



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

(21) BR 112019023860-3 A2



(22) Data do Depósito: 11/05/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 08/09/2020

(54) **Título:** PROTEÍNAS DE FUSÃO FOLISTATINA RECOMBINANTE-FC E USO NO TRATAMENTO DE DISTROFIA DE DUCHENNE

(51) **Int. Cl.:** C07K 14/47; A61K 38/17.

(30) **Prioridade Unionista:** 12/05/2017 US 62/505,642; 17/01/2018 US 62/618,376.

(71) **Depositante(es):** SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC..

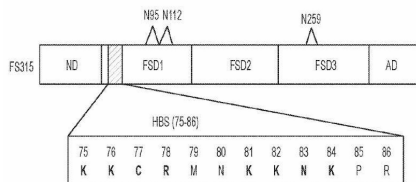
(72) **Inventor(es):** HAOJING RONG; ANDREA ISKENDERIAN; ANGELA W. NORTON; CHUAN SHEN; CLARK PAN.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2018032332 de 11/05/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2018/209242 de 15/11/2018

(85) **Data da Fase Nacional:** 12/11/2019

(57) **Resumo:** A presente invenção refere-se, inter alia, métodos e composições para o tratamento de distrofia muscular, em particular Distrofia Muscular de Duchenne (DMD). Em algumas formas de realização, um método de acordo com a presente invenção compreende a administração a um indivíduo que sofre de DMD, ou é susceptível de ser obtida, de uma quantidade eficaz de uma proteína de fusão recombinante de foliestatina em que pelo menos um sintoma ou DMD característica é reduzida em intensidade, a gravidade ou a frequência, ou tem um início tardio.



PROTEÍNAS DE FUSÃO FOLISTATINA RECOMBINANTE-FC E USO NO
TRATAMENTO DE DISTROFIA DE DUCHENNE

PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Esse pedido reivindica prioridade para, e o benefício do Pedido U.S. Provisório número 62/618.376, depositado em 17 de janeiro de 2018, e Pedido U.S. Provisório número 62/505.642, depositado em 12 de maio de 2017, cujo conteúdo de cada um deles é incorporado nesse relatório descritivo por referência em sua totalidade.

FUNDAMENTOS

[002] A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é um distúrbio recessivo ligado ao X e se estima afete 1:3.600 nascimentos do sexo masculino, com uma estimativa de 50.000 indivíduos afetados em todo o mundo. O distúrbio é marcado por uma perda progressiva dos músculos e as crianças afetadas dependem de cadeira de rodas quando atingem 13 anos de idade. Os indivíduos afetados normalmente se apresentam com sintomas aos 3 anos de idade, com a sobrevida mediana para esses indivíduos sendo entre 25 e 30 anos de idade. Insuficiência respiratória em função de fraqueza diafragmática e cardiomiopatia são causas de morte comuns.

[003] A DMD é causada por uma mutação no gene de distrofina. O gene de distrofina está localizado no cromossomo X e codifica a proteína distrofina. A proteína distrofina é responsável pela conexão do maquinário contrátil (complexo actina-miosina) de uma fibra muscular à matriz extracelular circundante por meio do complexo distroglicano. Mutações no gene de distrofina resultam em alteração ou ausência da proteína distrofina e função anormal da membrana do sarcolema. Embora homens e mulheres possam

carregar uma mutação no gene de distrofina, as mulheres raramente são afetadas com DMD.

[004] Uma característica da DMD é a isquemia dos tecidos afetados. A isquemia é uma restrição ou diminuição no suprimento sanguíneo aos tecidos ou órgãos, causando uma redução de oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular. A isquemia é geralmente causada por constrição ou obstrução de vasos sanguíneos resultando em dano ou disfunção do tecido ou órgão. O tratamento da isquemia é dirigido ao aumento do fluxo sanguíneo ao tecido ou órgão afetado.

