada em uma posição nativa 79 (sublinhada ou realçada) conforme descrito para construir a variante ActRIIB5 (L79D), que tem a seguinte sequência:

GRGEAETRECIYYNANWELETNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK  
 KGCWDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWA  
 STTIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCLEGPAHE  
 (SEQ ID NO: 37)

[0291]Esta variante pode ser conectada a Fc humano com um ligador TGGG para gerar uma proteína de fusão ActRIIB5(L79D)-hFc humana com a seguinte sequência:

GRGEAETRECIYYNANWELETNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK

KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWA  
 STTIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCLGPAHETGGGTTHTCPPCPAPELLGGPSV  
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQY  
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP  
 SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK  
 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 38)

[0292] Esta construção pode ser expressa em células CHO.

Exemplo 19. Efeitos de camundongos de tratamento combinado com EPO e um GDF Trap com um domínio extracelular ActRIIB truncado

[0293] EPO induz a formação de hemácias aumentando-se a proliferação de precursores de eritróide, enquanto GDF Traps poderiam afetar potencialmente a formação de hemácias em formas que complementem ou acentuem os efeitos de EPO. Portanto, os requerentes investigaram o efeito do tratamento combinado com EPO e ActRIIB (L79D 25-131)-hFc em parâmetros eritropoiéticos. Camundongos C57BL/6 machos (9 semanas de idade) foram administrados com uma única injeção i.p. de EPO humano recombinante sozinho (epoetina alfa, 1800 unidades/kg), ActRIIB (L79D 25-131)-hFc sozinho (10 mg/kg), tanto EPO como ActRIIB (L79D 25-131)-hFc, ou veículo (solução salina tamponada de Tris). Os camundongos foram eutanasiados 72 horas após a dosagem para coleta de sangue, baços, e fêmures.

[0294] Os baços e os fêmures foram processados para obter células precursoras de eritróide para análise citométrica de fluxo. Após a remoção, o baço foi moído em meio de Dulbecco modificado por Iscove contendo soro bovino fetal a 5% e mecanicamente dissociado pressionando-se através de um coador para células de 70 µm com um êmbolo de uma seringa de 1 mL esterilizada. Os fêmures foram limpos para remoção de qualquer músculo residual ou tecido conjuntivo e as extremidades foram aparadas para permitir a coleta de medula lavando-se o eixo restante com meio de Dulbecco modificado por Iscove contendo soro bovino fetal a 5% atra-

vés de uma agulha de calibre 21 conectada a uma seringa de 3 mL. As suspensões celulares foram centrifugadas (2000 rpm durante 10 minutos) e as pelotas de células ressuspensas em PBS contendo soro bovino fetal a 5%. Células ( $10^6$ ) de cada tecido foram incubadas com IgG anti-camundongo para bloquear a ligação não-específica, então, incubadas com anticorpos marcados de modo fluorescente contra marcadores de superfície celular de camundongo CD71 (receptor de transferrina) e Ter119 (um antígeno associado a glicoforina A de superfície celular), lavadas, e analisadas por citometria de fluxo. As células mortas nas amostras foram excluídas da análise por contra-coloração com iodeto de propídeo. A diferenciação de eritróide no baço ou medula óssea foi avaliada pelo grau de marcação CD71, que diminuiu ao longo do curso da diferenciação, e marcação Ter119, que é aumentada durante a diferenciação de eritróide terminal que começa com o estágio de pró-eritroblasto (Socolovsky et al., 2001, Blood 98:3261-3273; Ying et al., 2006, Blood 108:123-133). Logo, a citometria de fluxo foi usada para determinar o número de pró-eritroblastos ( $CD71^{high}Ter119^{low}$ ), eritroblastos basofílicos ( $CD71^{high}Ter119^{high}$ ), eritroblastos policromatofílicos + ortochromatofílicos ( $CD71^{med}Ter119^{high}$ ), e eritroblastos ortocromatofílicos + reticulócitos ( $CD71^{low}Ter119^{high}$ ), conforme descrito.

[0295]O tratamento combinado com EPO e ActRIIB (L79D 25-131)-hFc levou a um aumento surpreendentemente vigoroso em hemácias. No período de tempo de 72 horas deste experimento, EPO nem ActRIIB (L79D 25-131)-hFc sozinhos aumentaram os hematócitos significativamente comparados ao veículo, enquanto o tratamento combinado com os dois agentes levou a um aumento de quase 25% em hematócitos que foi inesperadamente sinérgico, isto é, maior que a soma de seus efeitos separados (Figura 19). A sinergia deste tipo é geralmente considerada uma evidência que os agentes individuais estão agindo através de diferentes mecanismos celulares. Observaram-se resultados similares para concentrações de hemoglobinas (Figura 20) e concentrações de hemácias (Figura 21), sendo que cada uma dessas

também foi aumentada sinergicamente pelo tratamento combinado.

[0296]A análise de níveis de precursor de eritróide revelou um padrão mais complexo. Em camundongos, o baço é considerado o órgão primário responsável por eritropoiese induzível (“estresse”). A análise citométrica de fluxo de tecido esplênico em 72 horas revelou que EPO alterou consideravelmente o perfil de precursor eritropoiético comparado ao veículo, aumentando o número de eritroblastos basofílicos em mais de 170% à custa dos precursores tardios (eritroblastos ortocromatofílicos tardios + reticulócitos), que diminuiu em mais de um terço (Figura 22). De modo importante, o tratamento combinado aumentou os eritroblastos basofílicos significativamente comparado ao veículo, mas a uma extensão menor que o EPO sozinho, enquanto suporta uma maturação não-reduzida de precursores de estágio tardio (Figura 22). Logo, o tratamento combinado com EPO e ActRIIB (L79D 25-131)-hFc aumenta a eritropoiese através de uma acentuação equilibrada de proliferação e maturação de precursor. Em contraste ao baço, o perfil de célula precursora em medula óssea após o tratamento combinado não diferiu acentuadamente daquela após o EPO sozinho. Os Requerentes previram a partir do perfil de precursor esplênico que o tratamento combinado levaria a níveis de reticulócito aumentados e seria acompanhado por uma elevação sustentada de níveis de hemácias maduras, se o experimento fosse estendido além de 72 horas.

[0297]Tomadas juntas, essas constatações demonstram que um GDF Trap com um domínio extracelular ActRIIB truncado pode ser administrado com EPO para aumentar sinergicamente a formação de hemácias in vivo. Atuando através de um mecanismo complementar, porém, indefinido, um GDF Trap pode moderar o efeito proliferativo forte de um ativador de receptor EPO sozinho e ainda permitir que níveis alvo de hemácias sejam atingidos com doses menores de um ativador de receptor EPO, evitando, assim, efeitos colaterais potenciais ou outros problemas associados a níveis maiores de ativação de receptor EPO.

Exemplo 20. GDF Trap com um domínio extracelular ActRIIB truncado aumenta os níveis RBC em um modelo de camundongo de síndrome mielodisplásica

[0298]As síndromes mielodisplásicas (MDS) consistem em diversos distúrbios de insuficiência de medula óssea caracterizados clinicamente por citopenia periférica, anemia refratária, e riscos de progressão para leucemia mielóide aguda. A transfusão de RBCs é uma terapia de manutenção chave em MDS para aliviar a fadiga, aperfeiçoar a qualidade de vida, e prolongar a sobrevivência; no entanto, transfusões regulares resultam tipicamente em sobrecarga de ferro nesses pacientes, com efeitos colaterais em morbidez e mortalidade que podem levar ao uso de remédios, como terapia de quedação de ferro (Dreyfus, 2008, Blood Rev 22 Suppl 2:S29-34; Jabbour et al., 2009, Oncologist 14:489-496). Embora a eritropoietina recombinante (EPO) e seus derivados sejam uma abordagem terapêutica alternativa em uma pequena porcentagem de pacientes MDS (Estey, 2003, Curr Opin Hematol 10:60-67), estudos recentes sugerem que esta classe de agentes esteja associada a um risco aumentado de morbidez e mortalidade em algumas doses devido a eventos tromboembólicos e crescimento tumoral (Krapf et al., 2009, Clin J Am Soc Nephrol 4:470-480; Glaspy, 2009, Annu Rev Med 60:181-192). Logo, há uma necessidade por uma terapia MDS alternativa que aumentaria os níveis de RBC sem a sobrecarga de ferro que acompanha as transfusões crônicas ou os riscos inerentes em EPO exógeno e seus derivados.

[0299]Portanto, os Requerentes investigaram o efeito de ActRIIB (L79D 25-131)-hFc em níveis de RBC em um modelo de camundongo transgênico que recapitula os recursos chave de MDS, incluindo a transformação em leucemia aguda (Lin et al., 2005, Blood 106:287-295; Beachy et al., 2010, Hematol Oncol Clin North Am 24:361-375). Começando em três meses de idade, camundongos NUP98-HOXD13 machos e fêmeas foram tratados duas vezes por semana com ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (10 mg/kg, s.c.) ou veículo (TBS). Crias normais tipo selvagem foram do-

sados com ActRIIB (L79D 25-131)-hFc ou veículo e serviram como controles. Colearam-se amostras de sangue antes do princípio da dosagem e em intervalos mensais posteriormente para realizar medições de CBC.

[0300]Notaram-se diversas diferenças na linha de base entre camundongos NUP98-HOXD13 e controles tipo selvagem. De modo específico, camundongos NUP98-HOXD13 machos exibiram concentrações de RBC significativamente reduzidas (-8,8%, p < 0,05) e hematócitos (-8,4%, p < 0,05) comparados a camundongos tipo selvagem, e camundongos NUP98-HOXD13 fêmeas mostraram tendências similares. Os resultados após três meses de dosagem (média ± DP) são mostrados na tabela a seguir.

Camundongos NUP98-HOXD13		Conc. de RBC (10 <sup>12</sup> células/L)	Conc. de Hemo-globinas (g/dL)	Hematócrito (%)
Machos	Veículo (n = 6)	6,56 ± 0,51	10,68 ± 0,68	31,83 ± 2,13
	ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (n = 8)	8,65 ± 0,54 ***	13,54 ± 0,91 ***	39,20 ± 2,82 ***
Fêmeas	Veículo (n = 5)	6,38 ± 1,61	10,30 ± 2,58	31,96 ± 8,73
	ActRIIB (L79D 25-131)-hFc (n = 6)	8,52 ± 0,70 *	13,52 ± 0,56 *	42,23 ± 2,53 †

\*\*\* p < 0,001 vs. machos + veículo

p < 0,05 vs. fêmeas + veículo

† p = 0,056 vs. fêmeas + veículo

[0301]Comparado ao veículo, o tratamento com ActRIIB (L79D 25-131)-hFc durante três meses aumentou as concentrações de RBC e as concentrações de hemoglobinas significativamente (em aproximadamente 30%) em camundongos NUP98-HOXD13 machos e fêmeas. Os hematócitos também aumentaram significativamente nesses camundongos machos e aumentaram com uma tendência voltada à significância nos camundongos fêmeas. Logo, um GDF Trap com domínio extracelular ActRIIB truncado pode aumentar os níveis de RBC significativamente em um modelo de murino de MDS. Enquanto as transfusões forem inherentemente uma fonte de ferro exógeno, um GDF Trap eleva os níveis de RBC promovendo-se o uso de armazenamentos de ferro endógeno através de eritropoiese, evitando, assim, sobrecarga de ferro e suas consequências negativas. Além disso, conforme notado no Exemplo 19, um GDF Trap atua através de um mecanismo celular diferente (embora complementar) daquele usado pelo ativador de receptor EPOs para estimular eritropoiese, e, desse modo, evita os efeitos colaterais potenciais com ativação de receptor EPO.

Exemplo 21. Efeito de GDF Trap com um domínio extracelular ActRIIB truncado em níveis de RBC e morfologia em um modelo de camundongo de β-talassemia

[0302]Em síndromes de talassemia, que representam as causas mais comuns de eritropoiese ineficaz, desequilíbrios na expressão de cadeias de α- e β-globina resultam em anemia devido a apoptose aumentada durante a maturação de eritroblastos. A transfusão de RBC é atualmente uma terapia de manutenção chave em talassemia, mas com o passar do tempo causa um acúmulo de ferro potencialmente letal em certos tecidos (Tanno et al, 2010, Adv Hematol 2010:358283). Por exemplo, doenças cardíacas associadas à sobrecarga de ferro podem representar 50% da mortalidade em pacientes com talassemia principal (Borgna-Pignatti et al,

2005, Ann NY Acad Sci 1054:40-47). De modo importante, os níveis de EPO endógeno são tipicamente elevados e contribuem para etiologia da doença em síndromes de talassemia, bem como outros distúrbios de eritropoiese ineficaz; portanto, o uso terapêutico de EPO recombinante pode ser inapropriado. Logo, há uma necessidade por terapias alternativas para talassemia e outros distúrbios de eritropoiese ineficaz que aumentariam os níveis de RBC sem a sobrecarga de ferro que acompanha as transfusões crônicas.

