

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(51) Classificação Internacional:

C07K 14/65 (2015.01) **C07K 19/00** (2015.01)

A61K 38/29 (2015.01) **A61P 21/00** (2015.01)

A61P 3/10 (2015.01) **A61K 38/30** (2015.01)

A61K 38/00 (2015.01)

(22) Data de pedido: **2006.01.06**

(30) Prioridade(s): **2005.01.07 US 642229 P**
2005.02.25 US 656583 P

(43) Data de publicação do pedido: **2010.10.20**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.06.24**
181/2015

(73) Titular(es):

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
777 OLD SAW MILL RIVER ROAD TARRYTOWN,
NY 10591 **US**

(72) Inventor(es):

GEORGE D. YANCOPOULOS **US**
THOMAS J. DALY **US**
NICHOLAS J. PAPADOPOULOS **US**
DAVID J. GLASS **US**

(74) Mandatário:

JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **POLIPÉPTIDOS DE FUSÃO QUE CONTÊM O IGF-1 E UTILIZAÇÕES TERAPÊUTICAS DESSES POLIPÉPTIDOS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO DIZ RESPEITO A UMA PROTEÍNA DE FUSÃO QUE COMPREENDE PELO MENOS UM COMPONENTE VARIANTE (ζ VARIANT ζ DO IGF1 E UM COMPONENTE DE FUSÃO (F), E, FACULTATIVAMENTE UMA SEQUÊNCIA DE SINAL, EXIBINDO ESTABILIDADE MELHORADA RELATIVA AO POLIPÉPTIDO IGF1 OU IGF2 NATIVO. O COMPONENTE DE FUSÃO (F) PODE SER UM COMPONENTE RESPONSÁVEL PELA MULTIMERIZAÇÃO, UM LIGANDO DE ζ TARGETING ζ (CONDUÇÃO ATÉ AO ALVO), OU UM OUTRO COMPOSTO ACTIVO OU TERAPÊUTICO. AS VARIANTES DO IGF1 DEMONSTRARAM POSSUIR MAIOR CAPACIDADE PARA INDUZIR HIPERTROFIA DA MUSCULATURA ESQUELÉTICA RELACIONADA COM O IGF1 NATIVO.

DESCRIÇÃO

"POLIPÉPTIDOS DE FUSÃO QUE CONTÊM O IGF-1 E UTILIZAÇÕES TERAPÊUTICAS DESSES POLIPÉPTIDOS"

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Campo da Invenção

A presente descrição diz respeito aos polipéptidos factor 1 de crescimento análogo à insulina [(IGF1) *insulin-like growth factor 1*] e factor 2 de crescimento análogo à insulina [(IGF2) *insulin-like growth factor 2*], processos de produção desses polipéptidos, e métodos terapêuticos para a administração desses polipéptidos.

Descrição da Arte Relacionada

Os factores de crescimento análogos à insulina (IGFs) constituem uma família de proteínas que possuem propriedades análogas às da insulina e estimuladoras do crescimento. Os IGFs mostram homologia estrutural similar à da pró-insulina e provocam efeitos biológicos semelhantes. O IGF1 humano (também conhecido por somatomedina C) é um péptido básico com 70 aminoácidos (pI 8,4) que compreende as sequências das proteínas e do DNA apresentadas na SEQ ID NOs: 1-2, e apresenta uma homologia de 43% com a pró-insulina (Rinderknecht *et al.* (1978) J. Biol Chem 253:2769-2776). O IGF2 humano é um péptido básico com 67 aminoácidos que compreende as sequências das proteínas e do DNA apresentadas na SEQ ID NOs: 3-4. As proteínas de ligação específicas de alto peso molecular que revelam capacidade de ligação realmente elevada ao IGF1 e ao IGF2 actuam como proteínas de

transporte ou como moduladores das funções do IGF1 (Holly et al. (1989) J. Endocrinol. 122:611-618).

Os IGF1 e IGF2 e suas variantes têm-se utilizado para tratar seres humanos que sofrem de deficiência de hormona do crescimento, perda de tecidos ("*tissue wasting*") incluindo queimaduras, traumatismo esquelético, infecção, cancro, fibrose quística, distrofia muscular de Duchenne, distrofia de Becker, distrofia autossómica recessiva, polimiosite, bem como miopatias e SIDA (Patente de invenção norte-americana N^o 5 622 932).

O âmbito da presente invenção é definido pelas reivindicações e qualquer informação que não seja abrangida por essas reivindicações é fornecida apenas para fins informativos.

RESUMO DA INVENÇÃO

Descrita(o)s na presente invenção encontram-se composições e processos que permitem dispensar moléculas de variantes de IGF1 e de IGF2 a um paciente que delas necessite. Mais especificamente descritos na presente invenção encontram-se polipéptidos de fusão que compreendem variantes terapêuticas de IGF1 ou de IGF2 ou seus análogos fundidos em um componente de fusão (F). A presente invenção fornece uma proteína de fusão, que compreende: (a) pelo menos um componente polipeptídico variante do IGF1; e (b) um componente de fusão que compreende o domínio Fc da IgG humana; em que o componente variante do IGF é uma proteína IGF-1 humana de SEQ ID NO:1 compreendendo: (i) uma deleção de aminoácidos nas posições 1-3, 37 e 68-70 (Δ 1-3, Δ 37, Δ 68-70) ou (ii) uma deleção de aminoácidos nas posições 1-3, 37 e 65-

-70 ($\Delta 1-3$, $\Delta 37$, $\Delta 65-70$). Os polipéptidos de fusão da presente invenção são capazes de permanecer activos sob o ponto de vista terapêutico e disponíveis durante um período de tempo maior do que a molécula que ocorre naturalmente e resistirem à desactivação através de uma proteína de ligação ao IGF. Os polipéptidos de fusão da presente invenção podem também utilizar-se em diversos ensaios de diagnóstico e de prognóstico *in vitro* e *in vivo*.

Também descrito na presente invenção apresenta-se um polipéptido de fusão IGF1, que compreende (a) pelo menos um componente variante do IGF1, (b) um componente de fusão (F), e facultativamente, (c) uma sequência de sinal, em que o componente variante do IGF é a proteína humana do IGF1 de SEQ ID NO:1 que compreende (i) uma modificação do C-terminal escolhida no grupo constituído por deleção de 3 a 6 aminoácidos, por exemplo, 68-70 ($\Delta 68-70$), $\Delta 67-70$, $\Delta 66-70$, $\Delta 65-70$, deleção de Lys68 ($\Delta 68$), substituição do aminoácido 68 por um outro aminoácido, deleção dos aminoácidos 65 a 70 ($\Delta 65-70$), deleção de Lys65 ($\Delta 65$), e substituição do aminoácido 65 por um outro aminoácido; (ii) uma modificação do N-terminal escolhida no grupo constituído por deleção dos aminoácidos 1 a 3 ($\Delta 1-3$) e substituição de Glu3 por um aminoácido diferente, e/ou (iii) uma modificação em Arg36 e/ou Arg37 escolhida no grupo constituído por deleção de Arg36 ($\Delta 36$), deleção de Arg 37 ($\Delta 37$), substituição de Arg36 por um aminoácido diferente, por exemplo, Arg36Ala, e substituição de Arg37 por um aminoácido diferente, por exemplo, Arg37Ala. Em uma forma de realização específica, a proteína de fusão que comporta IGF1 apresenta uma deleção dos aminoácidos 1 a 3 e de Arg37 (2D-IGF1-Fc) ($\Delta 1-3$, $\Delta \text{Arg}37$). Em uma outra forma de realização específica, a proteína de fusão

que comporta IGF1 apresenta uma deleção de aminoácidos 1 a 3, Arg37 e aminoácidos 68 a 70 (3D-IGF1-FC) ($\Delta 1-3$, $\Delta \text{Arg}37$, $\Delta 68-70$).

A presente invenção descreve igualmente um polipéptido de fusão que comporta IGF2, que compreende (a) pelo menos um componente variante do IGF2, (b) um componente de fusão (F), e facultativamente, (c) uma sequência de sinal, em que o componente variante do IGF é a proteína humana do IGF2 de SEQ ID NO:3 que compreende (i) uma modificação do C-terminal escolhida no grupo constituído por deleção de 3 aminoácidos, por exemplo, 65-67 ($\Delta 65-67$), deleção de Lys65 ($\Delta 65$), e substituição do aminoácido 65 por um outro aminoácido; (ii) uma modificação do N-terminal escolhida no grupo constituído pela deleção dos aminoácidos 1 a 6 ($\Delta 1-6$) e substituição da Glu6 por um aminoácido diferente, e/ou (iii) uma modificação em Arg37 e/ou Arg38 escolhida no grupo constituído pela deleção da Arg37 ($\Delta 37$), deleção da Arg 38 ($\Delta 38$), substituição da Arg37 por um aminoácido diferente, por exemplo, Arg37Ala, e substituição da Arg38 por um aminoácido diferente, por exemplo, Arg38Ala.

O componente de fusão (F) descrito na presente invenção é um qualquer componente que intensifica a funcionalidade do polipéptido de fusão. Assim, por exemplo, um F pode potenciar a actividade biológica do polipéptido de fusão, ajudar na sua produção e/ou no seu restabelecimento (*recovery*), ou intensificar uma propriedade farmacológica ou o perfil farmacocinético do polipéptido de fusão mediante, por exemplo, o aumento da sua semivida sérica, penetrabilidade nos tecidos, ausência de imunogenicidade, ou estabilidade. O componente de fusão pode permitir ao componente variante do IGF evitar as proteínas de ligação ao soro que podem

sequestrar o IGF em um compartimento menos activo sob o ponto de vista biológico.

Em aspectos preferidos descritos na presente invenção, F é um componente de multimerização do grupo constituído por (i) uma sequência de aminoácidos entre 1 e cerca de 500 aminoácidos de comprimento, que compreende facultativamente pelo menos um resto de cisteína, (ii) um zíper de leucina ("*leucine zipper*"), (iii) um motivo *helix-loop* ("*helix loop motif*"), (iv) um motivo *coiled-coil* ("*coil-coil motif*"), e (v) um domínio de imunoglobulina. O componente de fusão pode incluir um domínio derivado de uma imunoglobulina, por exemplo, IgG, IgM ou IgA humana. Em formas de realização específicas, escolhe-se o domínio derivado da imunoglobulina no grupo constituído pelo domínio Fc e a cadeia pesada da IgG. O domínio Fc da IgG pode escolher-se entre os isotipos IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, assim como qualquer alotipo dentro de cada grupo de isotipos.