[005] Atualmente, não há cura para DMD. Várias avenidas terapêuticas foram investigadas, incluindo terapia gênica e administração de corticosteróide; no entanto, ainda existe a necessidade por alternativas para pacientes com DMD.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[006] A presente invenção fornece, entre outras coisas, métodos e composições aprimorados para o tratamento de DMD com base na administração de uma proteína de fusão folistatina-Fc recombinante. A invenção engloba, *inter alia*, a observação inesperada de que certas modificações de aminoácidos no polipeptídeo folistatina resultam em proteína folistatina aprimorada que visa especificamente miostatina e activina A com alta afinidade e não se liga a BMPs não-alvo ou heparina com afinidade significativa. Está contemplado que a ativação da via de Smad2/3 por miostatina e activina A leva à inibição da expressão de proteína miogênica e, como resultado, mioblastos não se diferenciam em músculo. Portanto, miostatina e activina são alvos viáveis para a estimulação de regeneração muscular. No entanto, antagonistas de miostatina e activina, incluindo folistatina

("FS"), podem se ligar às proteínas morfogênicas ósseas (BMPs) em função de certas similaridades estruturais. BMPs, especialmente, BMP-9 e BMP-10, são sinais morfogênicos cruciais, orquestrando a arquitetura de tecidos por todo o corpo. A inibição desses BMPs pode levar a condições patológicas indesejáveis. A folistatina também se liga aos proteoglicanos de sulfato de heparano da superfície celular por meio de uma seqüência de ligação à heparina (HBS) básica no primeiro de três domínios FS. Está contemplado que a inativação, redução ou modulação de ligação à heparina pode aumentar a exposição e/ou meia-vida *in vivo* de folistatina. Dessa forma, a presente invenção fornece folistatina aprimorada que possui meia-vida mais longa e é mais potente para tratamento eficaz de DMD.

[007] Em um aspecto, a presente invenção fornece polipeptídeos folistatina recombinantes que compreendem uma seqüência de aminoácidos pelo menos 80% idêntica ao ID. DE SEQ. Nº 1, ID. DE SEQ. Nº 2, ID. DE SEQ. Nº 3, ID. DE SEQ. Nº 4 ou ID. DE SEQ. Nº 5, em que a proteína folistatina recombinante possui um domínio de ligação à heparina (HBS), e em que um ou mais aminoácidos dentro do HBS são substituídos com um aminoácido que possui uma carga menos positiva em comparação com o aminoácido substituído. Em uma modalidade, os (um ou mais) aminoácidos dentro do HBS são substituídos com um aminoácido que possui uma carga neutra. Em uma modalidade, os (um ou mais) aminoácidos dentro do HBS são substituídos com um aminoácido que possui uma carga negativa. Em uma modalidade, os (um ou mais) aminoácidos compreendem pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 aminoácidos. Em uma modalidade, os (um ou mais) aminoácidos

compreendem 3 aminoácidos. Em uma modalidade, o polipeptídeo recombinante possui afinidade de ligação à heparina diminuída em comparação com folistatina de ocorrência natural. Em uma modalidade, o aumento dos números de substituições de aminoácidos dentro do HBS diminui progressivamente a afinidade de ligação à heparina. Em uma modalidade, o número de substituições de aminoácidos dentro do HBS é de 2 aminoácidos. Em uma modalidade, o número de substituições de aminoácidos dentro do HBS é de 3 aminoácidos. Em uma modalidade, as substituições de aminoácidos são feitas no motivo BBXB identificado por resíduos de aminoácidos 81-84 do domínio HBS. Em uma modalidade, as substituições de aminoácidos são feitas no motivo BBXB identificado por resíduos de aminoácidos 75-78 do domínio HBS. Em uma modalidade, os primeiros dois resíduos de aminoácidos básicos são substituídos com um resíduo de aminoácido que é carregado negativamente ou neutro. Em uma modalidade, os primeiros dois resíduos de aminoácidos básicos são substituídos com um resíduo de aminoácido que é carregado negativamente.

[008] Em uma modalidade, a proteína folistatina recombinante não se liga à BMP-9 ou BMP-10. Em uma modalidade, a proteína folistatina recombinante possui uma sequência pelo menos 80% idêntica a qualquer um dos IDS. DE SEQ. N^{os} 12-40 ou IDS. DE SEQ. N^{os} 101-106.

[009] Em um aspecto, a presente invenção fornece polipeptídeos folistatina recombinantes que compreendem uma sequência de aminoácidos pelo menos 80% idêntica ao ID. DE SEQ. N^o: 2, ID. DE SEQ. N^o: 4 ou ID. DE SEQ. N^o: 5 e em que os aminoácidos que correspondem às posições 66 a 88 do ID.