[0303]Os Requerentes investigaram o efeito de ActRIIB (L79D 25-131)-mFc sobre a formação de RBC em um modelo de camundongo de β-talassemia intermédia na qual toda a região de codificação do gene de codificação de globina β-principal foi excluída. Os camundongos homozigotos para este alelo *Hbb<sup>th-1</sup>* exibem uma anemia hipocrômica, micocítica com bordos de inclusão em uma proporção alta de RBCs circulantes (Skow et al, 1983, Cell 1043:1043-1052). Em um experimento preliminar, camundongos *Hbb<sup>-/-</sup>* β-talassêmicos (C57BL/6J-*Hbb<sup>d3th</sup>*/J) em 2 a 5 meses de idade foram aleatoriamente atribuídos a receberem ActRIIB (L79D 25-131)-mFc (10 mg/kg) ou veículo (solução salina tamponada de Tris) por injeção subcutânea duas vezes por semana. As crias normais tipo selvagem com veículo serviram como controles adicionais. Amostras de sangue (100 µl) foram coletadas por sangramento da bochecha antes do princípio da dosagem e em intervalos regulares posteriormente para análise de CBC. A caracterização de parâmetros hematológicos em linha de base confirmou que os camundongos *Hbb<sup>-/-</sup>* β-talassêmicos estavam gravemente anêmicos (Figura 23), e o tratamento de camundongos *Hbb<sup>-/-</sup>* com ActRIIB (L79D 25-131)-mFc durante 4 semanas aumentou o número de RBC consideravelmente comparados aos camundongos *Hbb<sup>-/-</sup>* tratados com veículo, reduzindo, assim, a anemia observada neste modelo pela metade (Figura 24). Aumentos associados ao tratamento em concentrações de hematócitos e hemoglobinas também foram observados. De modo importante, o tratamento de camundongos *Hbb<sup>-/-</sup>* com

ActRIIB (L79D 25-131)-mFc também resultou em uma morfologia RBC aperfeiçoada e reduziu a hemólise e os detritos eritrocíticos comparados a camundongos *Hbb*<sup>-/-</sup> tratados com veículo (Figura 25), indicando, assim, um aperfeiçoamento fundamental em eritropoiese. Portanto, um polipeptídeo de GDF Trap com domínio extracelular ActRIIB truncado pode proporcionar um benefício terapêutico para anemia em um modelo de murino de β-talassemia aumentando-se tanto o número como a morfologia de RBC. Promovendo-se uma maturação de eritroblasto enquanto se reduz a anemia, os polipeptídeos de GDF Trap podem tratar a eritropoiese ineficaz. Diferentemente das transfusões, que são inerentes a uma fonte de ferro exógeno, um polipeptídeo de GDF Trap pode elevar os níveis de RBC promovendo-se o uso de armazenamentos de ferro endógeno através de eritropoiese, evitando, assim, uma sobrecarga de ferro e suas consequências negativas.

Exemplo 22. Efeito de um GDF Trap com domínio extracelular ActRIIB truncado em níveis de EPO, esplenomegalia, densidade óssea, e sobrecarga de ferro em um modelo de camundongo de β-talassemia

[0304]A hipóxia associada à eritropoiese ineficaz causa níveis de EPO elevados que podem conduzir uma expansão massiva de eritroblastos tanto dentro como fora da medula óssea, levando à esplenomegalia (aumento do baço), patologia óssea induzida por eritroblasto, e sobrecarga de ferro tecidual, mesmo na ausência de transfusões de RBC terapêuticas. A sobrecarga de ferro não-tratada leva à deposição de ferro tecidual, disfunção múltipla dos órgãos, e mortalidade prematura (Borgna-Pignatti et al., 2005, Ann NY Acad Sci 1054:40-47; Borgna-Pignatti et al., 2011, Expert Rev Hematol 4:353-366), mais geralmente devido à cardiomiopatia em formas graves de talassemia (Lekawannijit et al., 2009, Can J Cardiol 25:213-218). Aumentando-se a efetividade eritropoiética, um polipeptídeo de GDF Trap pode aliviar não somente a anemia latente e os níveis de EPO elevados, mas também as complicações associadas de esplenomegalia, patologia óssea, e sobrecarga de fer-

ro.

[0305]Os Requerentes investigaram efeitos de um polipeptídeo de GDF Trap nesses parâmetros no mesmo modelo de camundongo de  $\beta$ -talassemia intermediária estudados no Exemplo 21. Camundongos  $Hbb^{-/-}$   $\beta$ -talassêmicos (C57BL/6J- $Hbb^{d3th}/J$ ) em 3 meses de idade foram aleatoriamente atribuídos a receberem ActRIIB (L79D 25-131)-mFc (1 mg/kg, n = 7) ou veículo (solução salina tamponada de Tris, n = 7) por injeção subcutânea duas vezes por semana durante 2 meses. As crias normais tipo selvagem dosados com veículo (n = 13) serviram como controles adicionais. Amostras de sangue (100  $\mu$ l) foram coletadas ao término do estudo para análise de CBC. Ao término do estudo, determinou-se a densidade mineral óssea por Absorciometria com Raios-X de Dupla Energia (DEXA), os níveis de EPO sérica foram determinados por ELISA, as espécies de oxigênio reativo (ROS) foram quantificadas com diacetato de 2',7'-diclorodiidro fluoresceína e citometria de fluxo (Suragani et al., 2012, Blood 119:5276-5284), e os níveis de mRNA de hepcidina foram determinados por uma reação de cadeia de polimerase quantitativa.

[0306]Este polipeptídeo de GDF Trap exerceu múltiplos efeitos hematológicos em consonância com o alívio da eritropoiese ineficaz. O tratamento de camundongos  $Hbb^{-/-}$  com ActRIIB (L79D 25-131)-mFc durante 2 meses aumentou as contagens RBC em 25% comparados a camundongos  $Hbb^{-/-}$  dosados com veículo (Figura 26). Em camundongos  $Hbb^{-/-}$ , o tratamento com ActRIIB (L79D 25-131)-mFc também aumentou a concentração de hemoglobina e hematócrito significativamente em 2 meses comparados a controles de veículo. Essas alterações foram acompanhadas por níveis reduzidos de reticulócitos circulantes ( $31,3 \pm 2,3\%$  vs.  $44,8 \pm 5,0\%$  para camundongos  $Hbb^{-/-}$  tratados com ActRIIB (L79D 25-131)-mFc ou veículo, respectivamente), que estão em consonância com o alívio de anemia. Conforme no Exemplo 21, o tratamento de camundongos  $Hbb^{-/-}$  com ActRIIB (L79D 25-131)-mFc resultou em uma morfologia de RBC aperfeiçoada e detritos eritrocíticos reduzidos compara-

dos a camundongos *Hbb*<sup>-/-</sup> dosados com veículo. Comparados a indivíduos saudáveis, os pacientes com talassemia exibem uma taxa aumentada de destruição de RBC e níveis séricos elevados de bilirrubina, que consiste em um produto de catabolismo do heme e marcador de hemólise (Orten, 1971, Ann Clin Lab Sci 1:113-124). Em camundongos *Hbb*<sup>-/-</sup>, o tratamento com ActRIIB (L79D 25-131)-mFc reduziu os níveis de bilirrubina sérica em 2 meses quase pela metade comparados ao veículo (Figura 27), proporcionando, assim, uma evidência que ActRIIB (L79D 25-131)-mFc pode aperfeiçoar inesperadamente a integridade estrutural/funcional de RBCs maduros à medida que promove a formação de RBC. De modo importante, o tratamento de camundongos *Hbb*<sup>-/-</sup> com ActRIIB (L79D 25-131)-mFc reduziu os níveis de EPO sérica em 2 meses em mais de 60% comparados ao veículo no mesmo modelo (Figura 28). Visto que níveis de EPO elevados são uma particularidade de eritropoiese ineficaz em β-talassemia, a redução desses níveis é uma forte evidência que ActRIIB (L79D 25-131)-mFc alivia a própria eritropoiese ineficaz, não somente a anemia que ela causa, neste modelo de murino de talassemia.

[0307]Este polipeptídeo de GDF Trap também produziu alterações benéficas em critérios de avaliação que representam complicações principais de eritropoiese ineficaz. Em pacientes com talassemia, tanto esplenomegalia como deterioração óssea são causados por hiperplasia e eritropoiese extramedular eritróide estimulados por EPO. Em camundongos *Hbb*<sup>-/-</sup>, o tratamento com ActRIIB (L79D 25-131)-mFc durante 2 meses reduziu o peso do baço significativamente comparado ao veículo (Figura 29) e restaurou completamente a densidade mineral óssea a valores tipo selvagem (Figura 30). A homeostase de ferro também foi aperfeiçoada significativamente pelo tratamento com este polipeptídeo de GDF Trap. O ferro sérico consiste em ferro não-ligado (livre) e em ferro ligado a apotransferina (formando transferrina), uma proteína especializada para transportar ferro elementar na circulação. O ferro sérico constitui um componente relativamente pequeno e lábil do ferro corporal

total, enquanto os níveis séricos de ferritina, outra forma de armazenamento de ferro encontrada principalmente intracelularmente, representam um componente maior e menos lável. Uma terceira medida de carga de ferro é a saturação de transferina, o grau ao qual a capacidade de ligação ao ferro de transferina é ocupada. Em camundongos *Hbb<sup>-/-</sup>*, o tratamento com ActRIIB (L79D 25-131)-mFc durante 2 meses reduziu cada um desses indicadores de sobrecarga de ferro significativamente comparados ao veículo (Figura 31). Além de seus efeitos sobre esses diversos parâmetros de homeostase de ferro, ActRIIB (L79D 25-131)-mFc normalizou a sobrecarga de ferro tecidual em camundongos *Hbb<sup>-/-</sup>* conforme determinado por análise histoquímica no baço, fígado, e rins (Figura 32). Ademais, este polipeptídeo de GDF Trap exerceu um efeito benéfico sobre a expressão de hepcidina, uma proteína hepática considerada como sendo o regulador principal de homeostase de ferro (Gantz, 2011, Blood 117:4425-4433), cujos níveis variam inversamente com o consumo de ferro alimentar. O tratamento com ActRIIB (L79D 25-131)-mFc reverteu a expressão anormalmente baixa de hepcidina no fígado de camundongos *Hbb<sup>-/-</sup>* (Figura 33). Finalmente, outro estudo com design similar foi realizado para determinar o efeito deste GDF Trap em espécies de oxigênio reativo (ROS), que se imagina mediar muitos dos efeitos tóxicos de sobrecarga de ferro (Rund et al., 2005, N Engl J Med 353:1135-1146). Em camundongos *Hbb<sup>-/-</sup>* com 3 meses de idade, o tratamento com ActRIIB (L79D 25-131)-mFc em 1 mg/kg duas vezes por semana durante 2 meses quase normalizou os níveis de ROS (Figura 34) e, portanto, seria previsto que reduz consideravelmente os danos teciduais mediados por ROS em talassemia e outras doenças caracterizadas por eritropoiese ineficaz.

[0308]Juntas, as constatações anteriores demonstram que os polipeptídeos de GDF Trap podem tratar eritropoiese ineficaz, inclusive anemia e níveis elevados de EPO, bem como complicações, como esplenomegalia, patologia óssea induzida por eritroblasto, e sobrecarga de ferro, e suas patologias concomitantes. Com esple-

nomegalia, essas patologias incluem dores torácicas ou abdominais e hiperplasia reticuloendotelial. A hematopoiese extramedular pode ocorrer não somente no baço, mas potencialmente em outros tecidos sob a forma de pseudotumores hematopoiéticos extramedulares (Musallam et al., 2012, Cold Spring Harb Perspect Med 2:a013482). Com patologia óssea induzida por eritroblasto, as patologias concomitantes incluem baixa densidade mineral óssea, osteoporose, e dores ósseas (Haidar et al., 2011, Bone 48:425-432). Com sobrecarga de ferro, as patologias concomitantes incluem supressão de hepcidina e hiperabsorção de ferro alimentar (Musallam et al., 2012, Blood Rev 26(Suppl 1):S16-S19), múltiplas endocrinopatias e fibrose/cirrose hepática (Galanello et al., 2010, Orphanet J Rare Dis 5:11), e cardiomiospatia por sobrecarga de ferro (Lekawanvijit et al., 2009, Can J Cardiol 25:213-218). Contrariamente às terapias existentes para eritropoiese ineficaz, os polipeptídeos de GDF Trap, como ActRIIB (L79D 25-131)-mFc são capazes de reduzir a sobrecarga de ferro em modelos de murinos enquanto aumenta simultaneamente os níveis de RBC. Esta capacidade inovadora distingue os polipeptídeos de GDF Trap das transfusões de sangue, que sobrecarregam o corpo com ferro exógeno no curso do tratamento de anemia e o fazem sem aliviar a condição concomitante de eritropoiese ineficaz.

#### INCORPORAÇÃO A TÍTULO DE REFERÊNCIA

[0309]Todas as publicações e patentes mencionadas no presente documento se encontram aqui incorporadas em suas totalidades a título de referência como se cada publicação ou patente individual estivesse específica e individualmente indicada como estando incorporada a título de referência.

[0310]Muito embora as modalidades específicas do objeto tenham sido discutidas, o relatório descritivo anterior é ilustrativo e não restritivo. Muitas variações se tornarão aparentes aos indivíduos versados na técnica mediante uma revisão deste relatório descritivo e das reivindicações abaixo. O escopo completo da inven-

ção deve ser determinado com referência às reivindicações, junto a seu escopo completo de equivalentes, e ao relatório descritivo, junto a tais variações.

## REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um polipeptídeo de sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 28, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para tratar eritropoiese ineficaz em um paciente, em que a eritropoiese ineficaz é uma sobrecarga de ferro em um paciente com talassemia.
2. Uso de um polipeptídeo de sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para tratar eritropoiese ineficaz em um paciente, em que a eritropoiese ineficaz é uma sobrecarga de ferro em um paciente com talassemia.
3. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente tem sobrecarga de ferro nos tecidos.
4. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente tem níveis indesejavelmente altos de eritropoietina endógena.
5. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente tem β-talassemia maior.
6. Uso, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente tem uma síndrome de β-talassemia.
7. Uso, de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente tem β-talassemia intermediária.
8. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo aumenta os níveis de hepcidina no paciente.
9. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo trata ou previne cardiomiopatia por sobrecarga de ferro.
10. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9,

**CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo reduz a hiperabsorção de ferro da dieta.

11. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo é um homodímero.

12. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo inibe a sinalização pela miostatina e/ou GDF11 em um ensaio com base em células.

13. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo pode ser formulado para ser administrado em combinação com um agente quelante de ferro ou múltiplos agentes quelantes de ferro.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que os agentes quelantes de ferro são compostos selecionados a partir de: a. deferoxamina; b. deferiprona e c. deferasirox.

ActRIIa            ILGRSETQEC LFFNANWEKD RTNQTGVEPC YGDKDKRRHC FATWKNISGS  
ActRIIb            GRGEAETREC IYVYNANWELE RTMOSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT

IEIVKQGCWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV YFCCCEGNMC NEKFSYFPEM  
IELVKKGWL DDFNCYDROE CVATEENPOV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA

EVTQPTSNSPV TPKPPT  
GGPEVTYEPP PTAPT

Fig. 1

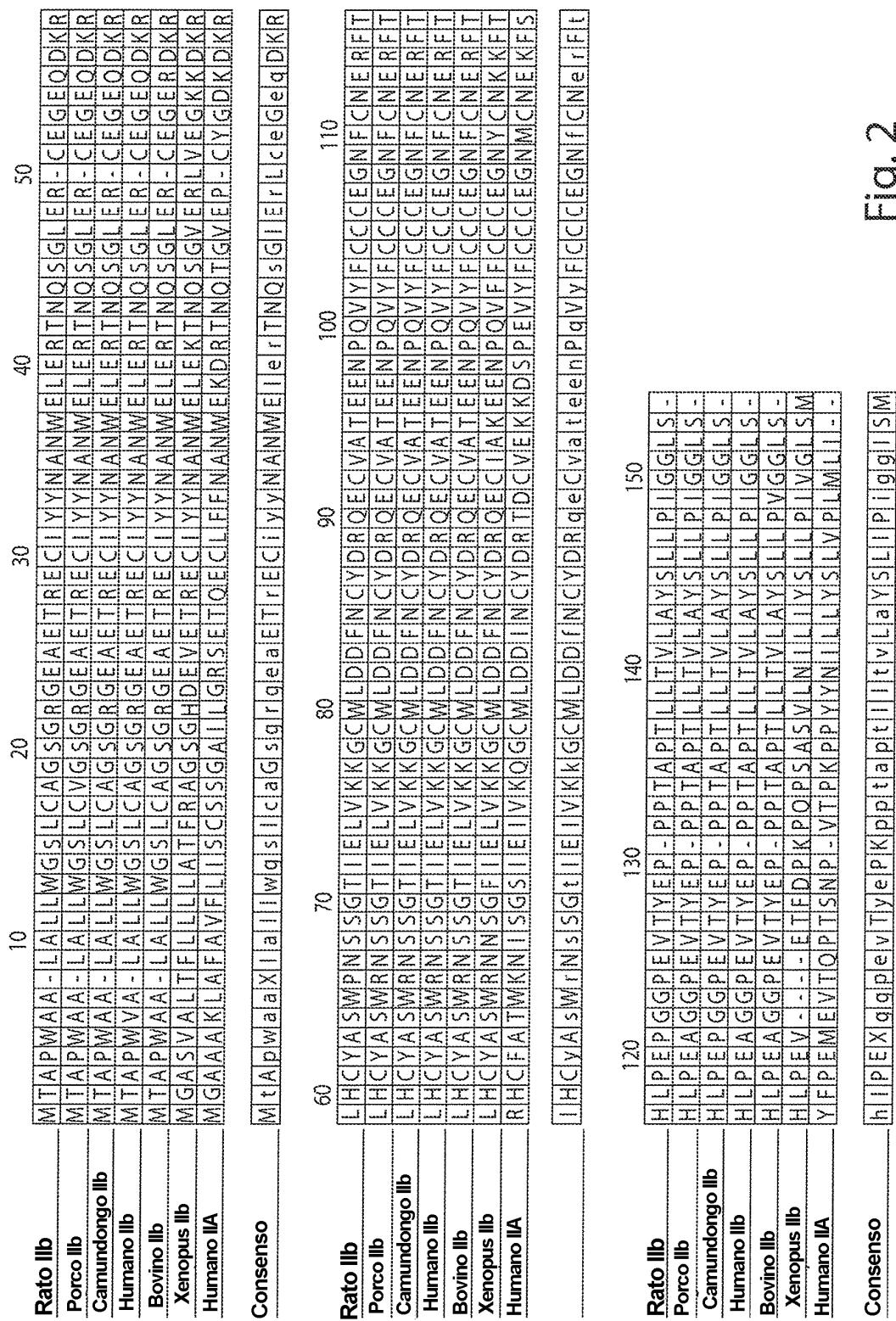


Fig. 2

1 MDAMKRLGCC VLLLCGAVFV SPGAS~~GRGEA~~ ETRECIYYNA NWELERTNOS  
51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWDDDFNC YDRQECVATE  
101 ENPOQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC  
151 PAPELLGGPS VFLFPPPKPD TLMISRTPEV TCVVVVDVSHE DPEVKFNWYV  
201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP  
251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV  
301 EWESNGQOPEN NYKTPPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH  
351 EALHNHYTQK SLSLSPGK

Fig. 3

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC  
TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

5 1 AGTCCTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG  
TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGAGACCCGC ACCCCTCCGA CTCTGTGCC

10 1 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC  
TCACGTAGAT GATGTTGCGG TTGACCCCTCG ACCTCGCGTG GTTGGTCTCG

15 1 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AACCGGCTGC ACTGCTACGC  
CCGGACCTCG CGACGCTTCC GCTCGTCTG TTCGCCGACG TGACGATGCG

20 1 CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT  
GAGGACCGCG TTGTCCAGAC CGTGGTAGCT CGAGCACTTC TTCCCGACGA

25 1 GGGATGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG  
CCCTACTACT GAAGTTGACG ATGCTATCCG TCCTCACACA CGGGTGACTC

30 1 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA  
CTCTTGGGGG TCCACATGAA GACGACGACA CTTCGTTGA AGACGTTGCT

35 1 GCGCTTCACT CATTGCCAG AGGCTGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC  
CGCGAAAGTGA GTAAACGGTC TCCGACCCCC GGGCCTTCAG TGCATGCTCG

40 1 CACCCCCGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC  
GTGGGGGCTG TCGGGGGTGG CCACCACCTT GAGTGTGTAC GGGTGGCACG

45 1 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCCAAA  
GGTCGTGGAC TTGAGGACCC CCCTGGCAGT CAGAAGGAGA AGGGGGTTT

50 1 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG  
TGGGTTCTG TGGGAGTACT AGAGGGCTG GGGACTCCAG TGTACGGCACC

55 1 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG  
ACCACCTGCA CTCGGTGCTT CTGGGACTCC AGTTCAAGTT GACCATGCAC

60 1 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA  
CTGCCGCACC TCCACGTATT ACGGTTCTGT TTGGCGCCCG TCCTCGTCAT

65 1 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT  
GTTGTCGTGC ATGGCACACC AGTCGCAGGA GTGGCAGGAC GTGGTCCTGA

Fig. 4

701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA  
   CCGACTTACC GTTCCTCATG TTCACGTTCC AGAGGTTGTT TCAGGGAGGGT  
  
 751 GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACCC  
   CGGGGGTAGC TCTTTGGTA GAGGTTTCGG TTTCCCGTCG GGGCTCTTGG  
  
 801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCG CATCCCAGGA GGAGATGACC AAGAACCAAGG  
   TGTCCACATG TGGGACGGGG GTAGGGCCCT CCTCTACTGG TTCTTGGTCC  
  
 851 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATGCCGTG  
   AGTCGGACTG GACGGACCAG TTTCCGAAGA TAGGGTCGCT GTAGCGGCAC  
  
 901 GAGTGGGAGA GCAATGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC  
   CTCACCCCTCT CGTTACCCGT CGGCCTCTTG TTGATGTTCT GGTGCGGAGG  
  
 951 CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG  
   GCACGACCTG AGGCTGCCGA GGAAGAAGGA GATATCGTTC GAGTGGCACC  
  
 1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT  
   TGTTCTCGTC CACCGTCGTC CCCTTGCAGA AGAGTACGAG GCACTACGTA  
  
 1051 GAGGCTCTGC ACAACCACCA CACGCAGAAC AGCCTCTCCC TGTCGGGG  
   CTCCGAGACG TGTTGGTGAT GTGCGTCTTC TCGGAGAGGG ACAGGGGCC  
  
 1101 TAAATGA (SEQ ID NO: 25)  
   ATTTACT (SEQ ID NO: 33)

Fig. 4 (cont.)

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

Fig. 5

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC  
 TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

51 E T R E C I Y Y  
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCC CGCGTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA  
 TCAGAACAA AGCGGGCCGC GGCGACTCTG TGCCCTCACG TAGATGATGT

101 N A N W E L E R T N Q S G L E R C  
 101 ACGCCAAC TG GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCC CT GGAGCGCTGC  
 TGCGGTTGAC CCTCGACCTC GCGTGGTTGG TCTCGCCGGA CCTCGCGACG

151 E G E Q D K R L H C Y A S W R N S  
 151 GAAGGCGAGC AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCCTCT GGCGCAACAG  
 CTTCCGCTCG TCCTGTTCGC CGACGTGACG ATGCGGAGGA CCCCGTTGTC

201 S G T I E L V K K G C W D D D F  
 201 CTCTGGCACC ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGAC GATGACTTCA  
 GAGACCGTGG TAGCTCGAGC ACTTCTCCC GACGACCTG CTACTGAAGT

251 N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V  
 251 ACTGCTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG  
 TGACGATGCT ATCCGTCCCTC ACACACCGGT GACTCCTCTT GGGGGTCCAC

301 Y F C C C E G N F C N E R F T H L  
 301 TACTTCTGCT GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATT  
 ATGAAGACGA CGACACTTCC GTGAAGACG TTGCTCGCGA AGTGAGTAAA

351 P E A G G P E V T Y E P P P T  
 351 GCCAGAGGCT GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGGTG  
 CGGTCTCCGA CCCCCGGGCC TTCAGTCAT GCTCGGTGGG GGCTGTCCAC

401 GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAAC CCTGGGGGG  
 CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC  
 GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGGTACACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC  
 GGCCTGGGA CTCCAGTGTGTA CGCACCAACCA CCTGCACCTCG GTGCTTCTGG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCCTGGAGGT GCATAATGCC  
 GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

Fig. 6

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG  
 TTCTGTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC  
  
 651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT  
 GCAGGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA  
  
 701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC  
 CGTTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG  
  
 751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACACACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC  
 TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGTTGTC CACATGTGGG ACGGGGTAG  
  
 801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG  
 GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC  
  
 851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG  
 CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC  
  
 901 GAGAACAACT ACAAGACAC GCCTCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT  
 CTCTTGTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA  
  
 951 CTTCCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCACGGGA  
 GAAGGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT  
  
 1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG  
 TGCAGAAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC  
  
 1051 CAGAAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 27)  
 GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 34)

**Fig. 6 (cont.)**

1 ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK  
51 KGCWDDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV  
101 TYEPPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL PPPKPDTLM ISRTPEVTCV  
151 VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD  
201 WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLR PSREEMTKNQ  
251 VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TPPVLDSDG SFFLYSKLT  
301 DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 28)

Fig. 7

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

Fig. 8

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC  
 TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG  
 E T R E C I Y Y  
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCCGGCG CCGCCGAAAC CCGCGAATTGT ATTATTACA  
 TCAGAACCAA AGCGGGCCGC GGCGGCTTGT GGCGCTTACA TAAATAATGT  
 N A N W E L E R T N Q S G L E R C  
 101 ATGOTAATTG GGAACTCGAA CGGACGAACC AATCCGGGCT CGAACCGGTGT  
 TACGATTAAC CCTTGAGCTT GCCTGCTTGG TTAGGCCGA CCTTGCCACA  
 E G E Q D K R L H C Y A S W R N S  
 151 GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTG TATGCCTCGT GGAGGAACCTC  
 CTCCCCCTTG TCCTATTTGC GGAGGTAACG ATACGCAGCA CCTCCTTGAG  
 S G T I E L V K K G C W D D D F  
 201 CTCCGGGACG ATTGAACCTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GAAGGATTTCA  
 GAGGCCCTGC TAACTTGACC AGTTCTTCC CACGACCCTG CTGCTAAAGT  
 N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V  
 251 ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTGGGA CGGAAGAGAA TCCGCAGGTC  
 TAACAATACT GGCGGTCTT ACACAGCGCT GGCTTCTCTT AGGCGTCCAG  
 Y F C C C E G N F C N E R F T H L  
 301 TATTTCGTT GTTGCAGGG GAATTCTGT AATGAACCGT TTACCCACCF  
 ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTTAAAGACA TTACTTGCCA AATGGGTGGA  
 P E A G G P E V T Y E P P P T  
 351 CCCCGAAGGCC GCGGGCCCG AGGTGACCTA TGAACCCCGG CCACCCGGTG  
 GGGGCTCGG CCGCCCGGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGC GGGTGGCCAC  
 401 GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCCAG CACCTGAAC CCTGGGGGG  
 CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT  
 451 CCGTCAGTCT CCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC  
 GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG  
 501 CCGGACCCCT GAGGTACAT CGTGGCTGGT CGACGTGAGC CACGAAGACC  
 GGCCTGGGGC CTCCAGTGT ACGCACCA CCTGCACCTCG GTGCTTCTGG  
 551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC  
 GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

Fig. 9

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG  
 TTCTGTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC  
  
 651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT  
 GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACC GTTC CTCATGTTCA  
  
 701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC  
 CGTTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG  
  
 751 AAAGCCAAAG GGCAAGCCCCG AGAACCCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC  
 TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG  
  
 801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG  
 GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC  
  
 851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGGCC  
 CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC  
  
 901 GAGAACAACT ACAAGACAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT  
 CTCTTGTGA TGTTCTGGTG CGGAGGCCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA  
  
 951 CTTCCCTCAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA  
 GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT  
  
 1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCAC TACACAG  
 TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC  
  
 1051 CAGAACAGGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 30)  
 GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATT ACT (SEQ ID NO: 35)

Fig. 9 (cont.)