Descrito ainda na presente invenção encontra-se um polipéptido de fusão que comporta o IGF1, que consiste em (i) um componente variante do IGF1 que inclui a proteína do IGF1 humano de SEQ ID NO:1 que compreende a deleção dos aminoácidos 1 a 3 (Δ 1-3 ou delGPE), deleção da Arg36 (Δ 36), e uma deleção de 3 a 6 aminoácidos no C-terminal (Δ 68-70), (ii) um domínio Fc de uma IgG, e facultativamente, (iii) uma sequência de sinal.

Um outro aspecto descrito na presente invenção representa um polipéptido de fusão que comporta IGF2, que consiste em (i) um componente variante do IGF2 que inclui a proteína humana IGF2 de SEQ ID NO:3 que compreende a deleção dos aminoácidos 1 a 6 (Δ 1-6 ou delAYRPSE), a deleção da Arg37

($\Delta 37$), e uma deleção de 3 aminoácidos no C-terminal ($\Delta 65-67$), (ii) um domínio Fc de uma IgG, e facultativamente, (iii) uma sequência de sinal.

Em outros aspectos descritos na presente invenção, o componente de fusão (F) é um ligando de "targeting" (condução até ao alvo), ou um seu derivado ou fragmento, capaz de se ligar especificamente a uma proteína pré-selecionada da superfície celular, administrando assim o mencionado IGF1 ou IGF2 a uma célula-alvo, por exemplo, uma célula muscular. Em formas de realização específicas, o componente de "targeting" é o ligando MuSK, ou um fragmento do ligando MuSK capaz de se ligar ao receptor do ligando MuSK. Em formas de realização específicas, o ligando específico de MuSK é uma agrina ou um seu fragmento ou derivado capaz de se ligar a MuSK, ou um anticorpo anti-MuSK ou um seu fragmento ou derivado, incluindo, por exemplo, um scFv. Em outras formas de realização específicas, o ligando de "targeting" ao músculo do polipéptido de fusão de "targeting" ao músculo compreende três ou mais domínios extracelulares de proteínas caderinas como caderinas musculares (M-caderina), ou seus derivados ou fragmentos, capazes de se ligarem especificamente a células musculares ou outras células que expressem caderinas musculares homofílicas. Em uma forma de realização específica, o ligando de "targeting" ao músculo é constituído essencialmente pelos três (3) ou quatro (4) primeiros domínios extracelulares dos N-terminais da M-caderina.

Em outros aspectos descritos na presente invenção, o componente de fusão (F) de acordo com a presente invenção é um outro composto activo, que pode ser qualquer agente que se deseje administrar em um local pré-seleccionado para fins terapêuticos. O agente activo ou terapêutico é um ligando

para um segundo receptor da superfície celular, e é capaz de se ligar e de activar um segundo receptor. O agente activo ou terapêutico é um agente capaz de bloquear a actividade de um outro agente que está activo na célula-alvo. O agente activo ou terapêutico é escolhido no grupo constituído por IL-15, miotrofina, urocortina, urocortina II, um IGF1 ou IGF2 natural ou mutante, insulina, o pró-domínio de miostatina, hGH, proliferina, folistatina, FSTL1, e FLRG, e seus fragmentos activos sob o ponto de vista biológico.

O polipéptido ou polipéptido de fusão da presente invenção pode ainda codificar facultativamente um constituinte sequência de sinal (SS). Quando uma SS faz parte do polipéptido, pode utilizar-se qualquer SS conhecida na arte, incluindo sequências sintéticas ou naturais provenientes de qualquer fonte, por exemplo, de uma proteína segregada ou ligada à membrana. Geralmente, uma sequência de sinal é colocada no início ou amino-terminal do polipéptido de fusão da presente invenção.

Os componentes dos polipéptidos de fusão da presente invenção podem ligar-se directamente uns aos outros ou ligarem-se através de uma ou mais sequências espaçadoras. Em uma forma de realização preferida, os componentes fundem-se directamente uns com os outros. Em uma outra forma de realização preferida, os componentes unem-se com um espaçador de 1 a 200 aminoácido(s). Para ligar os componentes polipeptídicos pode utilizar-se qualquer espaçador conhecido na arte. Uma sequência espaçadora pode também incluir uma sequência utilizada para aumentar a expressão do polipéptido de fusão, preparar sítios de restrição, permitir que os domínios dos componentes formem estruturas terciárias e quaternárias perfeitas e/ou melhorar a interacção de um

componente com o seu receptor. Em uma forma de realização, o polipéptido de fusão da presente invenção compreende uma ou mais sequências peptídicas entre um ou mais componente(s) que consiste (consistem) entre 1 a 25 aminoácido(s).

Os componentes dos polipéptidos de fusão da presente invenção podem dispor-se em diversas configurações e podem incluir mais do que um polipéptido variante do IGF, por exemplo, IGF-F; IGF-IGF-F; IGF-F-IGF; F-IGF; F-IGF-IGF, etc. No entanto, quando F representa uma Fc, essa Fc deve ocorrer no C-terminal do polipéptido de fusão. Da mesma forma, em fusões que compreendem um segundo componente activo, como hormona do crescimento humana (hGH), a configuração deve ser variante do IGF-hGH.

Em um segundo aspecto, a presente invenção exhibe um ácido nucleico que codifica um polipéptido de fusão de acordo com a presente invenção.

Em um terceiro aspecto, a presente invenção exhibe um vector que compreende uma molécula de ácido nucleico de acordo com a presente invenção. Em outros quarto e quinto aspectos, a presente invenção engloba vectores que compreendem moléculas de ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção, incluindo vectores de expressão que compreendem as moléculas dos ácidos nucleicos ligados de um modo eficiente a uma sequência de controle de expressão, e sistemas hospedeiro-vector para a produção de um polipéptido de fusão que inclui o vector de expressão, em uma célula hospedeira adequada; sistemas hospedeiro-vector em que a célula hospedeira adequada é, sem limitação, uma célula bacteriana, de levedura, de insecto, ou de mamífero. Exemplos de células adequadas incluem células de *E. coli*, *B. subtilis*,

BHK, COS e CHO. Além disso são englobados polipéptidos de fusão da presente invenção modificados por acetilação ou PEGuilação. Na arte conhecem-se bem processos para acetilação ou PEGuilação de uma proteína.

Em um sexto aspecto relacionado, a presente invenção apresenta um processo de produção de um polipéptido de fusão de acordo com a presente invenção, que consiste em cultivar uma célula hospedeira transfectada com um vector que compreende uma molécula de ácido nucleico de acordo com a presente invenção, sob condições adequadas para a expressão da proteína proveniente da célula hospedeira, e recuperação do polipéptido assim produzido.

Em um sétimo aspecto, a presente invenção proporciona uma proteína de fusão de acordo com a mesma invenção para utilização em um método de tratamento do corpo humano ou de outro animal. A presente invenção fornece ainda uma proteína de fusão para utilização em um método terapêutico para o tratamento de uma doença ou afecção escolhida entre atrofia muscular, nanismo, infarto do miocárdio, osteoporose, fraqueza ou fragilidade relacionada com a idade, sarcopénia, uma doença ou afecção que implique perda de massa corporal, caquécia, insuficiência cardíaca congestiva, talassémia, diabetes, hiperglicémia e anemia, ou para o tratamento de um paciente em risco de desenvolver essa doença ou afecção. A presente invenção fornece adicionalmente a utilização de uma proteína de fusão de acordo com a mesma invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença ou afecção escolhida entre atrofia muscular, nanismo, infarto do miocárdio, osteoporose, fraqueza ou fragilidade relacionada com a idade, sarcopénia, uma doença ou afecção que implique perda de massa corporal, caquécia, insuficiência

cardíaca congestiva, talassémia, diabetes, hiperglicémia e anemia, ou para o tratamento de um paciente em risco de desenvolver essa doença ou afecção. Na presente invenção descrevem-se também métodos terapêuticos para o tratamento de uma doença ou afecção, que consistem em administrar uma quantidade eficaz sob o ponto de vista terapêutico da proteína de fusão que comporta um IGF de acordo com a presente invenção a um paciente que dela necessite, ou a um paciente em risco de desenvolver essa doença ou afecção. Quando a doença ou afecção é muscular, como atrofia, o método terapêutico descrito na presente invenção consiste na administração de uma quantidade eficaz sob o ponto de vista terapêutico de uma proteína de fusão que comporta um IGF de acordo com a presente invenção a um paciente que dela necessite, em que a doença ou afecção relacionada com os músculos melhora ou é inibida. A afecção ou doença tratada relacionada com os músculos pode ter origem em uma série de fontes, incluindo, por exemplo: desnervação; neuropatia metabólica ou inflamatória, degenerativa; atrofias musculares espinhais infantis e juvenis; neuropatia motora auto-imunitária; em doenças crônicas, incluindo caquécia resultante de cancro, SIDA, jejum ou rabdomiólise; e em síndromes de distrofia muscular como a de Duchenne. Os métodos terapêuticos descritos na presente invenção são úteis para tratar qualquer afecção que seja consequência de uma deficiência de um IGF ou que possa melhorar através de níveis crescentes de um IGF, incluindo nanismo e doença cardíaca, por exemplo, melhor sobrevivência dos tecidos cardíacos após infarto do miocárdio.

Assim, em um oitavo aspecto, a presente invenção apresenta composições farmacêuticas que compreendem uma proteína de fusão de acordo com a presente invenção com um

veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico. As composições farmacêuticas descritas na presente invenção podem incluir proteínas de fusão ou ácidos nucleicos que as codificam, juntamente com um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

Outros objectivos e outras vantagens tornar-se-ão evidentes a partir de uma revisão da seguinte descrição detalhada.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Fig. 1 representa um gráfico que mostra a concentração sérica da variante 2D-IGF1-Fc (□) ou 3D-IGF1-Fc (■) do IGF1 em murganhos CD-1 às 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas (n = 5 por grupo) (Média ± SEM).