DE SEQ. Nº: 2, ID. DE SEQ. Nº: 4 ou ID. DE SEQ. Nº: 5 são idênticos a qualquer um do ID. DE SEQ. Nº: 42-67 ou ID. DE SEQ. Nº: 111-116. Em algumas modalidades, a seqüência de aminoácidos que corresponde às posições 66 a 88 do ID. DE SEQ. Nº 2, ID. DE SEQ. Nº 4 ou ID. DE SEQ. Nº 5 são idênticas a qualquer um do ID. DE SEQ. Nº 58-67 ou ID. DE SEQ. Nº 111-113. Em algumas modalidades, o polipeptídeo folistatina recombinante é um mutante de hiperglicosilação. Em algumas modalidades, a seqüência de aminoácidos do polipeptídeo folistatina recombinante é pelo menos 90% idêntica ao ID. DE SEQ. Nº: 2, ID. DE SEQ. Nº: 4 ou ID. DE SEQ. Nº: 5. Em algumas modalidades, a seqüência de aminoácidos do polipeptídeo folistatina recombinante é pelo menos 95% idêntica ao ID. DE SEQ. Nº: 2, ID. DE SEQ. Nº: 4 ou ID. DE SEQ. Nº: 5. Em algumas modalidades, a seqüência de aminoácidos do polipeptídeo folistatina recombinante é pelo menos 98% idêntica ao ID. DE SEQ. Nº: 2, ID. DE SEQ. Nº: 4 ou ID. DE SEQ. Nº: 5. Em algumas modalidades, a seqüência de aminoácidos do polipeptídeo folistatina recombinante é 100% idêntica ao ID. DE SEQ. Nº: 2, ID. DE SEQ. Nº: 4 ou ID. DE SEQ. Nº: 5.

[010] Em um aspecto, a presente invenção fornece polipeptídeos folistatina recombinantes que compreendem uma seqüência de aminoácidos pelo menos 80% idêntica ao ID. DE SEQ. Nº: 2, ID. DE SEQ. Nº: 4 ou ID. DE SEQ. Nº: 5 e que compreendem qualquer uma das variações de aminoácidos selecionadas do grupo que consiste em C66S, C66A, G74N, K75E, K75N, K76A, K76D, K76S, K76E, C77S, C77T, R78E, R78N, N80T, K81A, K81D, K82A, K82D, K81E, K82T, K82E, K84E, P85T, R86N, V88E e V88T, ou combinações destas. Em algumas modalidades,

a sequência de aminoácidos do polipeptídeo folistatina recombinante é pelo menos 90% idêntica ao ID. DE SEQ. Nº: 2, ID. DE SEQ. Nº: 4 ou ID. DE SEQ. Nº: 5. Em algumas modalidades, a sequência de aminoácidos do polipeptídeo folistatina recombinante é pelo menos 95% idêntica ao ID. DE SEQ. Nº: 2, ID. DE SEQ. Nº: 4 ou ID. DE SEQ. Nº: 5. Em algumas modalidades, a sequência de aminoácidos do polipeptídeo folistatina recombinante é pelo menos 98% idêntica ao ID. DE SEQ. Nº: 2, ID. DE SEQ. Nº: 4 ou ID. DE SEQ. Nº: 5. Em algumas modalidades, a sequência de aminoácidos do polipeptídeo folistatina recombinante é 100% idêntica ao ID. DE SEQ. Nº: 2, ID. DE SEQ. Nº: 4 ou ID. DE SEQ. Nº: 5.

[011] Em um aspecto, a presente invenção fornece polipeptídeos folistatina recombinantes que compreendem uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste no ID. DE SEQ. Nº: 12, ID. DE SEQ. Nº: 17-30 e ID. DE SEQ. Nº: 32-40.

[012] Em um aspecto, a presente invenção fornece proteínas de fusão de folistatina recombinante que compreendem um polipeptídeo folistatina recombinante e um domínio Fc de IgG.