GAAAC CCGCGAATGT ATTATTACA ATGCTAATTG GGAACTCGAA  
CGGACGAACC AATCCGGGCT CGAACGGTGT GAAGGGGAAAC AGGATAAACG  
CCTCCATTGC TATGCGTCGT GGAGGAACTC CTCCGGGACG ATTGAACTGG  
TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTCA ATTGTTATGA CCGCCAGGAA  
TGTGTCGCCA CCGAAGAGAA TCCGCAGGT C TATTCTGTT GTTGCGAGGG  
GAATTCTGT AATGAAACGGT TTACCCACCT CCCCGAAGCC GCAGGGCCCG  
AGGTGACCTA TGAACCCCCG CCCAC (SEQ ID NO: 31)

Fig. 10

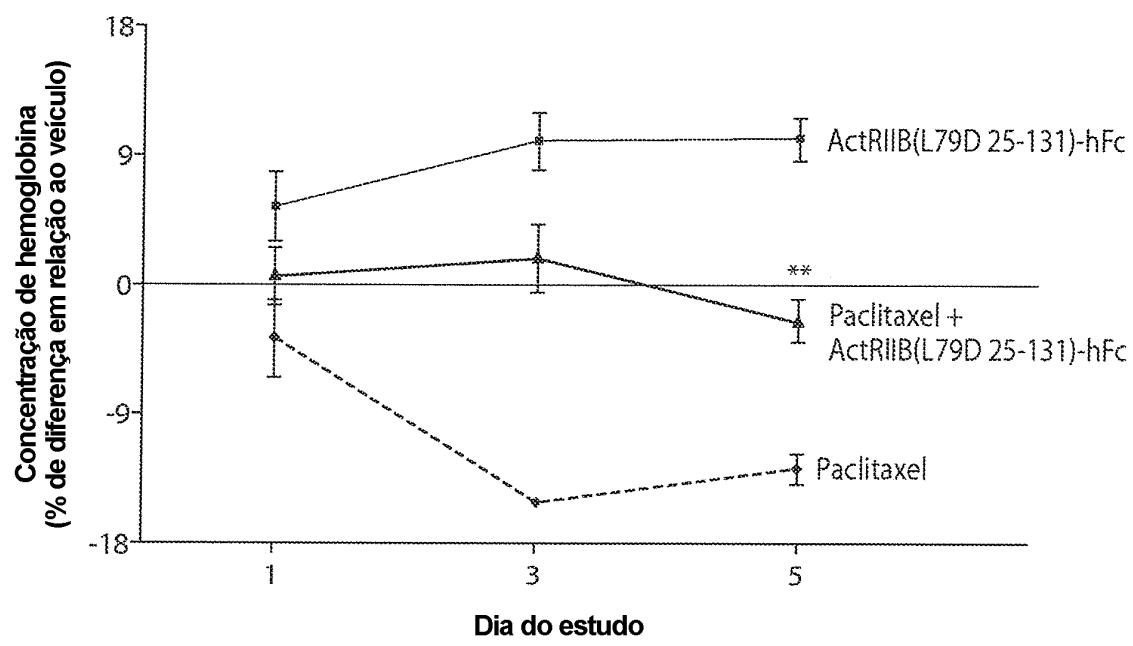


Fig. 11

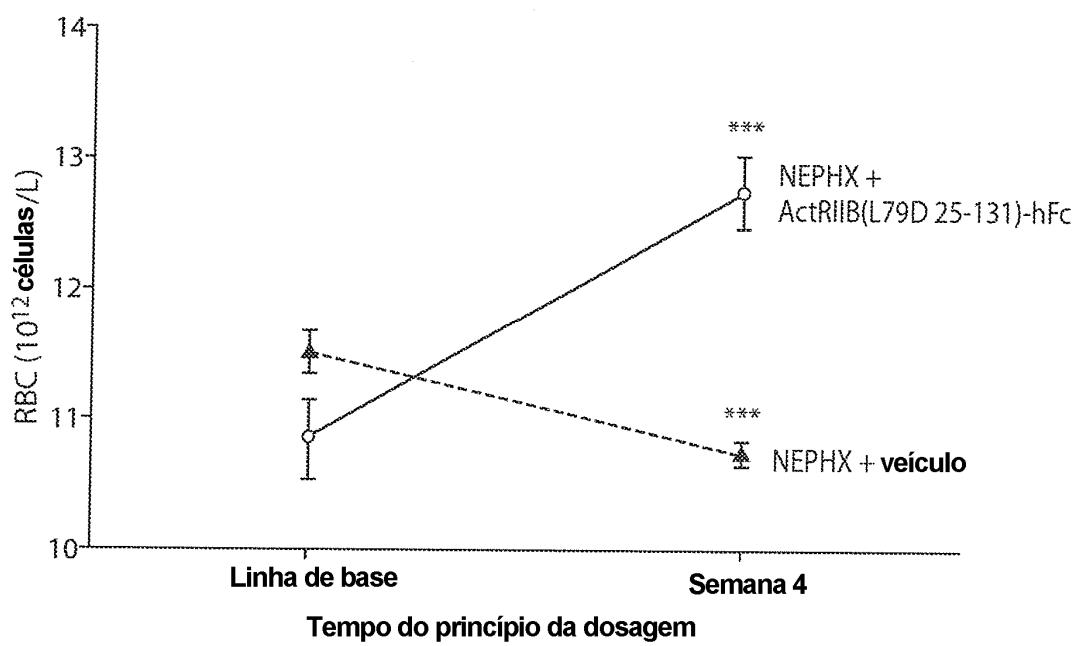


Fig. 12

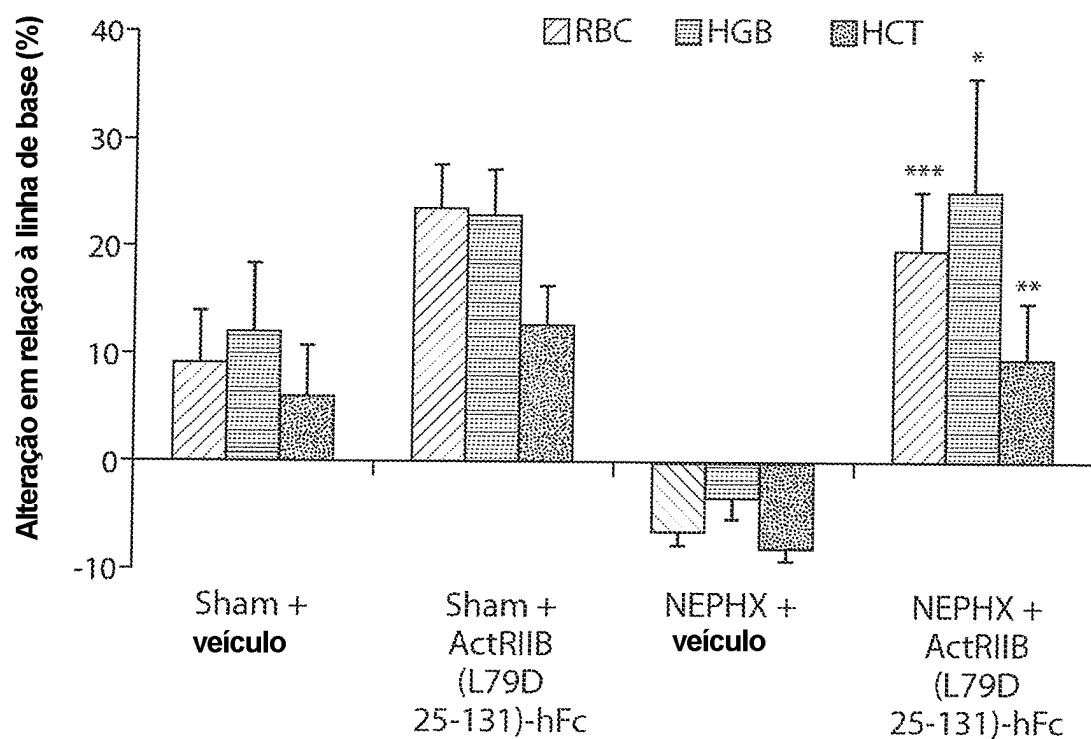


Fig. 13

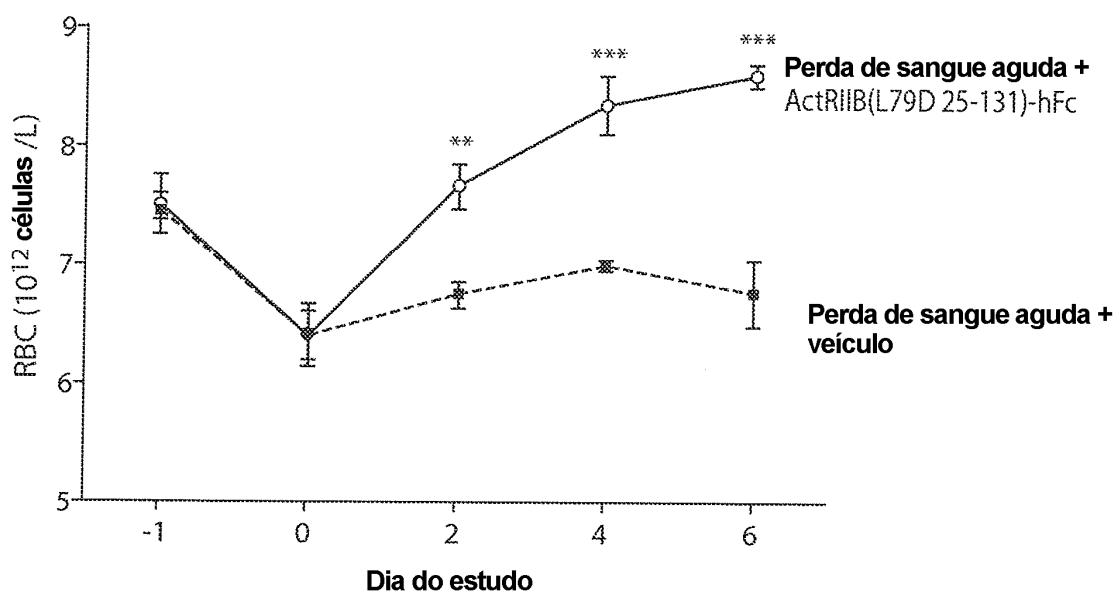


Fig. 14

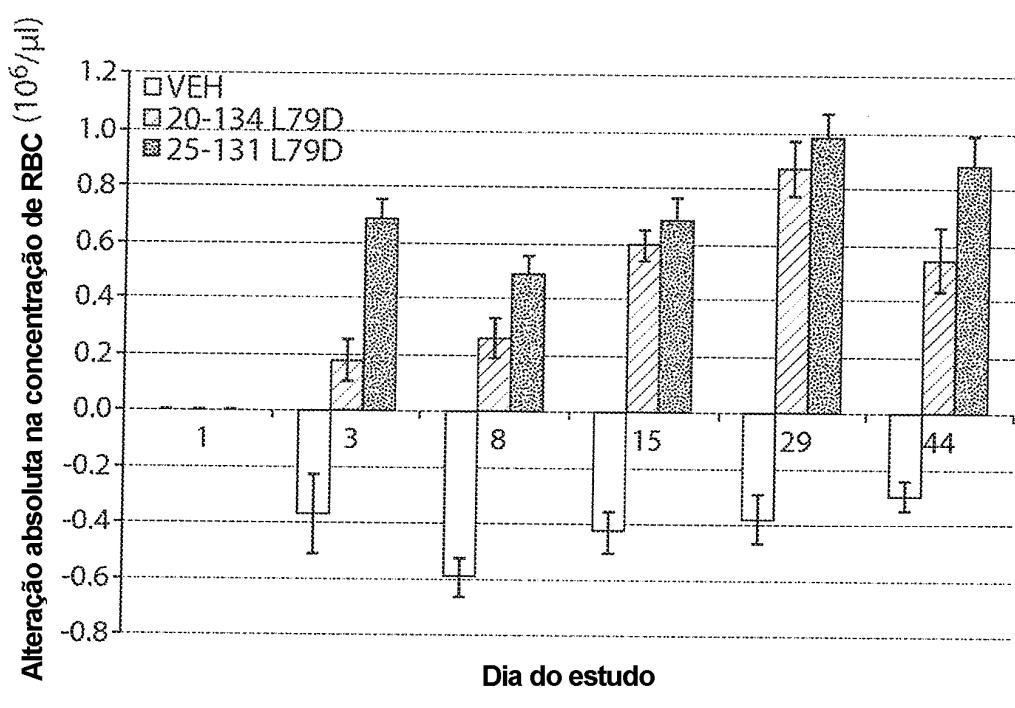


Fig. 15

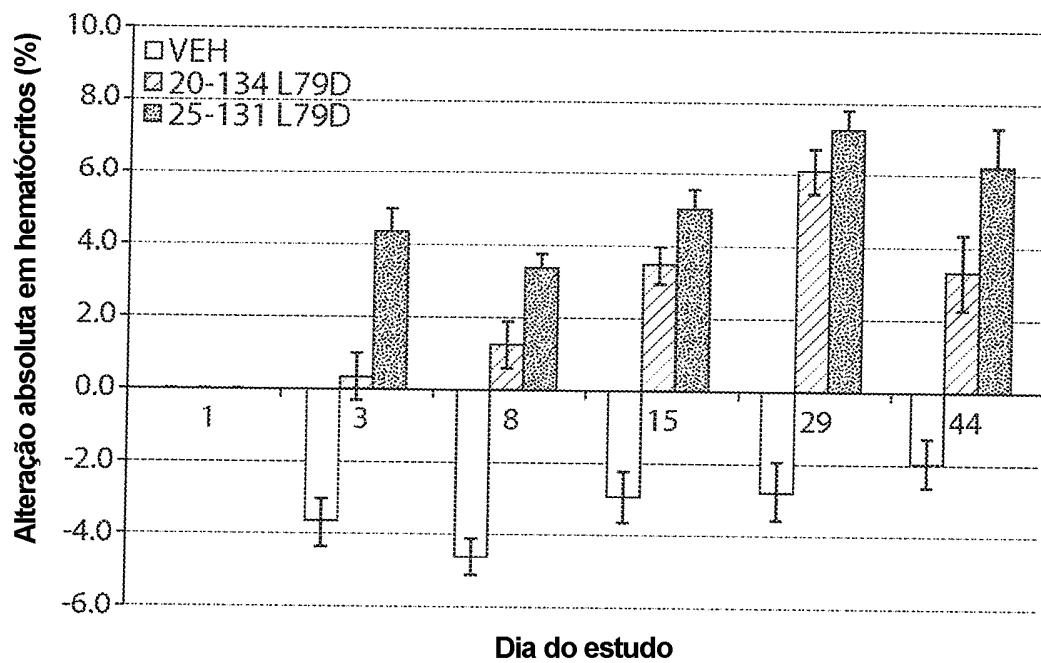


Fig. 16

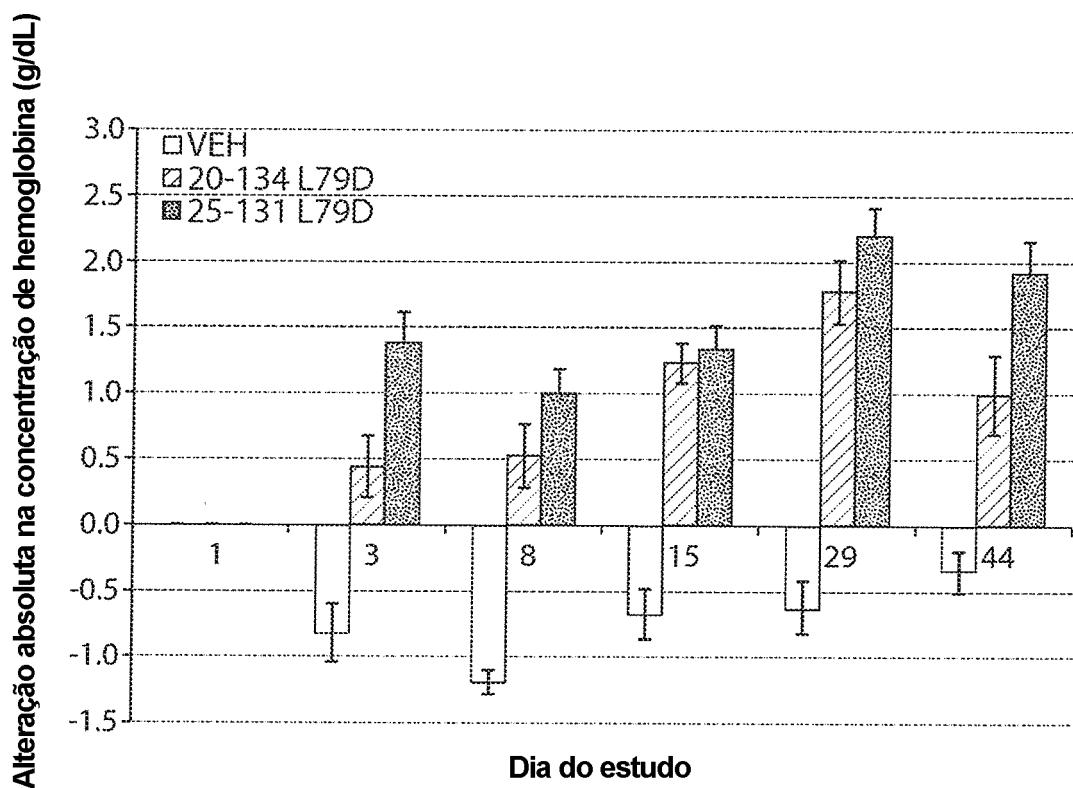