DESCRIÇÃO DETALHADA

Quando utilizadas nesta descrição detalhada e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um", "uma" ("a", "an") e "o", "a" ("the") incluem referências plurais a menos que o contexto claramente imponha de outro modo. Assim por exemplo, referências a "um método" incluem um(a) ou mais processo(s), e/ou fase(s) do tipo descrito na presente invenção e/ou que se tornarão evidentes para os peritos na especialidade após a leitura dessa descrição e assim por diante.

Salvo indicação em contrário, todos os termos técnicos e científicos utilizados na presente invenção apresentam o mesmo significado como comumente entendido por qualquer perito experiente na arte à qual pertence a presente

invenção. Embora se possam utilizar na prática ou em ensaios da presente invenção quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes aos descritos na mesma invenção, os métodos e materiais preferidos descrevem-se seguidamente.

Descrição Geral

A presente descrição engloba polipéptidos de fusão e ácidos nucleicos que os codificam que compreendem um ou mais componente(s) variante(s) do IGF e um componente de fusão (F), que pode incluir um componente de multimerização, um componente de "*targeting*", e/ou um ou mais agente(s) activo(s) ou terapêutico(s) adicional(ais).

Definições

Os fragmentos ou derivados "activos sob o ponto de vista biológico" de um componente dos polipéptidos de fusão de acordo com a presente invenção englobam qualquer molécula que ocorra naturalmente, ou seus mutantes ou derivados capazes de obter o efeito desejado no sítio alvo. Por exemplo, descritas na presente invenção encontram-se variantes do IGF1, que apresentam propriedades melhoradas quanto à actividade e estabilidade. A presente invenção prevê a utilização de um mutante ou derivado de moléculas do IGF1 descritas na presente invenção que são capazes de se ligarem ao receptor do IGF1. Um fragmento "activo sob o ponto de vista biológico" de derivados de qualquer componente de "*targeting*" (condução até ao alvo) é uma qualquer porção ou um seu mutante capaz de se ligar à célula alvo. Assim, por exemplo, quando o ligando de "*targeting*" é a agrina, um fragmento ou derivado activo sob o ponto de vista biológico é qualquer porção ou mutante da agrina capaz de se ligar ao receptor MuSK.

O termo "tratamento" ("*treatment*" / "*treating*"), e termos similares utilizam-se na presente invenção geralmente com a intenção de obter o efeito farmacológico e/ou fisiológico desejado. O efeito pode ser profilático, em termos de total ou parcialmente prevenir uma doença, afecção, ou seus sintomas, e/ou pode ser terapêutico em termos de uma cura parcial ou total de uma doença ou afecção e/ou efeitos adversos atribuíveis à doença ou afecção. O termo "tratamento" quando utilizado na presente invenção cobre qualquer tratamento de uma doença ou afecção de um mamífero, especialmente do homem, e inclui: (a) a prevenção da doença ou afecção ocorrer em um paciente com predisposição para essa doença ou afecção mas que ainda não foi diagnosticada; (b) a inibição da doença ou afecção, ou seja, o controlo do seu desenvolvimento, ou (c) o alívio da doença ou afecção, ou seja, a indução da regressão da doença ou afecção. A população de pacientes tratados da doença pelo processo inclui pacientes que sofrem da afecção ou doença indesejável, assim como pacientes em risco de desenvolver a afecção ou doença.

A expressão "dose eficaz sob o ponto de vista terapêutico" significa a dose que produz o efeito desejado para o qual a mesma se administra. A dose exacta dependerá da finalidade do tratamento, e será estabelecida por qualquer perito experiente na arte utilizando técnicas conhecidas (ver, por exemplo, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

Quando utilizado na presente invenção, o termo "afecção ou doença" ("*condition*" / "*disease*") engloba geralmente uma afecção de um hospedeiro mamífero, especialmente do hospedeiro homem, a qual é indesejável e/ou prejudicial para

esse hospedeiro. Assim, o tratamento de uma afecção relacionada com os músculos utilizando um polipéptido de fusão que especificamente tem como alvo os músculos esqueléticos englobará o tratamento de um mamífero, em especial, de um humano, que apresenta sintomas que reflectem activação diminuída dos receptores musculares alvo, ou que se espera que apresentem tais níveis reduzidos em resposta a uma doença, afecção ou tratamento. O tratamento de uma afecção ou doença relacionada com os músculos engloba o tratamento de um paciente humano em que aumentando a activação de um receptor muscular alvo com o polipéptido de fusão específico da presente invenção resulta a melhoria de um sintoma indesejável gerado pela afecção ou doença relacionada com os músculos. Quando utilizada na presente invenção, a expressão "afecção relacionada com os músculos" inclui também uma afecção na qual é desejável alterar, ou transitoriamente, ou a longo prazo, a activação de um receptor muscular alvo específico.

Componente Variante do IGF1 ou do IGF2

O primeiro componente dos polipéptidos descritos na presente invenção é uma variante do IGF1 ou IGF2 ("variante do IGF"). No caso do IGF1, tais variantes compreendem o IGF1 humano maduro (SEQ ID NO:1) incluindo as seguintes modificações: (i) uma deleção de 3 a 6 aminoácidos no C-terminal, por exemplo, Lys65 a Ala70; (ii) uma modificação no N-terminal escolhida no grupo constituído por deleção dos aminoácidos 1 a 3 e substituição de Glu3 por um aminoácido diferente, como uma alanina, valina, histidina ou arginina, por exemplo, Glu3Arg ou Glu3Ala, e/ou (iii) uma modificação em Arg36 e/ou Arg37 escolhida no grupo constituído por deleção de Arg36, deleção de Arg 37, substituição de Arg36

por um aminoácido diferente, por exemplo, Arg36Ala, e substituição de Arg37 por um aminoácido diferente, por exemplo, Arg37Ala.

No caso do IGF2, tais variantes incluem a proteína IGF2 humana de SEQ ID NO:3 que compreende (i) uma modificação do C-terminal escolhida no grupo constituído por deleção de 3 aminoácidos, por exemplo, 65 a 67 ($\Delta 65-67$), deleção de Lys65 ($\Delta 65$), e substituição do aminoácido 65 por um outro aminoácido; (ii) uma modificação do N-terminal escolhida no grupo constituído por deleção dos aminoácidos 1 a 6 ($\Delta 1-6$) e substituição de Glu6 por um aminoácido diferente, como alanina, valina, histidina ou arginina, por exemplo Glu6Arg ou Glu6Ala; e/ou (iii) uma modificação em Arg37 e/ou Arg38 escolhida no grupo constituído por deleção de Arg37 ($\Delta 37$), deleção de Arg 38 ($\Delta 38$), substituição de Arg37 por um aminoácido diferente, por exemplo, Arg37Ala, e substituição de Arg38 por um aminoácido diferente, por exemplo, Arg38Ala.

Tais modificações impedem a clivagem do componente de fusão na variante do IGF1 ou do IGF2, aumentando assim a sua estabilidade e semivida.

Componente Ligando de "Targeting" (condução até ao alvo)

Em alguns aspectos, o componente de fusão dos polipéptidos de fusão descritos na presente invenção é um ligando de "targeting" (condução até ao alvo). Um ligando de "targeting" é uma molécula, por exemplo, uma proteína ou um seu fragmento que se liga especificamente com alta afinidade a um alvo em uma célula pré-selecionada, tal como uma proteína de superfície como, por exemplo, um receptor que está presente em um grau muito maior no alvo celular

previamente seleccionado do que em qualquer outro tecido do corpo. Por exemplo, conforme descrito nas Patentes de invenção norte-americanas 5 814 478 e 6 413 740, o receptor MuSK é altamente específico do músculo. Assim, o ligando agrina cognato, bem como as suas porções de ligação ao MuSK constituem um exemplo de um ligando "targeting" útil como um componente de fusão nos polipéptidos de fusão descritos na presente invenção. Um outro exemplo de um ligando de "targeting" é um grupo de domínios de caderina provenientes de uma caderina humana. Assim, os domínios da caderina humana provenientes de, por exemplo, caderina muscular humana podem utilizar-se na "targeting" (condução até ao alvo) de polipéptidos de fusão descritos na presente invenção para atingir ("to target") células musculares. O componente ligando de "targeting" dos polipéptidos de fusão descritos na presente invenção podem incluir um ligando que ocorra naturalmente ou obtido por técnicas de engenharia genética, ou um seu fragmento, capaz de se ligar a uma célula alvo previamente seleccionada.

Em um outro aspecto descrito na presente invenção, o componente ligando de "targeting" dos polipéptidos de fusão de "targeting" consiste em pelo menos três, quatro ou cinco domínios de caderina muscular (M-caderina), ou seus derivados ou fragmentos, capazes de se ligarem especificamente a células alvo que expressam caderinas homofílicas. (Shimoyama *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* 273 (16): 10011-10018; Shibata *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272(8):5236-5270). Em um outro aspecto, o polipéptido de fusão descrito compreende pelo menos três domínios de caderina do domínio extracelular da M-caderina humana (ou seus fragmentos ou derivados activos sob o ponto de vista biológico que sejam capazes de se ligarem a

M-caderina homofílica), fundida ao componente variante do IGF1.