[013] Em um aspecto, a presente invenção fornece proteínas de fusão de folistatina recombinante que compreendem um polipeptídeo folistatina e um domínio Fc de IgG humana, em que o polipeptídeo folistatina recombinante compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos 80% idêntica ao ID. DE SEQ. Nº: 2, ID. DE SEQ. Nº: 4 ou ID. DE SEQ. Nº: 5 e em que os aminoácidos que correspondem às posições 66 a 88 do ID. DE SEQ. Nº: 2, ID. DE SEQ. Nº: 4 ou

ID. DE SEQ. N°: 5 são idênticos ao ID. DE SEQ. N°: 41, 42, 43 ou 58. Em algumas modalidades, o polipeptídeo folistatina recombinante compreende uma seqüência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica ao ID. DE SEQ. N°: 2, ID. DE SEQ. N°: 4 ou ID. DE SEQ. N°: 5. Em algumas modalidades, o polipeptídeo folistatina recombinante compreende uma seqüência de aminoácidos que é pelo menos 95% idêntica ao ID. DE SEQ. N°: 2, ID. DE SEQ. N°: 4 ou ID. DE SEQ. N°: 5. Em algumas modalidades, o polipeptídeo folistatina recombinante compreende uma seqüência de aminoácidos que é pelo menos 98% idêntica ao ID. DE SEQ. N°: 2, ID. DE SEQ. N°: 4 ou ID. DE SEQ. N°: 5. Em algumas modalidades, o polipeptídeo folistatina recombinante compreende uma seqüência de aminoácidos que é 100% idêntica ao ID. DE SEQ. N°: 2, ID. DE SEQ. N°: 4 ou ID. DE SEQ. N°: 5.

[014] Em um aspecto, a presente invenção fornece proteínas de fusão de folistatina recombinante que compreendem um polipeptídeo folistatina e um domínio Fc de IgG, em que o polipeptídeo folistatina compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer um do grupo que consiste no ID. DE SEQ. N°: 12, ID. DE SEQ. N°: 13, e ID. DE SEQ. N°: 15 ao ID. DE SEQ. N°: 40.

[015] Em algumas modalidades, o domínio Fc de IgG compreende uma substituição de aminoácido, em que a substituição de aminoácido é selecionada do grupo que consiste em L234A, L235A, H433K, N434F, e combinações destas, de acordo com a numeração de EU.

[016] Em algumas modalidades, o domínio Fc de IgG compreende uma seqüência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°6 e em que a seqüência de aminoácidos compreende uma

substituição de aminoácido selecionada do grupo que consiste em L234A, L235A, H433K, N434F, e combinações destas, de acordo com a numeração de EU.

[017] Em algumas modalidades, o domínio Fc de IgG compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste no ID. DE SEQ. N°7 ao ID. DE SEQ. N°: 11. Em algumas modalidades, o domínio Fc de IgG é um domínio Fc de IgG humana. Em algumas modalidades, o domínio Fc de IgG é um domínio Fc de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4.

[018] Em um aspecto, a presente invenção fornece proteínas de fusão de folistatina recombinante que compreendem uma sequência de aminoácidos de qualquer um do ID. DE SEQ. N°73 ao ID. DE SEQ. N°: 100.

[019] Em algumas modalidades, a proteína de fusão de folistatina recombinante se liga à miostatina com uma constante de dissociação de afinidade (K_D) de 1 a 100 pM. Em algumas modalidades, a proteína de fusão de folistatina recombinante se liga à activina A com uma constante de dissociação de afinidade (K_D) de 1 a 100 pM. Em algumas modalidades, a proteína de fusão de folistatina recombinante não se liga à proteína morfogênica óssea-9 (BMP-9) e/ou proteína morfogênica óssea-10 (BMP-10) na faixa de 0,2 nM a 25 nM. Em algumas modalidades, a proteína de fusão de folistatina recombinante se liga à heparina com uma constante de dissociação de afinidade (K_D) de 0,1 a 200 nM. Em algumas modalidades, a proteína de fusão de folistatina recombinante se liga ao receptor Fc com uma constante de dissociação de afinidade (K_D) de 25 a 400 nM.

[020] Em algumas modalidades, a proteína de fusão de folistatina recombinante inibe miostatina em uma IC_{50} de 0,1

a 10 nM. Em algumas modalidades, a proteína de fusão de folistatina recombinante inibe activina em uma IC₅₀ de 0,1 a 10 nM. Em algumas modalidades, a proteína de fusão de proteína folistatina recombinante possui meia-vida aumentada em comparação com folistatina do tipo selvagem.