Fig. 17

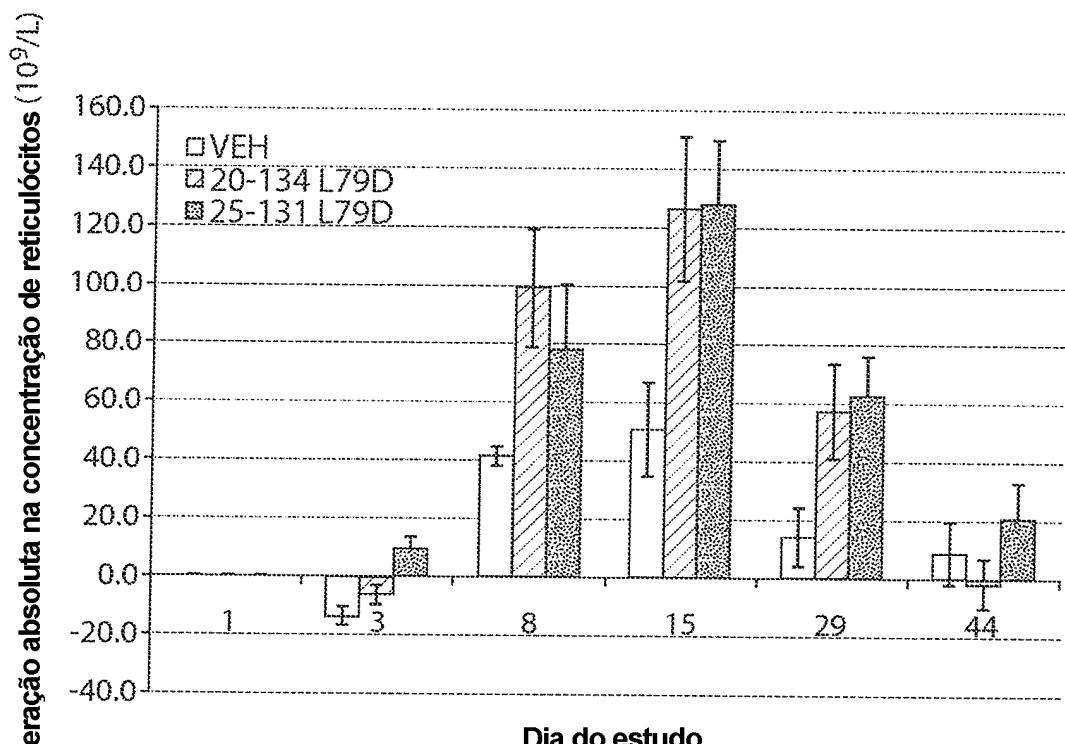


Fig. 18

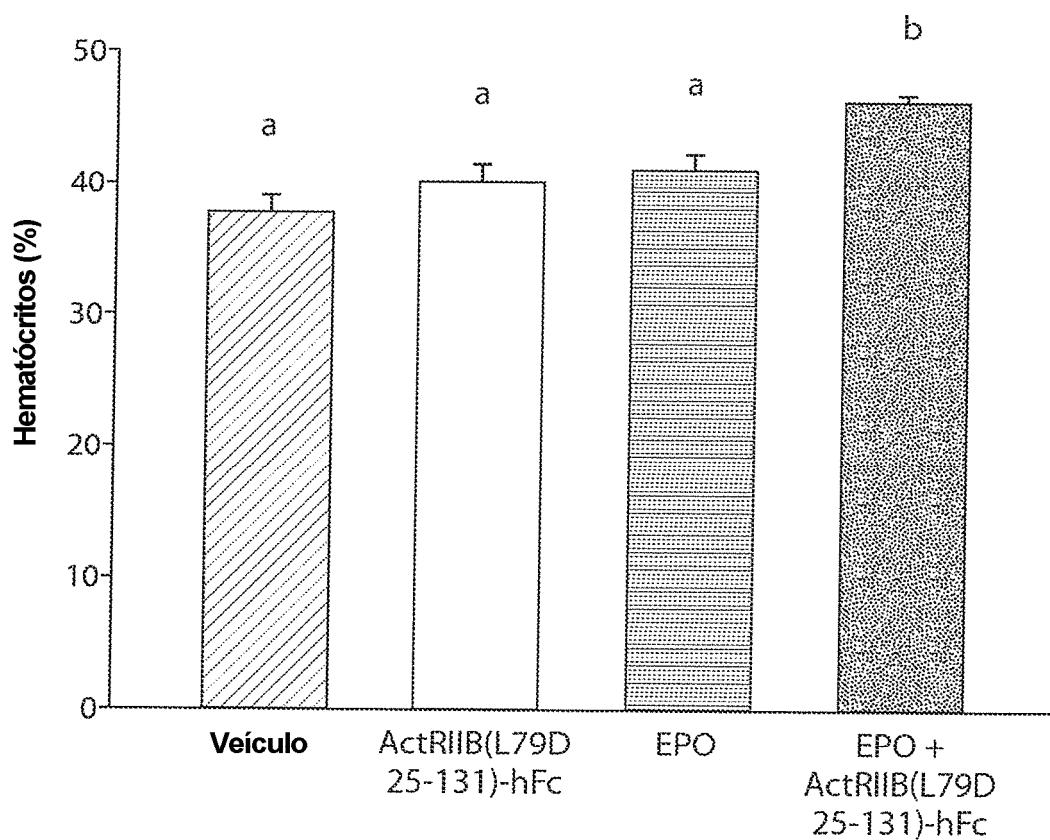


Fig. 19

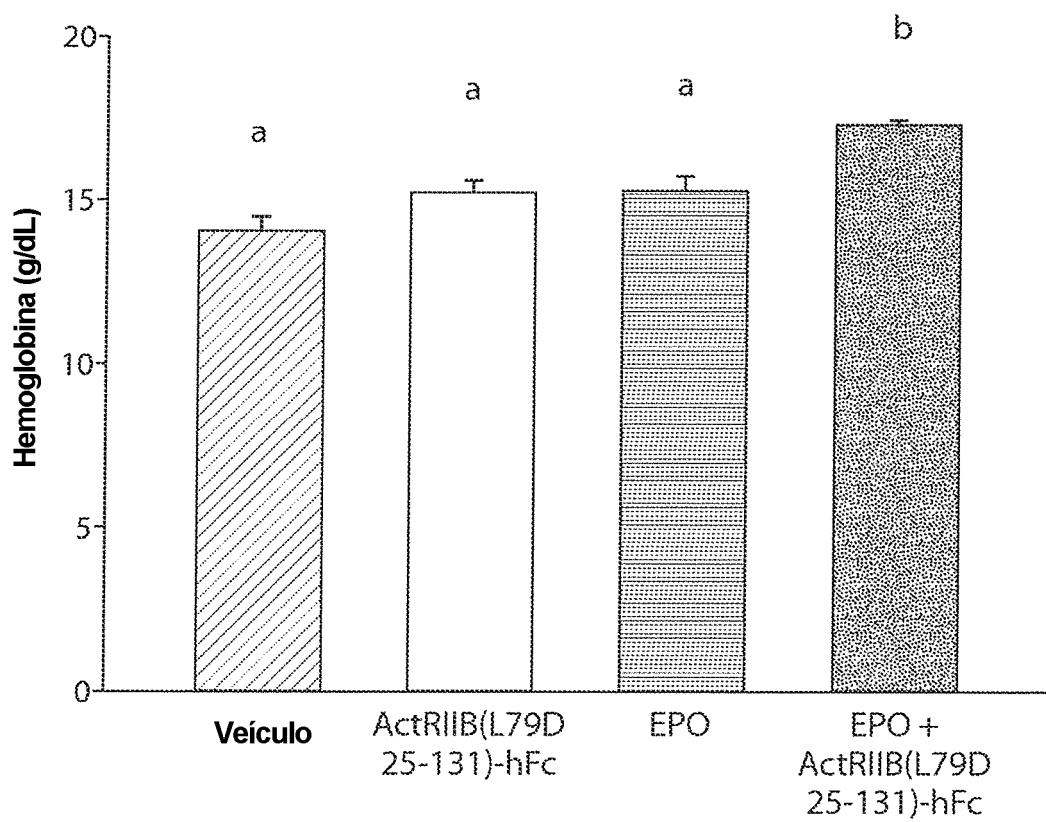


Fig. 20

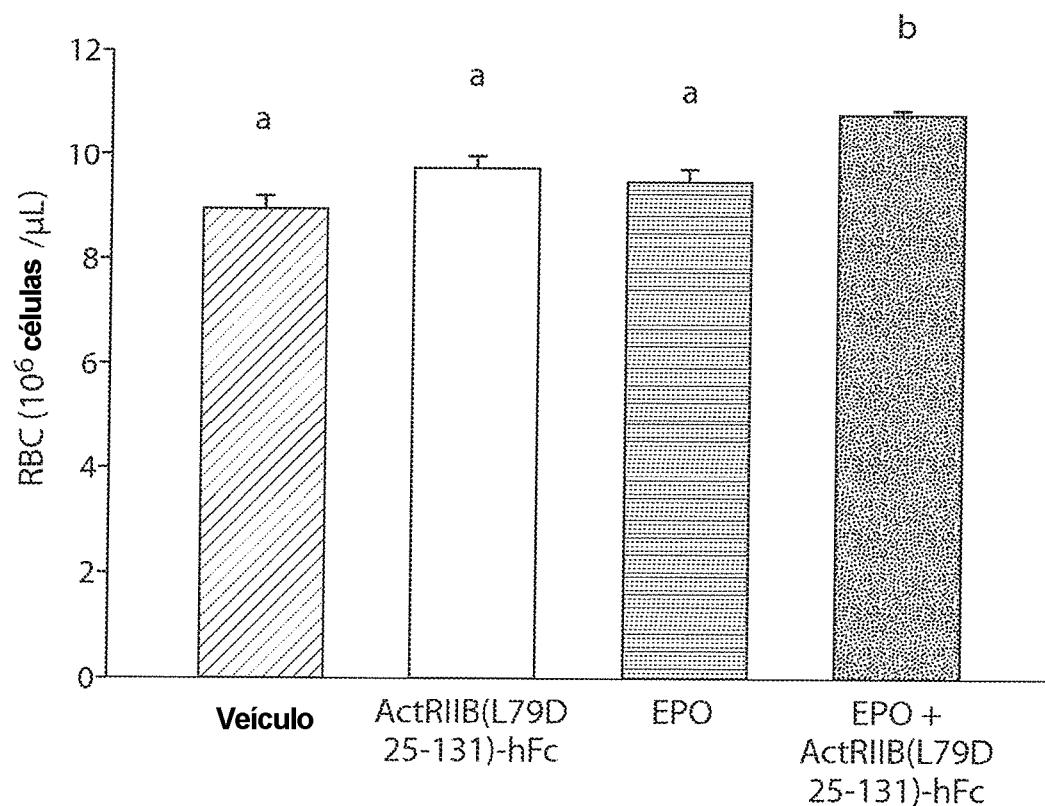


Fig. 21

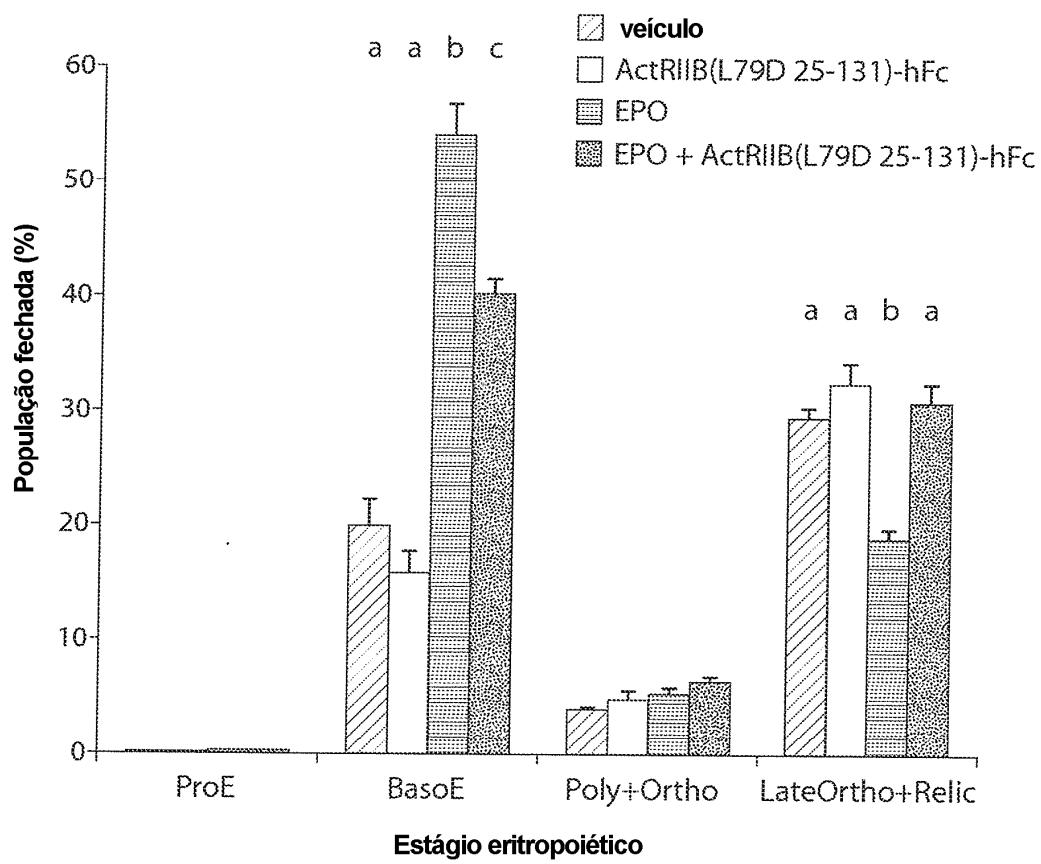


Fig. 22

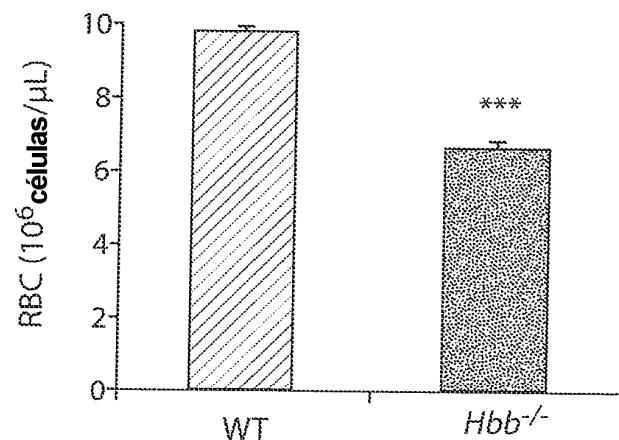


Fig. 23A

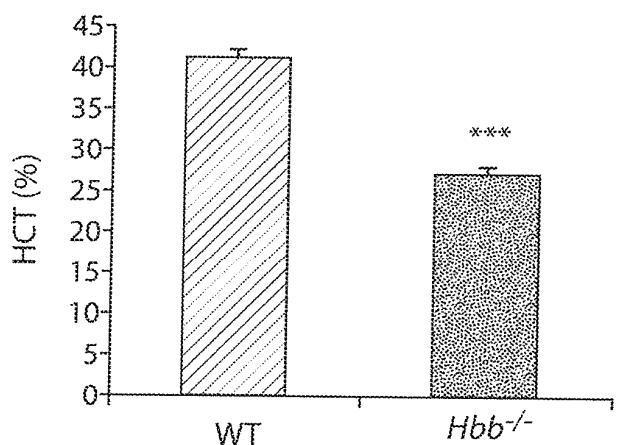