Outros exemplos de ligandos de "targeting" incluem também, mas sem carácter limitativo, anticorpos e seus fragmentos ("portions") que se ligam a uma proteína previamente seleccionada da superfície de células com alta afinidade. Por "alta afinidade" entende-se uma constante de equilíbrio de dissociação de pelo menos 10^{-7} molar, conforme determinado por processos de ensaio conhecidos na arte, por exemplo análise BiaCore. Em um aspecto, o componente ligando de "targeting" dos polipéptidos de fusão de "targeting" descritos na presente invenção podem incluir também um ou mais domínios de ligação às imunoglobulinas isolados de anticorpos gerados contra uma proteína de superfície escolhida específica de um tecido ou um receptor alvo específico de um tecido. O termo "imunoglobulina ou anticorpo" quando utilizado na presente invenção refere-se a um polipéptido de um mamífero, incluindo o homem, que compreende uma região de "framework" (ou região de esqueleto) proveniente de um gene de imunoglobulina ou de seus fragmentos que se ligam especificamente e reconhecem um antigénio, que, no caso da presente invenção, é uma proteína de superfície específica de um tecido, um receptor específico de um tecido alvo, ou uma sua fracção. Se utilizarmos o polipéptido de fusão de "targeting" como uma terapêutica em mamíferos, as regiões de ligação às imunoglobulinas devem ter origem nas correspondentes imunoglobulinas de mamíferos. Se o polipéptido de fusão de "targeting" se destina a utilização não terapêutica, como para diagnóstico e ensaios ELISA, as regiões de ligação às imunoglobulinas podem derivar do homem ou de mamíferos não humanos, como murganhos. Os genes ou fragmentos de genes humanos de imunoglobulinas incluem as

regiões constantes kapa, lambda, alfa, gama, delta, épsilon, e mu, bem como uma miríade de genes de regiões variáveis de imunoglobulinas. As cadeias leves classificam-se como kapa ou lambda. As cadeias pesadas classificam-se como gamma, mu, alfa, delta, ou épsilon, que por sua vez definem as classes de imunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, respectivamente. Dentro de cada classe de IgG, existem diferentes isotipos (por exemplo, IgG1, IgG2, etc.). De um modo característico, a região de ligação ao antigénio de um anticorpo será a mais crucial na determinação da especificidade e da afinidade de ligação.

Uma unidade estrutural de imunoglobulina (anticorpo) exemplificativa da IgG humana compreende um tetrâmero. Cada tetrâmero é composto por dois pares idênticos de cadeias polipeptídicas, possuindo cada par uma cadeia leve (cerca de 25 kD) e uma cadeia pesada (cerca de 50-70 kD). O N-terminal de cada cadeia define uma região variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos responsável principalmente pelo reconhecimento do antigénio. As expressões "cadeia leve variável" (V_L) e "cadeia pesada variável" (V_H) referem-se a essas cadeias, leve e pesada, respectivamente.

Anticorpos existem como imunoglobulinas intactas, ou como uma série de fragmentos bem caracterizados produzidos pela digestão com diversas peptidases. Por exemplo, a pepsina digere um anticorpo a seguir às ligações dissulfureto na região charneira ("*hinge region*") para produzir $F(ab)'_2$, um dímero do Fab que em si mesmo é uma cadeia leve unida a V_H-C_H por uma ligação dissulfureto. O dímero $F(ab)'_2$ pode reduzir-se sob condições suaves para quebrar a ligação dissulfureto na região charneira, convertendo assim o dímero $F(ab)'_2$ em um monómero Fab'. O monómero Fab' é essencialmente Fab com parte

da região charneira. Enquanto diversos fragmentos de anticorpos são definidos em termos da digestão de um anticorpo intacto, qualquer perito reconhecerá que tais fragmentos podem ser sintetizados *de novo* ou quimicamente ou utilizando metodologia de DNA recombinante. Assim, os termos imunoglobulina ou anticorpo, quando utilizados na presente invenção, incluem também fragmentos de anticorpos quer produzidos pela modificação de anticorpos completos, quer os sintetizados *de novo* utilizando metodologias de DNA recombinante (por exemplo, fragmento Fv de cadeia simples) (scFv) ou os identificados utilizando bibliotecas a partir das quais se realiza a técnica *Phage Display* [ver, por exemplo, McCafferty *et al.* (1990) *Nature* 348:552-554]. Além disso, os polipéptidos de fusão descritos na presente invenção incluem as regiões variáveis da cadeia pesada (V_H) ou leve (V_L) das imunoglobulinas, bem como proteínas de superfície específicas de tecidos e seus fragmentos ("portions") que se ligam aos receptores alvo. Reiter, *et al.* (1999) *J. Mol. Biol.* 290:685-698 descrevem processos para a produção dessas regiões variáveis.

Os processos para a preparação de anticorpos são conhecidos na arte. Ver, por exemplo, Kohler & Milstein (1975) *Nature* 256:495-497; Harlow & Lane (1988) *Antibodies: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY). Os genes que codificam as cadeias pesadas e leves de um anticorpo de interesse podem ser clonados a partir de uma célula, por exemplo, os genes que codificam um anticorpo monoclonal podem ser clonados a partir de um hibridoma e utilizados para produzir um anticorpo monoclonal recombinante. As bibliotecas de genes que codificam cadeias pesadas e leves de anticorpos monoclonais podem também preparar-se a partir de hibridomas ou de células plasmáticas.

Associações aleatórias dos produtos genéticos ou génicos ("*gene products*") de cadeias leves e pesadas geram um grande conjunto de anticorpos com diferente especificidade antigénica. Técnicas para a produção de anticorpos de cadeia simples ou de anticorpos recombinantes (Patente de invenção norte-americana N^o 4 946 778; Patente de invenção norte-americana N^o 4 816 567) podem adaptar-se para produzir anticorpos utilizados nos polipéptidos de fusão e processos de acordo com a presente invenção. Para expressar anticorpos humanos ou humanizados podem utilizar-se também murganhos transgénicos, ou outros organismos como outros mamíferos. Alternativamente, pode utilizar-se a tecnologia "*phage display*" para identificar anticorpos, fragmentos de anticorpos, tais como domínios variáveis, e fragmentos Fab heteroméricos que se ligam especificamente aos antigénios escolhidos.

Utilizando diversos processos conhecidos na arte pode proceder-se à identificação e selecção de imunoglobulinas preferidas (anticorpos). A identificação inicial destinada à presença de anticorpos monoclonais específicos para um receptor específico de tecidos ou alvo pode processar-se através da utilização de processos baseados em ELISA ou "*phage display*", por exemplo. Uma identificação secundária processa-se preferencialmente para identificar e seleccionar um anticorpo monoclonal desejado para utilização na construção dos polipéptidos de fusão específicos de tecidos de acordo com a presente invenção. Uma identificação secundária pode realizar-se utilizando qualquer processo adequado conhecido na arte. Um processo preferido, denominado "Biosensor Modification-Assisted Profiling" ("*BiaMAP*") (Publicação da Patente de invenção norte-americana 2004/101920), permite rápida identificação de anticorpos

monoclonais produtores de clones de hibridomas com características desejadas. Mais especificamente, os anticorpos monoclonais classificam-se em diferentes grupos relacionados com epitopos com base na avaliação de interacções anticorpo:antigénio.

Agente Activo ou Terapêutico

Em algumas formas de realização, o componente de fusão (F) dos polipéptidos da presente invenção compreende um segundo agente activo ou terapêutico ou um seu mutante ou derivado, ou seja, uma molécula capaz de exercer um efeito desejado quando libertada no sítio alvo pré-seleccionado, por exemplo, uma célula ou um tecido. Agentes activos ou terapêuticos incluem, mas sem carácter limitativo, pequenas moléculas, hormonas, factores de crescimento, agentes biológicos terapêuticos, anticorpos de activação e seus fragmentos, e anticorpos de bloqueio e seus fragmentos, que são capazes de exercer um efeito desejável após libertação em uma célula ou um tecido alvo.

Em formas de realização específicas em que o polipéptido de fusão é dirigido para células ou um tecido muscular, esse polipéptido de fusão compreende um segundo agente activo ou terapêutico que actua sobre células musculares. Tais agentes incluem, embora sem carácter limitativo, insulina, IL-15, miotrofina, urocortina, urocortina II, um pró-péptido da miostatina humana, um IGF1 ou IGF2 natural ou mutante, hGH, proliferina, folistatina, FSTL1, e FLRG, ou seus mutantes, derivados ou fragmentos que exercem actividade sob o ponto de vista biológico. Além disso, o agente activo ou terapêutico pode incluir um anticorpo de bloqueio ou um seu derivado activo sob o ponto de vista biológico, que bloqueia, por

exemplo, a miostatina, receptores das activinas, receptores da BMP tipo 1, receptores do TNF, receptores da IL-1, receptores ALK3 e receptores ALK4. Alternativamente, o agente activo ou terapêutico pode incluir um anticorpo de activação que activa, por exemplo, receptores do IFG1, receptores adrenérgicos B2 ou o complexo receptor IL-15.

Componente de multimerização

Em formas de realização específicas, o componente de fusão (F) dos polipéptidos de fusão descritos na presente invenção compreende um componente de multimerização. Um componente de multimerização inclui qualquer sequência natural ou sintética capaz de interagir com um outro componente de multimerização para formar uma estrutura de ordem superior, por exemplo, um dímero, um trímero, etc.. O componente de multimerização pode escolher-se no grupo constituído por uma sequência de aminoácidos entre 1 e cerca de 500 aminoácidos de comprimento, um zíper de leucina ("*leucine zipper*"), um motivo *helix loop* ("*helix loop motif*"), e um motivo *coiled-coil* ("*coil-coil motif*"). Quando o componente de multimerização compreende uma sequência de aminoácidos entre 1 e cerca de 500 aminoácidos de comprimento, a sequência pode conter um ou mais restos de cisteína capazes de formarem uma ligação dissulfureto com um resto de cisteína correspondente em um outro polipéptido de fusão que compreende um componente de multimerização com um ou mais restos de cisteína. Em algumas formas de realização, o componente de multimerização compreende um domínio derivado de uma imunoglobulina de, por exemplo, IgG, IgM ou IgA humana, ou domínios comparáveis de imunoglobulinas de outros animais, incluindo, mas não limitado a, murganhos. Em formas de realização específicas, o domínio derivado de

imunoglobulinas pode escolher-se no grupo constituído pela região constante da IgG, o domínio Fc da IgG, uma proteína Fc, e a cadeia pesada da IgG. O domínio Fc da IgG pode escolher-se entre os isotipos IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, bem como qualquer alotipo dentro de cada grupo de isotipos.

Espaçadores Constituintes

Os componentes dos polipéptidos de fusão de "targeting" da presente invenção podem unir-se directamente uns aos outros ou unir-se através de espaçadores. O termo "espaçador" ou "ligando ou ligante" significa uma ou mais molécula(s), por exemplo, ácidos nucleicos ou aminoácidos ácidos, ou radicais não peptídicos, tais como o polietilenoglicol, que pode inserir-se entre um ou mais domínio(s) constituinte(s). Por exemplo, para facilidade da manipulação podem utilizar-se sequências espaçadoras para estabelecer um sítio de restrição entre componentes. Um espaçador pode também estabelecer-se para intensificar a expressão do polipéptido de fusão a partir de uma célula hospedeira, reduzir o impedimento estérico de tal forma que o componente pode assumir a sua estrutura terciária ou quaternária óptima e/ou interagir adequadamente com a sua molécula alvo.