[021] Em um aspecto, a presente invenção fornece composições farmacêuticas que compreendem uma proteína de fusão de folistatina recombinante e um carreador farmacêuticamente aceitável.

[022] Em um aspecto, a presente invenção fornece um polinucleotídeo que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica o polipeptídeo folistatina recombinante.

[023] Em um aspecto, a presente invenção fornece um polinucleotídeo que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína de fusão de folistatina recombinante. Em algumas modalidades, um vetor de expressão compreende o polinucleotídeo. Em algumas modalidades, uma célula hospedeira compreende um polinucleotídeo ou um vetor de expressão.

[024] Em um aspecto, a presente invenção fornece um método de produção de uma proteína de fusão de folistatina recombinante que se liga especificamente à miostatina e activina A por cultivo da célula hospedeira.

[025] Em um aspecto, a presente invenção fornece uma célula de hibridoma que produz um polipeptídeo folistatina recombinante ou uma proteína de fusão de folistatina recombinante.

[026] Em um aspecto, a presente invenção fornece um método de tratamento de Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), o método compreendendo a administração a um indivíduo que

sofre de ou suscetível à DMD de uma quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante ou de uma composição farmacêutica que compreenda proteína de fusão de folistatina recombinante, de modo que pelo menos um sintoma ou característica de DMD seja reduzido em intensidade, severidade ou frequência, ou tenha o surgimento retardado.

[027] Em algumas modalidades, o método ainda compreende a administração de indivíduo de um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Em algumas modalidades os (um ou mais) agentes terapêuticos adicionais são selecionados do grupo que consiste em um anticorpo anti-Flt-1 ou fragmento deste, edasalonexent, pamrevlumab prednisona, deflazacort, produtos terapêuticos de modulação de RNA, produtos terapêuticos para uso alternativo de éxon (*exon-skipping*) e terapia gênica.

[028] Em algumas modalidades, uma quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é administrada parenteralmente. Em algumas modalidades, a administração parenteral é selecionada do grupo que consiste em administração intravenosa, intradérmica, intratecal, por inalação, transdérmica (tópica), intra-ocular, intramuscular, subcutânea, transmucosa, ou combinações destas. Em algumas modalidades, a administração parenteral é administração intravenosa. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é entre cerca de 1 mg/kg e 50 mg/kg administrada por via intravenosa. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é entre cerca de 8 mg/kg e 15 mg/kg administrada por via intravenosa. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz da

proteína de fusão de folistatina recombinante é pelo menos cerca de 8 mg/kg. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é pelo menos cerca de 10 mg/kg. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é pelo menos cerca de 50 mg/kg. Em algumas modalidades, a administração intravenosa ocorre uma vez por mês. Em algumas modalidades, a administração parenteral é administração subcutânea. Em algumas modalidades, em que a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é entre cerca de 2 mg/kg e 100 mg/kg administrada por via subcutânea. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é entre cerca de 3 mg/kg e 30 mg/kg administrada por via subcutânea. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é entre cerca de 2 mg/kg e 5 mg/kg administrada por via subcutânea. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é pelo menos cerca de 2 mg/kg. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é pelo menos cerca de 3 mg/kg. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz de proteína de fusão de folistatina recombinante é pelo menos cerca de 30 mg/kg. Em algumas modalidades, a administração subcutânea ocorre uma vez por semana, duas vezes por semana, ou três vezes por semana. Em algumas modalidades, a administração subcutânea ocorre uma vez por semana. Em algumas modalidades, a administração de proteína de fusão de folistatina recombinante é proporcional à dose. Em algumas modalidades, a administração de proteína de fusão de folistatina

recombinante é uma dose linear.

[029] Em algumas modalidades, a proteína de fusão de folistatina recombinante é liberada a um ou mais músculos esqueléticos selecionados da **Tabela 1**. Em algumas modalidades, a administração da proteína de fusão de folistatina recombinante resulta em um aumento na massa de um músculo em relação a um controle. Em algumas modalidades, o músculo é um ou mais músculos esqueléticos selecionados da **Tabela 1**. Em algumas modalidades, o músculo é selecionado do grupo que consiste em diafragma, tríceps, solear, tibial anterior, gastrocnêmio, extensor digital longo, reto abdominal, quadríceps, e combinações destes. Em algumas modalidades, o músculo é o músculo gastrocnêmio. Em algumas modalidades, o aumento na massa do músculo é um aumento de pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200% ou 500% em relação a um controle.