Fig. 23B

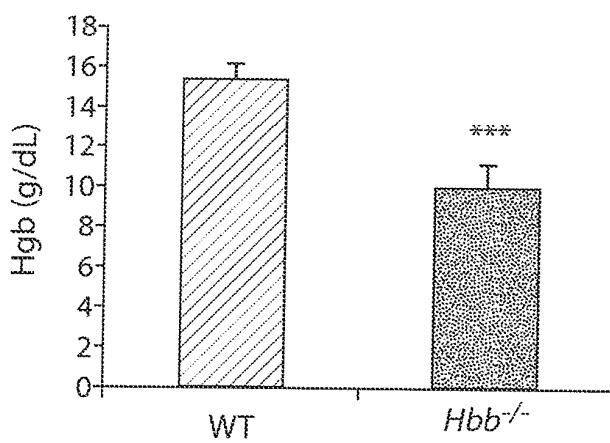


Fig. 23C

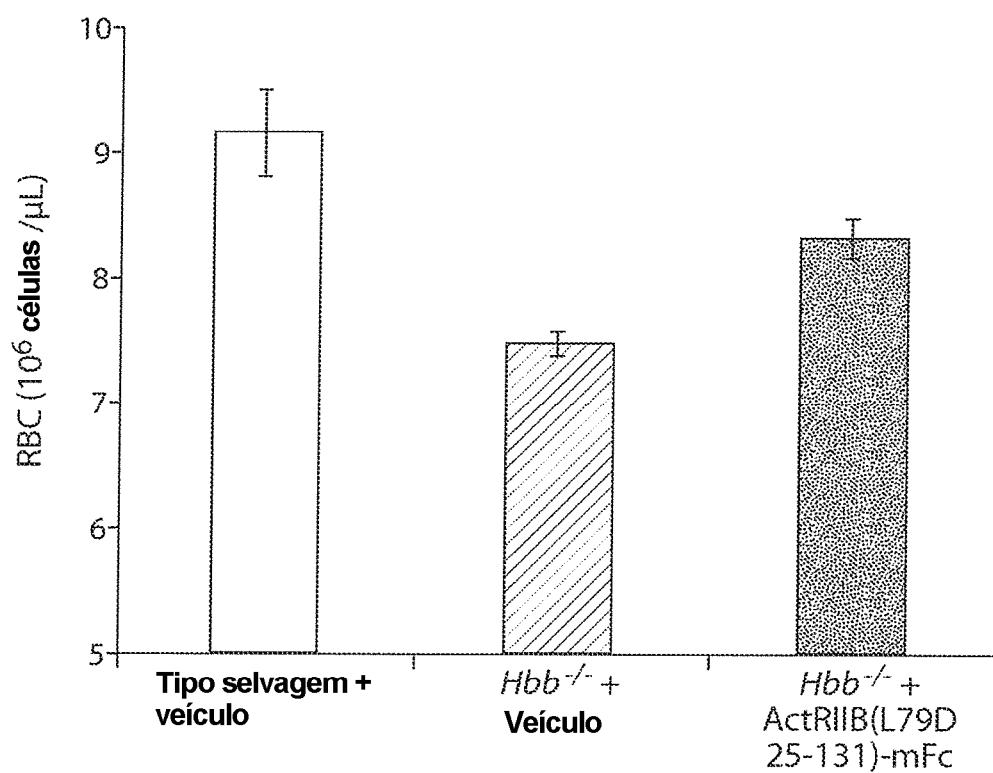


Fig. 24

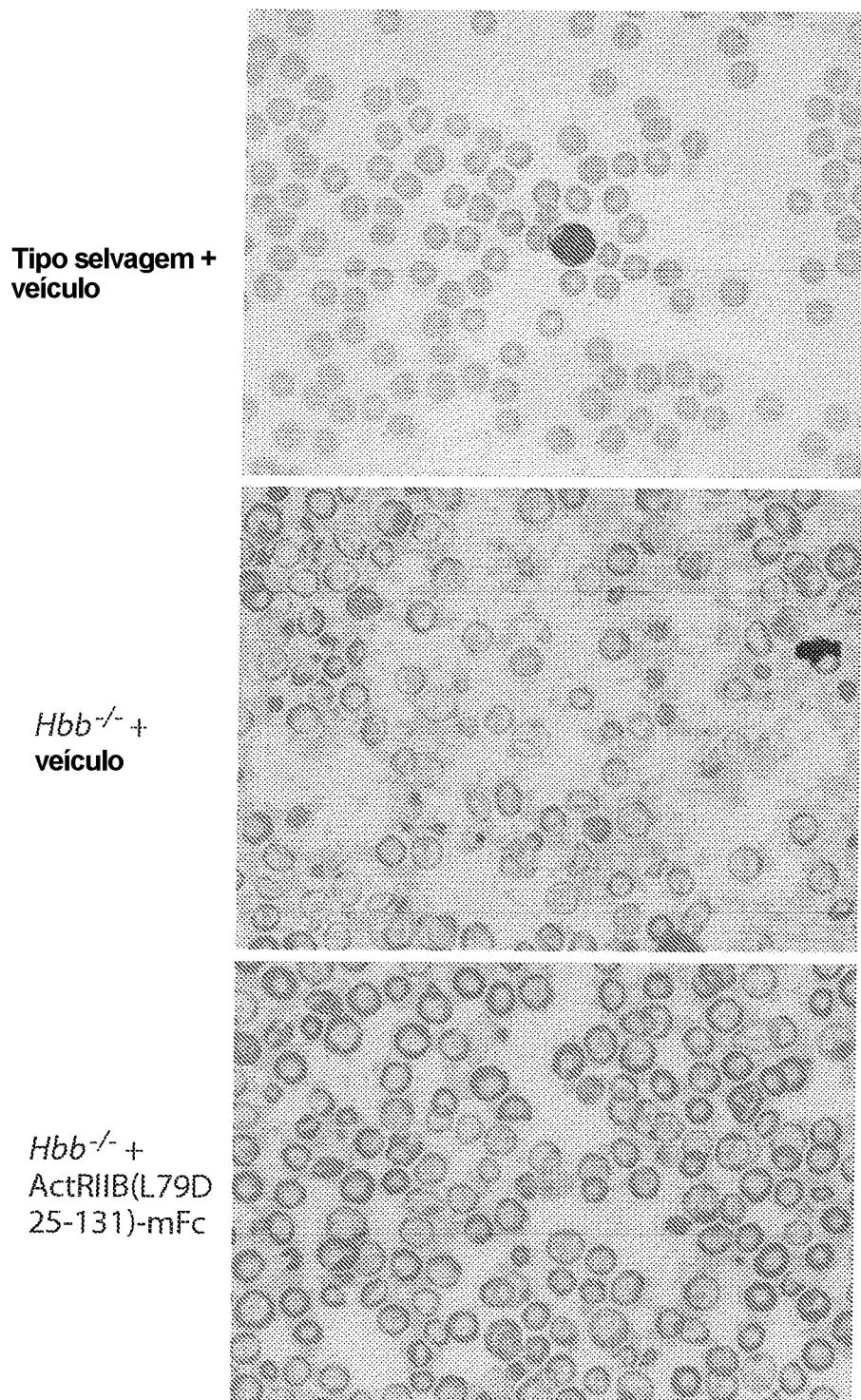


Fig. 25

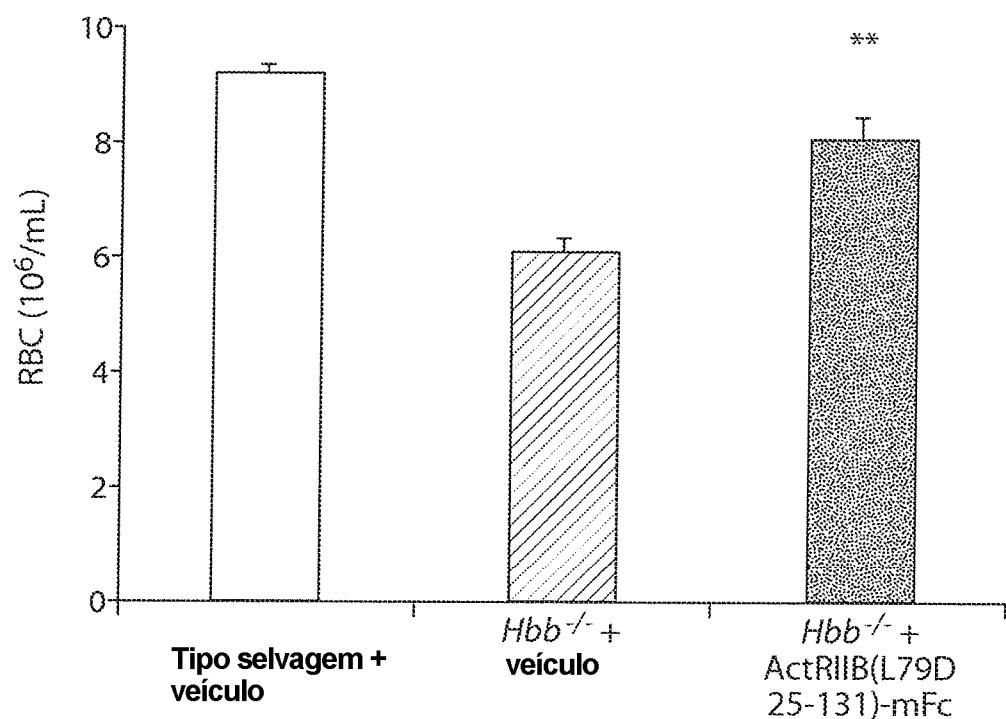


Fig. 26

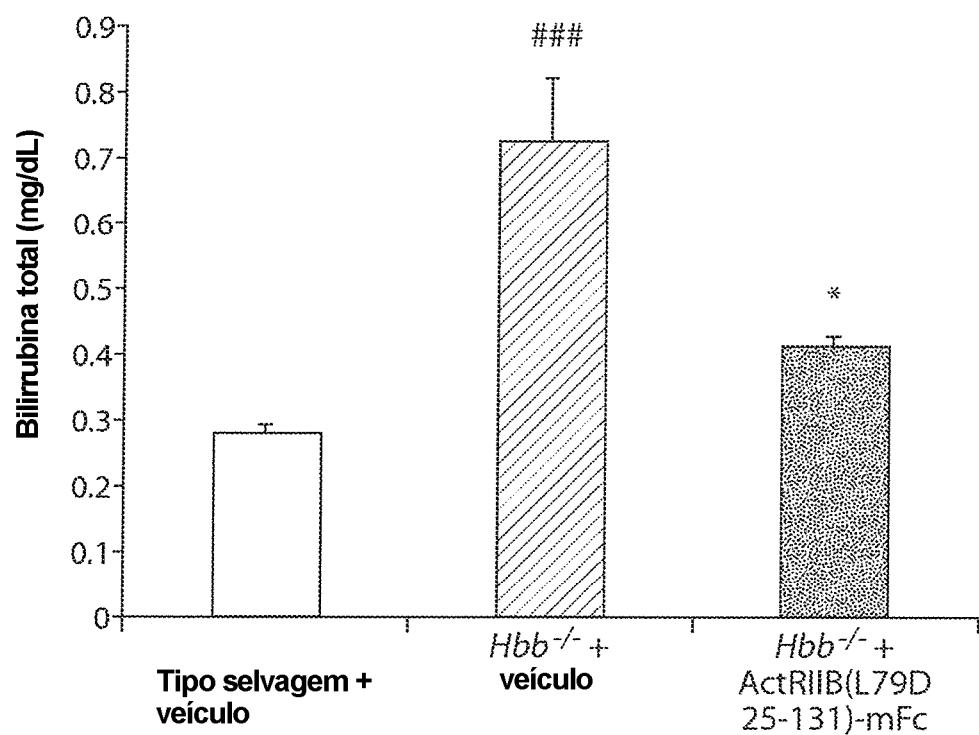


Fig. 27

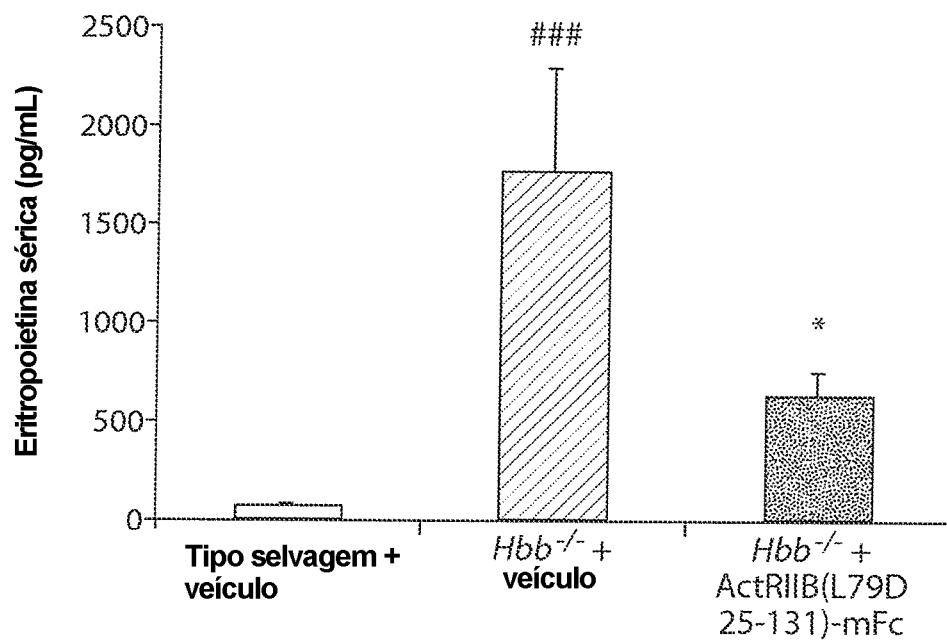


Fig. 28

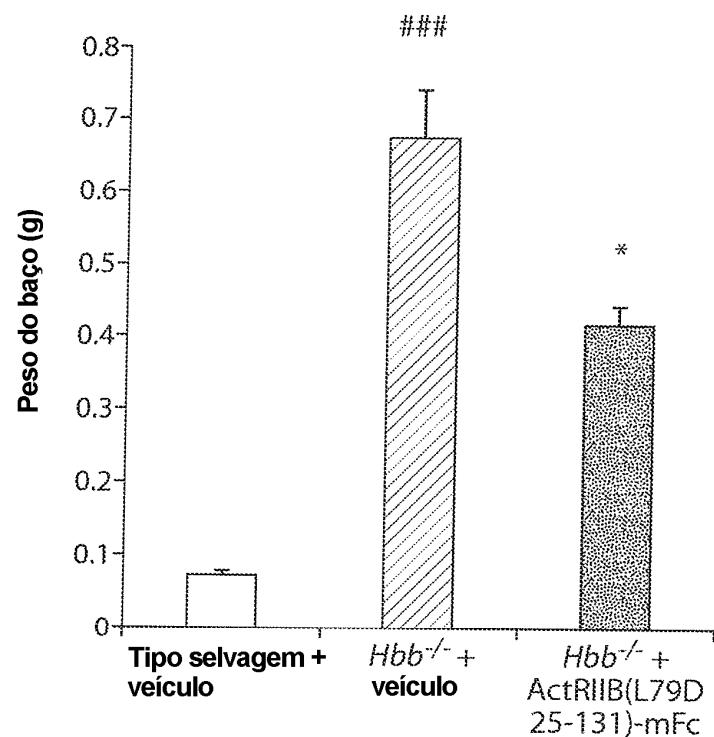


Fig. 29A