Uma sequência espaçadora pode incluir um ou mais aminoácido(s) naturalmente unido(s) a um componente receptor, ou pode representar uma sequência suplementar utilizada para intensificar a expressão da proteína de fusão, estabelecer especificamente sítios desejados de interesse, permitir domínios constituintes para formar óptimas estruturas terciárias e/ou para intensificar a interacção de um componente com a sua molécula alvo. Em uma forma de realização, o espaçador compreende uma ou mais sequência(s)

peptídica(s) entre um ou mais componente(s) que ocorre(m) entre 1 e 100 aminoácido(s), de preferência 1 a 25. Em uma forma de realização específica, o espaçador é uma sequência de três aminoácidos; mais especificamente, uma sequência de três aminoácidos de Gly Gly Pro.

Construção e Expressão de Ácidos Nucleicos

Componentes individuais dos polipéptidos de fusão da presente descrição podem produzir-se a partir de moléculas de ácidos nucleicos utilizando processos biológicos moleculares conhecidos na arte. O ácido nucleico de SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4 com as deleções ou mutações apropriadas podem utilizar-se para preparar as variantes do IGF1 ou do IGF2 descritas na presente invenção. Tais moléculas de ácidos nucleicos são inseridas em um vector que é capaz de expressar os polipéptidos de fusão quando introduzido em uma célula hospedeira apropriada. Células hospedeiras adequadas incluem, embora sem carácter limitativo, células de bactérias, leveduras, insectos e mamíferos. Qualquer um dos processos que os peritos na arte conhecem para a inserção de fragmentos de DNA em um vector pode utilizar-se para construir vectores de expressão que codificam os polipéptidos de fusão da presente invenção sob controlo de sinais de controlo de transcrição/translação. Esses processos podem incluir *in vitro* técnicas de DNA recombinante e técnicas de síntese e recombinações *in vivo* (Veja Sambrook *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel, *et al.* Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY).

A expressão das moléculas de ácidos nucleicos da presente invenção pode ser regulada por uma segunda sequência

de ácidos nucleicos de modo que a molécula é expressa em um hospedeiro transformado com a molécula de DNA recombinante. Por exemplo, a expressão das moléculas de ácido nucleico da presente invenção pode controlar-se por um qualquer elemento promotor/amplificador ("*promoter/enhancer element*") conhecido na arte. Promotores que se podem utilizar para controlar a expressão das moléculas dos polipéptido de fusão incluem, embora sem carácter limitativo, a repetição terminal longa conforme descrita em Squinto *et al.* (1991) *Cell* 65:1-20; a região promotora inicial SV40, o promotor CMV, o promotor da repetição terminal M-MuLV5' incluído na repetição terminal longa 3' do vírus do sarcoma Rous, o promotor de vírus herpes para timidina quinase, as sequências reguladoras do gene da metalotionina; vectores de expressão procarióticos como o promotor da lactamase, ou o promotor tac (ver também "Useful proteins from recombinant bacteria" em *Scientific American* (1980) 242:74-94); elementos promotores de leveduras ou fungos, como o promotor Gal 4, o promotor ADH [(*alcohol dehydrogenase*) álcool-desidrogenase], o promotor PGK [(*phosphoglycerol quinase*) fosfoglicerol quinase], o promotor para fosfatase alcalina e regiões de controlo transcricional específicas de tecidos provenientes de o gene I da elastase, o gene da insulina, o gene de uma imunoglobulina, o vírus de tumor mamário de murganho, o gene da albumina, o gene da α -fetoproteína, o gene da α 1-antitripsina, o gene da β -globina, o gene da proteína básica mielina, o gene da cadeia leve 2 da miosina, e o gene da hormona libertadora da gonadotrofina.

As construções de ácidos nucleicos da presente invenção são inseridas em um vector de expressão ou um vector viral por processos conhecidos na arte, em que a molécula de ácido nucleico se liga sob o ponto de vista funcional

("operatively") a uma sequência de controlo de expressão. Apresenta-se também um sistema hospedeiro-vector para a produção de um polipéptido de fusão específico de tecidos de acordo com a presente invenção, que compreende o vector de expressão da presente invenção, que foi introduzido em uma célula hospedeira apropriada para a expressão do polipéptido de fusão. A célula hospedeira adequada pode ser uma célula bacteriana como de *E. coli*, uma célula de levedura, como de *Pichia pastoris*, uma célula de insecto, como *Spodoptera frugiperda*, ou uma célula de mamífero, como uma célula COS, CHO, 293, BHK ou NS0.

A presente invenção compreende ainda processos para a produção de polipéptidos de fusão de acordo com a presente invenção mediante a cultura de células transformadas com um vector de expressão em condições que permitem a produção de polipéptidos de fusão específicos de tecidos e recuperação dos polipéptidos de fusão assim produzidos. As células podem também ser transduzidas com um vírus recombinante que compreende a construção do ácido nucleico de acordo com a presente invenção.

Os polipéptidos de fusão podem purificar-se por qualquer técnica, que permita a subsequente formação de um polipéptido estável. Por exemplo, e não de um modo limitativo, os polipéptidos de fusão podem recuperar-se a partir de células ou como polipéptidos solúveis ou como corpos de inclusão, a partir dos quais se podem extrair quantitativamente utilizando cloridrato de guanidínio 8M e diálise. A fim de se purificar mais os polipéptidos de fusão, pode utilizar-se cromatografia de troca iónica convencional, cromatografia de interacção hidrofóbica, cromatografia de fase inversa ou filtração sobre gel. Os polipéptidos de fusão podem também

recuperar-se a partir de meios condicionados após secreção das células eucarióticas ou procarióticas.

Processos Terapêuticos

A presente descrição proporciona ainda o desenvolvimento de polipéptidos de fusão do IGF descritos na mesma invenção como uma terapêutica para o tratamento de pacientes que sofrem de distúrbios que podem melhorar com a dispensa de IGF1 ou de IGF2, por exemplo, uma situação causada ou agravada por deficiência de um IGF. Por exemplo, uma diminuição da massa muscular, ou atrofia, está associada a diversos estados fisiológicos e patológicos. Por exemplo, a atrofia muscular pode resultar de desnervação devido a traumatismo nervoso, neuropatia degenerativa, metabólica ou inflamatória, por exemplo, síndrome de Guillain-Barré; neuropatia periférica; ou lesão nervosa induzida por toxinas ambientais ou fármacos. A atrofia muscular também pode provir da desnervação devido a uma neuropatia motora incluindo, por exemplo, uma doença do neurónio motor no adulto, como a Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS, ou doença de Lou Gehrig); atrofias musculares espinais infantis e juvenis; e neuropatia motora auto-imunitária com bloqueio de condução multifocal. A atrofia muscular também pode surgir de uma doença crónica resultante de, por exemplo, paralisia devido a acidente vascular cerebral ou a lesão da medula espinal; imobilização do esqueleto devido a trauma, como, por exemplo, fractura, lesão de ligamentos ou de tendões, entorse ou luxação; ou repouso prolongado no leito. Stress metabólico ou insuficiência nutricional, que pode também originar atrofia muscular, inclui a caquexia do cancro e outras doenças crónicas incluindo a SIDA, jejum ou rabdomiólise, e distúrbios endócrinos tais como distúrbios da glândula

tiróide e diabetes. A atrofia muscular pode também provir de síndromes de distrofia muscular como a de Duchenne, Becker, miotónica, fascio-escapulo-humeral, Emery-Dreifuss, oculo-faríngea, escapulo-humeral, do tipo cinturas (cintura pélvica e escapular) ("*limb girdle*"), e de tipos congénitos, bem como a distrofia conhecida como Miopatia Distal Hereditária. A atrofia muscular pode também ser devida a uma miopatia congénita, como hipotonia congénita benigna, doença do núcleo central, miopatia nemalínica e miopatia miotubular (centronuclear). A atrofia muscular ocorre também durante o processo de envelhecimento. A atrofia muscular em diversos estados patológicos está associada a proteólise intensificada e produção reduzida de proteínas musculares.

Os polipéptidos de fusão que comportam os IGF1 e IGF2 descritos na presente invenção são igualmente úteis em doenças associadas a uma deficiência de um IGF, tal como o nanismo. Ainda mais, tem-se demonstrado que os IGFs melhoram a sobrevivência das células do músculo cardíaco após um episódio como um infarto do miocárdio, pelo que os polipéptidos de fusão da presente invenção são úteis em um paciente que foi afectado por um evento dessa natureza.

A capacidade dos polipéptidos de fusão que comportam um IGF para evitar o grande número de proteínas que se ligam a esses IGFs presentes em um mamífero torna-os úteis sob o ponto de vista terapêutico para tratar de um modo eficiente afecções que podem beneficiar de um nível crescente de IGFs, como a recuperação de afecções promotoras de atrofia, situações em que a massa muscular esquelética foi decrescendo, ou situações em que a hipertrofia muscular é desejável, como durante a recuperação de imobilização, envelhecimento, cancro, etc..

Porque os receptores dos IGFs se expressam amplamente, as moléculas de fusão que comportam IGF em que o componente de fusão é um componente de multimerização como Fc ou um outro componente activo podem ainda utilizar-se em estruturas além do músculo. Por exemplo, IGF1 e IGF2 têm demonstrado serem factores de crescimento ósseo, e portanto um IGF1-Fc ou IGF2-Fc ou uma fusão do IGF1 ou do IGF2 com a hormona de crescimento poderia ser útil no tratamento de osteoporose ou de outra perda ou fraqueza óssea, incluindo fraqueza relacionada com a idade, fragilidade ou sarcopénia. As moléculas não alvejadas podem também ser úteis em contextos de uma geral perda de massa corporal - como na caquécia. A caquécia é uma afecção que induz perda de massa corporal, incluindo, embora sem carácter limitativo, a massa muscular. Cenários de caquécia incluem caquécia induzida por cancro, caquécia induzida por SIDA, caquécia induzida por sepsia, caquécia induzida por insuficiência renal, e insuficiência cardíaca congestiva. Há igualmente lentidão no crescimento em muitas situações, incluindo talassémia, o que determina baixa estatura. A baixa estatura em geral seria um cenário para uma proteína de fusão comportando IGF1 ou IGF2 que não é direccionada directamente para o músculo - como as formas de realização IGF1-Fc ou IGF2-Fc ou IGF1-GH ou IGF2-GH. Uma utilização adicional do IGF1 ou do IGF2 consiste em complementar ou substituir a insulina. Em situações de diabetes insensíveis à insulina podem utilizar-se proteínas de fusão que comportem IGF1 ou IGF2. Essas variantes podem ainda utilizar-se apenas como um substituto da insulina em situações de hiperglicémia. Outras utilizações adicionais para as fusões comportando IGF1 e IGF2 descritas na presente invenção incluem a utilização no desmame de indivíduos provenientes de ventiladores e no tratamento de doenças como

a anemia em que se deseja a proliferação de células do sangue.

Métodos de Administração

Métodos conhecidos na arte para a administração terapêutica de agentes como proteínas ou ácidos nucleicos podem utilizar-se para a administração terapêutica de um polipéptido de fusão que comporta IGF ou de um ácido nucleico que codifica um polipéptido de fusão que comporta IGF da presente invenção como, por exemplo, transfecção celular, terapia génica, administração directa por meio de um veículo de administração ou de um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico, administração indirecta pela propiciação de células recombinantes que comportam um ácido nucleico que codifica um polipéptido de fusão que comporta um IGF de acordo com a presente invenção.

Conhecem-se diversos sistemas de administração que se podem utilizar para administrar o polipéptido de fusão da presente invenção como, por exemplo, encapsulamento em lipossomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capazes de expressarem o composto, endocitose mediada pelo receptor, construção de um ácido nucleico como parte de um vector retroviral ou outros, etc.. Os métodos de introdução podem ser entéricos ou parentéricos e incluem, embora sem carácter limitativo, as vias intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, endovenosa, subcutânea, pulmonar, intranasal, intra-ocular, epidural, e oral. Os compostos podem administrar-se por qualquer via conveniente, por exemplo, por perfusão ou injeção em bolus, por absorção através dos revestimentos epiteliais ou mucocutâneos (por exemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) e

podem administrar-se juntamente com outros agentes activos sob o ponto de vista biológico. A administração pode ser sistémica ou local. Além disso, pode ser desejável introduzir as composições farmacêuticas da presente invenção no sistema nervoso central por qualquer via adequada, incluindo uma injeção intraventricular e intratecal; a injeção intraventricular pode ser facilitada por um cateter intraventricular, por exemplo, ligado a um reservatório, como um reservatório de Ommaya. A administração pulmonar pode também utilizar-se, por exemplo, mediante a utilização de um inalador ou de um nebulizador, e de uma formulação com um agente capaz de produzir um aerossol.

Em uma forma de realização específica, pode ser desejável administrar as composições farmacêuticas da presente invenção localmente na área que necessita de tratamento; isso pode conseguir-se, por exemplo, e sem carácter limitativo, por perfusão local durante uma cirurgia, administração tópica, por exemplo, por meio de injeção, utilizando um cateter, ou por meio de um implante, implante esse constituído por um material poroso, não poroso, ou gelatinoso, incluindo membranas, tais como membranas de silástico, fibras, ou substitutos comerciais da pele.

Em uma outra forma de realização, o agente activo pode administrar-se sob a forma de uma partícula ("vesicle"), em especial de um lipossoma (ver Langer (1990) Science 249:1527-1533). Ainda em uma outra forma de realização, o agente activo pode administrar-se sob a forma de um sistema de libertação controlada. Em uma forma de realização, pode utilizar-se uma bomba (ver Langer (1990) *supra*). Em uma outra forma de realização, podem utilizar-se materiais poliméricos (ver Howard *et al.* (1989) J. Neurosurg. 71:105). Em uma outra

forma de realização em que o agente activo da presente invenção é um ácido nucleico que codifica uma proteína, esse ácido nucleico pode administrar-se *in vivo* para promover a expressão da sua proteína codificada, construindo-a como parte de um vector de expressão de ácido nucleico apropriado e administrando-o, para que se torne intracelular, por exemplo, através de um vector retroviral (ver, por exemplo, Patente de invenção norte-americana N^o 4 980 286), ou por injeção directa, ou mediante utilização de bombardeamento de micropartículas (por exemplo, pela técnica "gene gun"; Biolistic, Dupont), ou revestimento com lípidos ou receptores da superfície celular ou agentes de transfecção, ou administrando-o em ligação com um péptido tipo "homeobox" que é conhecido por penetrar no núcleo (ver, por exemplo, Joliot *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868), etc.. Alternativamente, pode introduzir-se um ácido nucleico no meio intracelular e incorporar-se no seio do DNA da célula hospedeira para expressão, por recombinação homóloga.

Transfecção Celular e Terapia Génica

A presente descrição inclui a utilização de ácidos nucleicos que codificam os polipéptidos de fusão da presente invenção para a transfecção de células *in vitro* e *in vivo*. Esses ácidos nucleicos podem inserir-se em um qualquer de uma série de bem conhecidos vectores para a transfecção de células alvo e organismos. Os ácidos nucleicos são transfectados para o interior de células *ex vivo* e *in vivo*, através da interacção do vector e da célula alvo. As composições administram-se (por exemplo, por injeção no músculo) a um paciente em uma quantidade suficiente para provocar uma resposta terapêutica.

Em um outro aspecto, descreve-se na presente invenção um método de tratamento de um sítio alvo, ou seja, uma célula ou um tecido alvo, no homem ou em um outro animal que compreende a transfecção em uma célula de um ácido nucleico que codifica um polipéptido de fusão específico de um tecido, em que o ácido nucleico compreende um promotor susceptível de indução ligado de um modo funcional ao ácido nucleico que codifica o polipéptido de fusão de "targeting".

Terapias de associação

Em numerosas formas de realização, os polipéptidos de fusão da presente invenção podem administrar-se em associação com um(a) ou mais composto(s) ou terapia(s) adicionais. Por exemplo, polipéptidos de fusão múltiplos podem co-administrar-se em associação com um ou mais composto(s) terapêutico(s). A terapia de associação pode abranger administração simultânea ou alternada. Além disso, a associação pode abranger administração aguda ou crônica.

Composições Farmacêuticas

A presente invenção proporciona igualmente composições farmacêuticas que compreendem uma proteína de fusão da presente invenção e um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico. A expressão "aceitável sob o ponto de vista farmacêutico" significa aprovado por uma agência reguladora do governo Federal ou de um estado ou especificado na U.S. *Pharmacopeia* ou em outras farmacopeias geralmente reconhecidas para utilização em animais, e mais especialmente no homem. O termo "veículo" ("carrier") refere-se a um diluente, adjuvante, excipiente, ou veículo ("vehicle") com o qual se administra o agente terapêutico. Tais veículos

farmacêuticos podem ser líquidos estéreis, como água e óleos, incluindo os de origem petrolífera, animal, vegetal ou de síntese, como o óleo de amendoim, o óleo de soja, parafina líquida, óleo de gergelim e outros. Excipientes farmacêuticos adequados incluem amido, glucose, lactose, sacarose, gelatina, malte, arroz, farinha ("*flour*"), calcário ("*chalk*"), gele de sílica, estearato de sódio, monoestearato de glicerol, talco, cloreto de sódio, leite em pó desnatado, glicerol, propilenoglicol, água, etanol e similares. A composição, se assim se desejar, pode conter igualmente pequenas quantidades de agentes molhantes ou emulsionantes, ou agentes de tamponamento do pH. Essas composições podem apresentar-se sob a forma de soluções, suspensões, emulsões, comprimidos ou cápsulas ("*tablets, pills, capsules*"), pós, formulações de libertação contínua constante ("*sustained-release*") e similares. A composição pode formular-se sob a forma de supositório, com aglutinantes e veículos tradicionais como triglicéridos. Uma formulação oral pode incluir veículos convencionais tais como manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, celulose, carbonato de magnésio, etc. de grau farmacêutico. E.W. Martin descreve em "Remington's Pharmaceutical Sciences" exemplos de veículos farmacêuticos adequados.

Em uma forma de realização preferida, a composição é formulada de acordo com técnicas de rotina sob a forma de uma composição farmacêutica adaptada a administração intravenosa em seres humanos. Se necessário, a composição pode incluir também um agente de solubilização e um anestésico local como a lidocaína para aliviar a dor no local da injeção. Quando a composição se destina a administrar por perfusão, pode ser ministrada utilizando um frasco para perfusão estéril contendo água ou soro fisiológico estéril de grau

farmacêutico. Quando se administra a composição mediante injeção, prepara-se uma ampola de água para injectáveis ou de soro fisiológico estéril de modo que os componentes se possam misturar antes da administração.

Os agentes activos da presente invenção podem formular-se sob formas neutras ou salinas. Sais aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico incluem os constituídos por grupos amino livres tais como os derivados dos ácidos clorídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., e os constituídos por 16 grupos carboxilo livres tais como os derivados de sódio, potássio, amónio, cálcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-(etilamino)etanol, histidina, procaína, etc..

A quantidade do polipéptido de fusão da presente invenção que será eficaz no tratamento de uma afecção ou de uma doença pode determinar-se por técnicas clínicas convencionais com base na presente descrição. Além disso, para ajudar a deduzir o valor ideal da dosagem podem utilizar-se facultativamente ensaios *in vitro*. A dose precisa a utilizar na formulação dependerá também da via de administração, e da gravidade da afecção, e deverá ser determinada de acordo com a decisão do médico e cada situação particular do paciente. No entanto, valores de dosagem adequados para administração intravenosa estão geralmente compreendidos entre 20 e 5 000 microgramas de composto activo por quilograma de peso corporal. Valores de dosagem apropriados para administração intranasal estão geralmente próximos de 0,01 µg/kg de peso corporal até 1 mg/kg de peso corporal. A partir de curvas de dose-resposta derivadas de sistemas de ensaios *in vitro* ou em modelos animais podem extrapolar-se as doses eficazes.