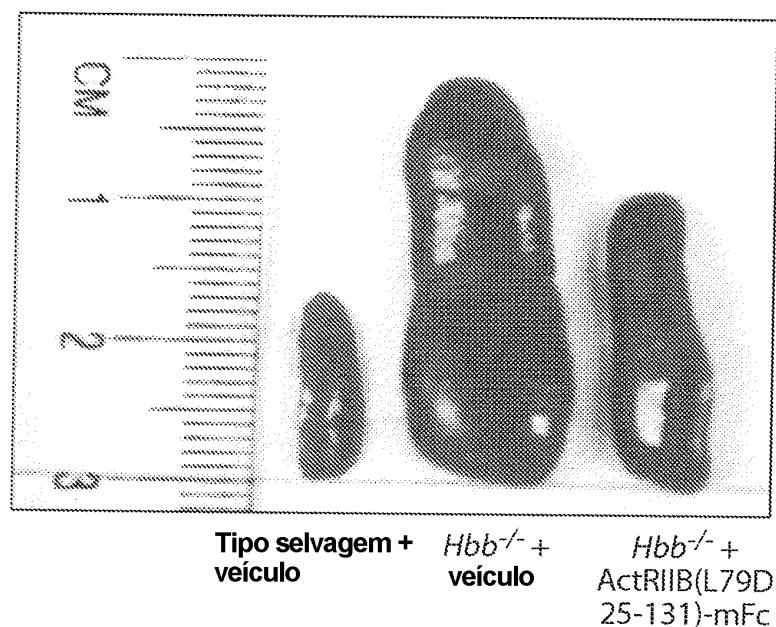


Fig. 29B

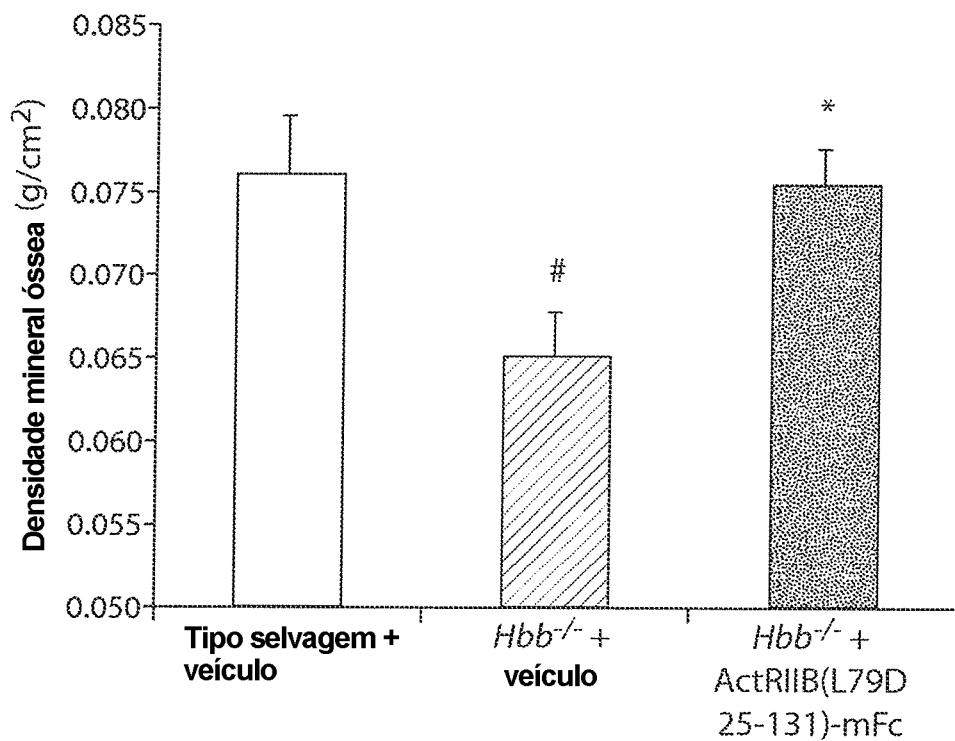
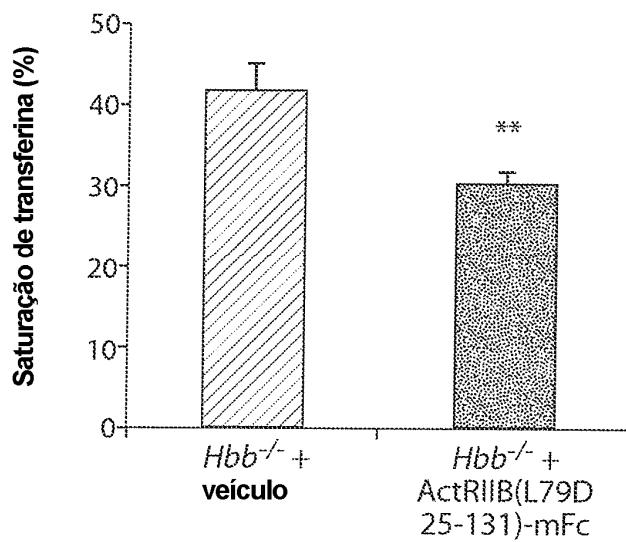
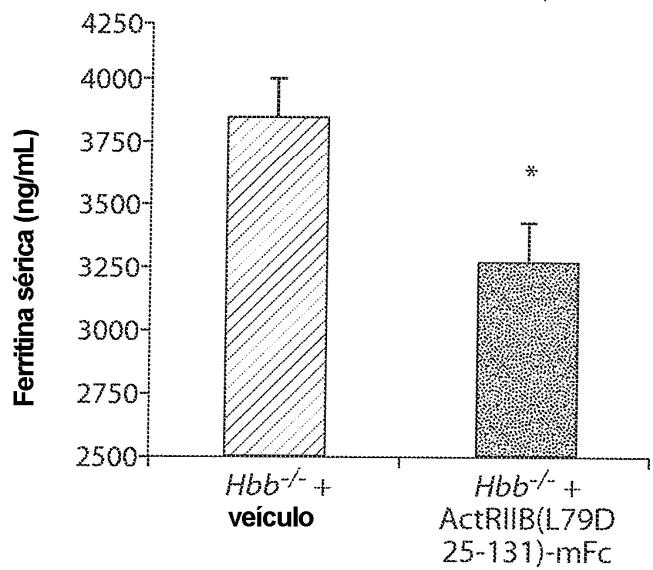
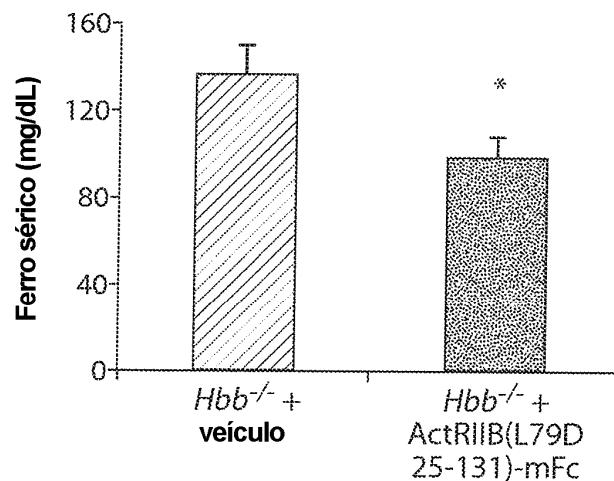


Fig. 30



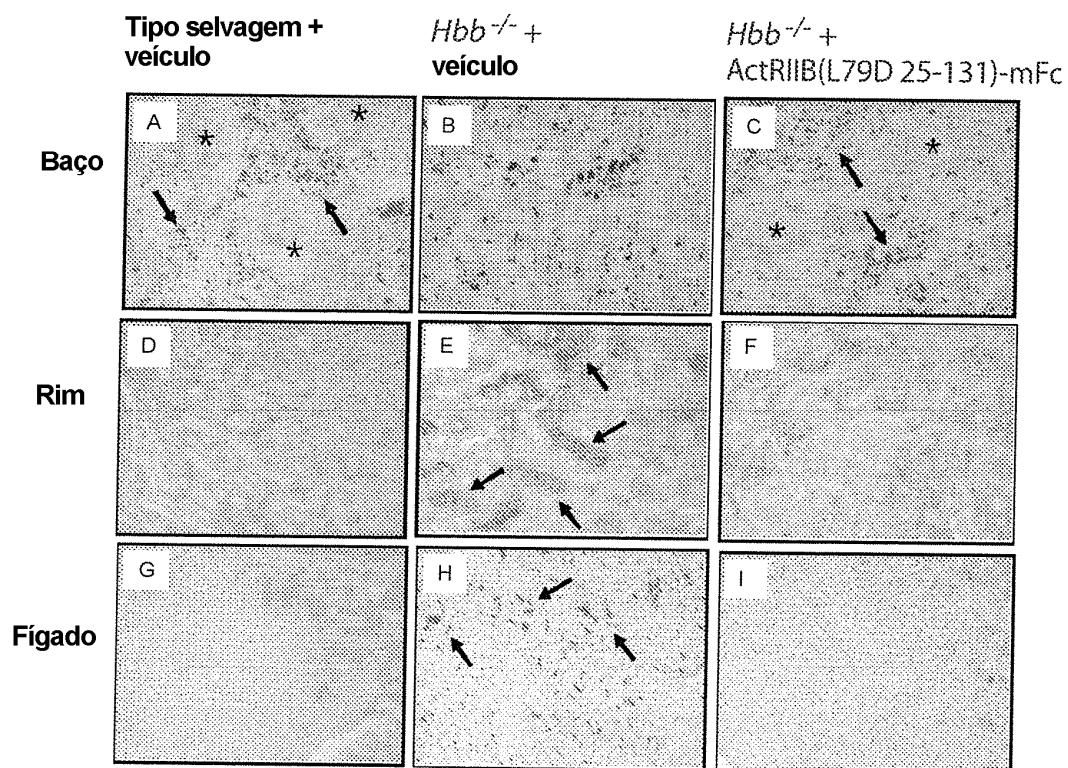


Fig. 32

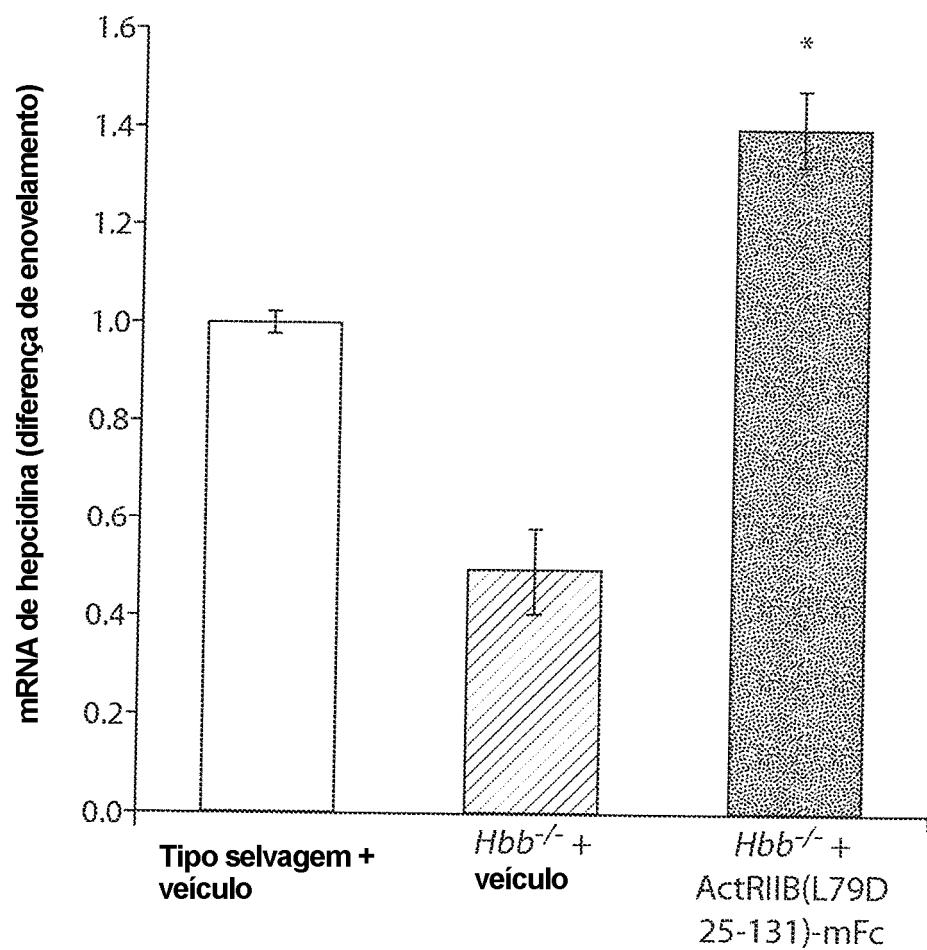


Fig. 33

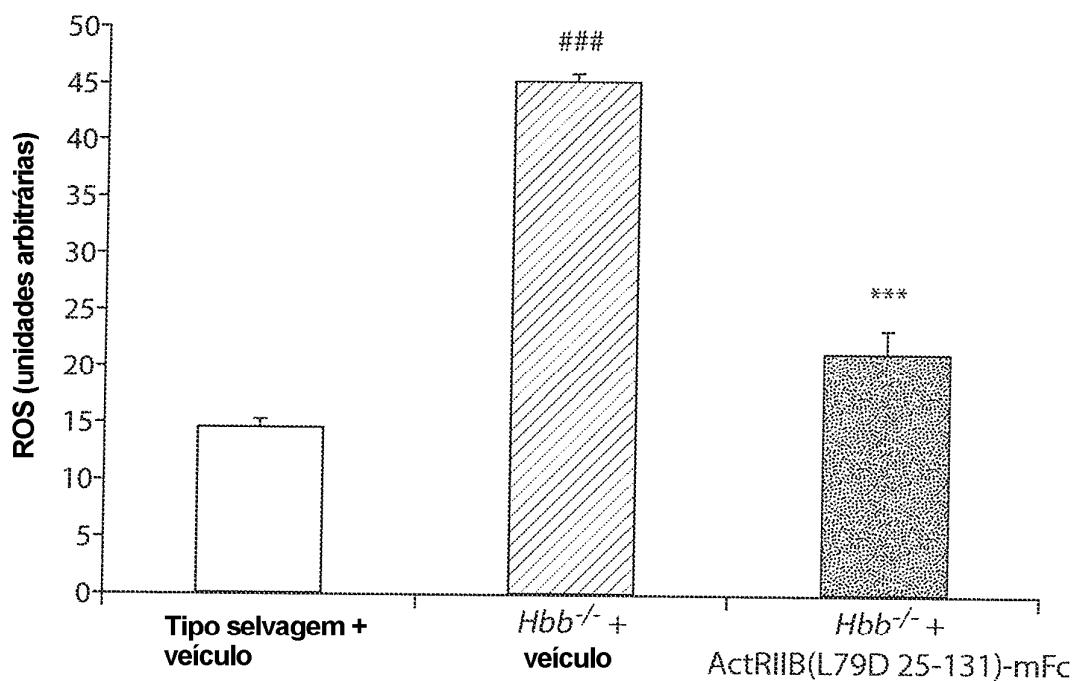


Fig. 34