Kits

Também descrito na presente invenção apresenta-se um "pack" ou "kit" que inclui um ou mais recipiente(s) provido(s) com pelo menos um polipéptido de fusão ou um ácido nucleico que codifica um polipéptido de fusão de acordo com a presente invenção. Esses kits podem utilizar-se em qualquer método apropriado, incluindo, por exemplo, para diagnóstico. Eventualmente pode juntar-se a esse(s) recipiente(s) uma comunicação sob a forma de indicações prescritas por uma agência governamental regulando a fabricação, utilização ou venda dos produtos farmacêuticos ou biológicos, comunicação essa que reflecte (a) a aprovação pela agência da fabricação, utilização ou venda para administração a humanos, (b) instruções de utilização, ou ambas.

Animais transgênicos

Adicionalmente descritos na presente invenção apresentam-se animais não humanos transgênicos que expressam um polipéptido de fusão comportando um IGF de acordo com a presente invenção. Um animal transgênico pode gerar-se através da introdução de ácido nucleico no interior dos pronúcleos masculinos de um oócito fertilizado, por exemplo, por microinjecção, infecção retroviral, e permitindo que o oócito se desenvolva em um animal fêmea pseudo-grávida ("foster mother"). Qualquer uma das sequências reguladoras ou outras úteis em vectores de expressão podem fazer parte da sequência transgênica. Sequência(s) reguladora(s) específica(s) de um tecido pode(m) ligar-se de um modo funcional ao transgene para direccionar ("to direct") a expressão do mesmo transgene para células específicas. Um animal não humano transgênico que expressa um polipéptido de

fusão específico de um tecido é útil em diversas aplicações, incluindo por exemplo processos de produção dessas proteínas de fusão. Além disso, o transgene pode colocar-se sob o controlo de um promotor susceptível de indução tal que a expressão do polipéptido de fusão específico de um tecido pode ser controlada mediante, por exemplo, a administração de uma pequena molécula.

EXEMPLOS

Os exemplos seguintes colocam-se em evidência para assim proporcionar aos peritos experientes na arte uma divulgação e descrição total de como fazer e utilizar os métodos e composições da presente invenção, não se destinando a limitar o objectivo do que os presentes inventores consideram como a sua invenção. Fizeram-se esforços para garantir a precisão em relação aos números utilizados (por exemplo, quantidades, temperatura, etc.), mas alguns erros e desvios experimentais devem ser contabilizados. A menos que indicado de outro modo, partes são partes em peso, peso molecular é o peso molecular médio, a temperatura apresenta-se em graus centígrados, e a pressão é igual ou próxima da atmosférica.

Exemplo 1. Polipéptidos de Fusão que comportam um IGF são Clivados em Lys 65 ou 68

Construiu-se um polipéptido de fusão que contém IGF1 humano utilizando o IGF1 humano ($\Delta 1-3$, delR37) fundido em Fc humano. Purificou-se o polipéptido e injectou-se em murganhos. Colheram-se amostras de sangue a cada 24 horas durante sete dias. Realizou-se uma técnica de Western utilizando um anticorpo específico para o Fc humano. Decorridos três dias, observou-se uma banda de migração

mínima ("lower"), indicando que o IGF1-Fc estava sendo proteoliticamente clivado no soro. Recolheu-se mais soro, e purificou-se e sequenciou-se essa espécie de migração mínima ("lower"). Verificou-se que a construção IGF1-Fc foi clivada na lisina 68 ou na lisina 65 na variante do IGF1. Com base nesse resultado, prepararam-se construções em que os três a seis aminoácidos terminais são removidos, ou a lisina na posição 65 ou 68 sofre mutação para um outro aminoácido como a alanina ou a glicina. Essas variantes utilizam-se na preparação de polipéptidos de fusão de acordo com a presente invenção que compreendem componentes de fusão tais como componentes de multimerização, ligandos de "targeting", e outros compostos activos, constatando-se que possuem maior estabilidade e semivida do que construções comparáveis com a lisina na posição 65 ou 68 do componente variante do IGF1.

Exemplo 2. Polipéptidos de Fusão IGF1-Fc

Realizaram-se construções de polipéptidos de fusão empregando a variante de IGF1-Fc, ou Fc-variante de IGF1, utilizando a variante IGF1 ($\Delta 1-3$, delR37) e o Fc derivado de IgG humana. A actividade do IGF1 avaliou-se pela sua capacidade de fosforilar o receptor do mesmo IGF1 e a quinase Akt. Essa fosforilação determinou-se por uma técnica de *Western blot*, utilizando anticorpos fosfo-específicos contra diversas moléculas, ou por precipitação imunitária dos receptores (como IGFR), e realizando uma técnica de *Western* com um anticorpo específico anti-fosfo-tirosina. Essas análises de blot indicaram fosforilação activa da Akt utilizando a construção IGF1-Fc, mas pouca ou nenhuma actividade utilizando a construção Fc-IGF1.

A construção IGF1(Δ 1-3, delR37)-Fc administrou-se a murganhos SCID por via intraperitoneal ou subcutânea através de injeções diárias ou através de injeções em dias alternados. Nas injeções utilizaram-se 4,5 mg/kg de proteína de fusão. Aos murganhos de controlo não se administrou a proteína IGF1-Fc. A um terceiro grupo de murganhos administraram-se igualmente por dia 15mg/kg de dexametasona por via subcutânea. Essa dosagem é suficiente para fazer surgir 15% de perda de massa muscular após 12 dias. A um quarto grupo de murganhos administraram-se ambos a dexametasona e o IGF1(Δ 1-3, delR37)-Fc. Os murganhos nesse quarto grupo não foram afectados por atrofia ou por reduções significativas sob o ponto de vista estatístico na atrofia (atrofia de 5% no músculo tibial anterior (TA) de murganhos tratados quer com dexametasona quer com IGF1 (Δ 1-3, delR37)-versus atrofia de 15% do TA para os murganhos tratados apenas com dexametasona).

Exemplo 3. Polipéptidos de Fusão IGF1-hGH

Os polipéptidos de fusão construíram-se utilizando o IGF1(Δ 1-3, delR37) com hGH como o componente de fusão. Além disso para avaliar a actividade do IGF1, determinou-se a actividade da hormona do crescimento humana (hGH) através da sua capacidade de fosforilar a STAT5. Surpreendentemente, construções com a configuração variante de IGF1-hGH induziram a fosforilação quer dos receptores do IGF1 quer da STAT5, enquanto construções com a configuração hGH-variante do IGF1 apresentaram pouca ou nenhuma actividade.

Ensaio de fosforilação indicaram que proteínas de fusão com a configuração variante do IGF1-hGH, que incluem quer a hGH quer a variante hIGF1 descritas antes, são capazes de

activar simultaneamente o receptor do IGF1, a Akt, e a STAT5. Essa fosforilação determinou-se realizando uma técnica de *Western blot*, utilizando anticorpos fosfo-específicos contra diversas moléculas, ou por imuno-precipitação dos receptores (como IGFR), e realizando a técnica de *Western* com um anticorpo específico contra anti-fosfo-tirosina. Além disso, todos os polipéptidos de fusão anteriores construíram-se utilizando mutantes humanos do IGF1 que apresentavam os três primeiros aminoácidos removidos ($\Delta 1-3$) e ou a eliminação ou a substituição das argininas nas posições 36 e/ou 37. Tais moléculas mutantes do IGF1 demonstraram quer resistência à clivagem quer ligação reduzida utilizando proteínas de ligação ao IGF-1 (especificamente a proteína 5 de ligação ao IGF1) sem afectar a capacidade de sinalização nos miotubos C2C12.

Proteínas de fusão que compreendem as variantes do IGF1 descritas antes bem como deleção dos aminoácidos 65-70 ou 68-70 ou mutação da lisina na posição 65 e 68 são construídas e ensaiadas quanto à sua capacidade para activar simultaneamente o Receptor do IGF1, a Akt, e a Stat5, conforme verificado por uma técnica de *Western blot*, utilizando anticorpos fosfo-específicos contra diversas moléculas, ou por imuno-precipitação dos receptores (como IGFR), e realizando uma técnica de *Western* com um anticorpo específico anti-fosfo-tirosina. Além disso, os miotubos C2C12 interagem com as fusões e determina-se a hipertrofia em comparação com a hipertrofia originada por quer um IGF1 isolado quer uma hGH isolada. Em construções em que um ligando de "*targeting*", como a agrina, se utiliza como um componente de fusão, a actividade pode ser avaliada por fosforilação do receptor alvo, como o MusK (Glass *et al.* (1996) 85:513-523; Beguinot *et al.* (1988) *Biochemistry*. 27(9):3222-8).

Exemplo 4. Polipéptidos de Fusão que Contêm IGF2

Todas as construções anteriores prepararam-se utilizando a proteína IGF2 ou DNA conforme apresentado na SEQ ID NOS:3-4. A lisina na posição 65 do IGF2 está presente participando na clivagem de proteínas de fusão que compreendem a variante IGF2, estimulando a utilização das variantes do IGF2 com deleções nos 3 aminoácidos terminais (65-67).

Exemplo 5. Efeito da 2D-IGF1-Fc(Δ 1-3, Δ Arg37) sobre a Glucose Sanguínea

Utilizaram-se murganhos C57/BL6 com 13 semanas de idade (n = 3 murganhos por grupo). Mantiveram-se os murganhos em jejum durante quatro horas. Da veia da cauda colheram-se amostras de sangue "baseline" (avaliações iniciais) e após a injeção e determinou-se a glucose sanguínea (glicémia) utilizando o dispositivo "glucometer". Quer a insulina, o IGF1 ou a IGF1-Fc foram administrados por via intraperitoneal e a glucose foi determinada no sangue colhido na veia da cauda 60 minutos após a administração do fármaco. A insulina administrou-se a 2 U/kg. O IGF-I utilizou-se em uma dose 10 vezes mais elevada do que a da insulina (700 μ g/kg) com base na afinidade comparativa do IGF-I para o receptor da insulina. A 2D-IGF1-Fc (hIGF Δ 1-3, Δ Arg37) administrou-se em doses equimolares relativamente às do IGF1 (3,5 mg/kg).

Resultados: A insulina originou uma redução de 66% da glucose no sangue (207 \pm 5,5 mg/dl "baseline" versus 70 \pm 22,2 mg/dl após a injeção), o IGF-I induziu uma diminuição de 45% da glucose no sangue (200 \pm 6,7 mg/dl "baseline" versus 109 \pm 13,7 mg/dl após a injeção), e 2D-IGFI-Fc originou uma diminuição da glucose no sangue de 30% (184 \pm 7,3 mg/dl "baseline" versus 129 \pm 15,9 mg/dl após a injeção). Esses resultados mostram que a IGFI-Fc é eficaz na

redução da glucose sanguínea em murganhos C57BI/6 em jejum em um teste agudo.

Exemplo 6. Análise Farmacocinética da Estrutura 2D-IGF1-Fc e da 3D-IGF1-Fc

Por via subcutânea injectaram-se murganhos CD-1 (n = 5 por grupo) com 5 mg/kg quer do 2D-IGF1-Fc quer do 3D-IGF1-Fc (hIGF, Δ 1-3, Δ Arg37, Δ 68-70) derivados do IGF1 humano. Colheram-se amostras de soro durante um período de 7 dias e realizaram-se ensaios ELISA com um anti-IGF1 humano (USB Cat. nº 17661-05) e anticorpo de cabra anti-IgG.Fc humana conjugado com a enzima HRP de detecção [*"antibody goat anti-human IgG.Fc-HRP"* (Jackson Immuno Research Cat. No. 109-035-098)]. Os resultados são apresentados na Fig. 1.; os Parâmetros farmacocinéticos estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Parâmetros Farmacocinéticos

		2D-IGF1-Fc	3D-IGF1-Fc
T_{MAX} (tempo necessário para alcançar a C_{MAX})	h	5,40±1,12	6,00±1,10
C_{MAX} (concentração máxima)	mcg/ml	9,10±1,75	13,27±2,85
$T_{1/2}$ (tempo de meia vida)	h	24,09±4,41	29,85±5,51
AUC_{all} (desde o tempo zero até ao último dia)	mcg*h/ml	325,42±61,55	554,55±112,23
AUC_{INF} (obs) (desde o tempo zero até extrapolação até ao infinito)	mcg*h/ml	328,31±62,10	566,82±114,63
V_z (obs) /F (volume de distribuição baseado na fase terminal/biodisponibilidade)	ml/Kg	535,77±101,88	395,78±82,00
CL (obs) /F (clearance/biodisoonibilidade)	ml/h/Kg	15,41*±2,91	9,26±1,97
MRT_{last} (tempo médio de residência desde 0 até à última concentração quantificável)	h	32,69±6,00	42,80±7,87
MRT_{INF} (obs) (tempo médio de residência desde 0 até à extrapolação até ao infinito)	h	34,19±6,27	42,46±7,80

Exemplo 7. Moléculas IGF1-Fc Induzem Hipertrofia do Músculo Esquelético *in vivo*

Em murganhos SCID adultos com 8 semanas injectaram-se diariamente por via subcutânea 2D-IGF1-Fc e 3D-IGF1-Fc na dose de 1,6 mg/kg ou o veículo soro fisiológico durante 12 dias (N = 5 por grupo). No final da experiência, removeram-se os músculos (tibial anterior e do complexo gastrocnémio) e determinou-se o peso húmido desses músculos. A injeção de 2D-IGF1-Fc originou um acréscimo de $23,07 \pm 2,14$ % (média \pm SEM) da massa tibial anterior e um aumento de $17,00 \pm 2,07$ % da massa gastrocnémia em comparação com músculos controlo. A injeção de 3D-IGF1-Fc originou um aumento de $9,45 \pm 3,72$ % da massa tibial anterior e um acréscimo de $9,31 \pm 2,15$ % da massa gastrocnémia em comparação com músculos controlo.

Exemplo 8. A 2D-IGF1-Fc é Melhor do que o IGF-1 para a Indução da Hipertrofia do Músculo Esquelético

A eficácia de 2D-IGF1-Fc na indução da hipertrofia do músculo esquelético comparou-se também directamente com a do IGF-I inalterado. Doses equimolares de cada (4,8 mg/kg de 2D-IGF1-Fc ou 0,93 mg/kg de IGF-1) ou do veículo soro fisiológico injectaram-se por via subcutânea em murganhos SCID adultos de 8 semanas de idade em dias alternados durante 12 dias (N = 5 por grupo). No final da experiência, removeram-se os músculos (tibial anterior e do complexo gastrocnémio) e determinou-se o peso húmido muscular. A injeção da 2D-IGF1-Fc originou um acréscimo de $13,35$ % \pm $2,26$ (média \pm SEM) na massa tibial anterior e um aumento de $9,39$ % \pm $3,68$ % na massa gastrocnémia em comparação com músculos controlo. A injeção de IGF1 proporcionou um acréscimo de $2,24$ % \pm $2,27$ da massa tibial anterior e um

aumento de 0,81 % \pm 1,51 da massa gastrocnémia em comparação com músculos controle.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> IGF-1 FUSION POLYPEPTIDES AND THERAPEUTIC USES THEREOF

<130> 2060A-WO

<140> to be assigned

<141> filed herewith

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 1

```

      Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe
      1      5      10      15
Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly
      20      25      30
Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys
      35      40      45
Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu
      50      55      60
Lys Pro Ala Lys Ser Ala
      65      70

```

<210> 2

<211> 210

<212> DNA

<213> Homo Sapien

<400> 2

```

ggaccggaga cgctctgagg ggctgagctg gtggatgctc ttcagttcgt gtgtggagac 60
aggggctttt atttcaacaa gccacaggg tatggctcca gcagtcggag ggcgcctcag 120
acaggtatcg tggatgagtg ctgcttccgg agctgtgatc taaggaggct ggagatgtat 180
tgcgcacccc tcaagcctgc caagtcagct 210

```

<210> 3
<211> 67
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<400> 3

```

Ala Tyr Arg Pro Ser Glu Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr
 1          5          10          15
Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Ser Arg Pro Ala
 20          25          30
Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe
 35          40          45
Arg Ser Cys Asp Leu Ala Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala
 50          55          60
Lys Ser Glu

```

<210> 4
<211> 201
<212> DNA
<213> Homo Sapien

<400> 4

```

gcttaccgcc ccagtgagac cctgtgaggg ggggagctgg tggacaccct ccagttcgtc 60
tgtggggacc ggggcttcta cttcagcagg cccgcaagcc gtgtgagccg tcgcagccgt 120
ggcatcggtg aggagtgtg tttccgcagc tgtgacctgg ccctcctgga gacgtactgt 180
gctacccccg ccaagtccga g 201

```

Lisboa, 30 de Julho de 2015.

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de fusão, que compreende:

- (a) pelo menos um componente polipeptídico variante do IGF1; e
- (b) um componente de fusão que compreende o domínio Fc da IgG humana;

na qual o componente variante do IGF é uma proteína IGF-1 humana de SEQ ID NO:1 que compreende:

- (i) uma deleção de aminoácidos nas posições 1 a 3, 37 e 68 a 70 ($\Delta 1-3$, $\Delta 37$, $\Delta 68-70$); ou
- (ii) uma deleção de aminoácidos nas posições 1 a 3, 37 e 65-70 ($\Delta 1-3$, $\Delta 37$, $\Delta 65-70$).

2. Dímero da proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1..

3. Ácido nucleico que codifica a proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1..

4. Vector que compreende o ácido nucleico de acordo com a reivindicação 3..

5. Sistema hospedeiro-vector que compreende o vector de acordo com a reivindicação 4..

6. Sistema hospedeiro-vector de acordo com a reivindicação 5., no qual se escolhe a célula hospedeira entre uma célula bacteriana, de levedura, de insecto e de mamífero.

7. Processo de produção de uma proteína de fusão, que compreende a cultura de uma célula hospedeira transfectada com o vector de acordo com a reivindicação 4., sob condições apropriadas para a expressão da proteína a partir da célula hospedeira, e a recuperação do polipéptido assim produzido.

8. Composição farmacêutica que compreende a proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1. e um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

9. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1., para utilização em um método terapêutico destinado ao tratamento de uma doença ou de uma afecção escolhida entre atrofia muscular, nanismo, infarto do miocárdio, osteoporose, fraqueza ou fragilidade relacionada com a idade, sarcopénia, uma doença ou situação que implique perda de massa corporal, caquécia, insuficiência cardíaca congestiva, talassémia, diabetes, hiperglicémia e anemia, ou para o tratamento de um paciente em risco de desenvolver essa doença ou afecção.

10. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 9., para utilização em um método terapêutico no qual a mencionada atrofia muscular é consequência de desnervação; neuropatia degenerativa, metabólica ou inflamatória; atrofias musculares espinais infantis e juvenis; neuropatia motora auto-imunitária; doenças crónicas, SIDA, jejum ou rabdomiólise; síndrome de distrofia muscular; sarcopénia; imobilização; envelhecimento; ou como consequência de tratamento com um agente que induz atrofia.

11. Utilização de uma proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1., na manufactura de um medicamento para o tratamento de uma doença ou afecção escolhida entre atrofia

muscular, nanismo, infarto do miocárdio, osteoporose, fraqueza ou fragilidade relacionada com a idade, sarcopénia, uma doença ou situação que implique perda de massa corporal, caquécia, insuficiência cardíaca congestiva, talassémia, diabetes, hiperglicémia e anemia, ou para o tratamento de um paciente em risco de desenvolver essa doença ou afecção.

12. Utilização de acordo com a reivindicação 11., na qual a mencionada atrofia muscular é a definida na reivindicação 10..

13. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1., para utilização em um método de tratamento do corpo humano ou de outro animal.

Lisboa, 30 de Julho de 2015.

RESUMO**"POLIPÉPTIDOS DE FUSÃO QUE CONTÊM O IGF-1 E UTILIZAÇÕES
TERAPÊUTICAS DESSES POLIPÉPTIDOS"**

A presente invenção diz respeito a uma proteína de fusão que compreende pelo menos um componente variante ("*variant*") do IGF1 e um componente de fusão (F), e, facultativamente uma sequência de sinal, exibindo estabilidade melhorada relativa ao polipéptido IGF1 ou IGF2 nativo. O componente de fusão (F) pode ser um componente responsável pela multimerização, um ligando de "*targeting*" (condução até ao alvo), ou um outro composto activo ou terapêutico. As variantes do IGF1 demonstraram possuir maior capacidade para induzir hipertrofia da musculatura esquelética relacionada com o IGF1 nativo.