[030] Em algumas modalidades, a administração da proteína de fusão de folistatina recombinante resulta em regeneração muscular, força muscular aumentada, flexibilidade aumentada, amplitude de movimento aumentada, energia aumentada, fadigabilidade reduzida, fluxo sanguíneo aumentado, cognição aprimorada, função pulmonar melhorada, inibição da inflamação, fibrose muscular reduzida, necrose muscular reduzida e/ou peso corporal aumentado.

[031] Em algumas modalidades, o (pelo menos um) sintoma ou característica de DMD é selecionado do grupo que consiste em perda muscular, fraqueza muscular, fragilidade muscular, necrose muscular, fibrose muscular, contratura articular, deformação esquelética, cardiomiopatia, dificuldade na deglutição, função alterada do intestino e da bexiga,

isquemia muscular, déficit cognitivo, disfunção comportamental, dificuldade na socialização, escoliose e alteração da função respiratória.

[032] Em um aspecto, a presente invenção fornece métodos para inibição de miostatina e/ou activina em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao músculo de um indivíduo de uma composição que compreende uma quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é entre cerca de 1 mg/kg e 50 mg/kg administrada por via intravenosa. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é entre cerca de 8 mg/kg e 15 mg/kg administrada por via intravenosa. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é pelo menos cerca de 8 mg/kg. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é pelo menos cerca de 10 mg/kg. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é pelo menos cerca de 50 mg/kg. Em algumas modalidades, a administração intravenosa ocorre uma vez por mês. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é entre cerca de 2 mg/kg e 100 mg/kg administrada por via subcutânea. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é entre cerca de 3 mg/kg e 30 mg/kg administrada por via subcutânea. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é entre cerca de 2 mg/kg e 5 mg/kg administrada por via subcutânea. Em algumas modalidades, a

quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é pelo menos cerca de 2 mg/kg. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é pelo menos cerca de 3 mg/kg. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é pelo menos cerca de 30 mg/kg administrada por via subcutânea. Em algumas modalidades, a administração subcutânea ocorre uma vez por semana, duas vezes por semana, ou três vezes por semana. Em algumas modalidades, a administração subcutânea ocorre uma vez por semana.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[033] Os desenhos são apenas para fins ilustrativos, não para limitação.

[034] A **Figura 1** é uma representação esquemática que mostra a estrutura do domínio de proteína de FS315. FS315 é composta por um domínio do terminal-N (ND), três domínios FS sucessivos com alta homologia (FSD1, FSD2 e FSD3), e uma cauda do terminal-C altamente ácida (AD). O sítio de ligação à heparina (HBS) está localizado no FSD1, e os motivos centrais de ligação à heparina básicos conservados são mostrados em negrito. As posições de três sítios de glicosilação ligada ao N endógenos estão indicadas por triângulos sólidos.

[035] A **Figura 2** retrata uma série de gráficos que mostram os resultados de um ensaio funcional baseado em células *in vitro* de construções de folistatina recombinante. A inibição de miostatina e activina A foi investigada usando um ensaio de repórter de luciferase SMAD2/3 em células de rabdomiossarcoma A204. A Figura 2, painel A, mostra curvas

de IC50 de miostatina e activina A para variantes FS315-hFc representativas. Mutações únicas, duplas e triplas não tiveram efeito sobre atividades funcionais, mas a variante HBS del75-86 teve potência acentuadamente reduzida; a Figura 2, painel B, mostra curvas de IC50 de miostatina e activina A para variantes de hiperglicosilação FS315-hFc representativas. As três variantes hiperglicosiladas, K75N/C77T/K82T, C66A/K75N/C77T e C66S/K75N/C77T, tiveram redução moderada na potência.

[036] As **Figuras 3A e 3B** mostram resultados exemplares que ilustram perfis farmacocinéticos no soro em camundongos CD-1 que receberam a administração de proteínas de fusão folistatina-Fc recombinantes exemplares ou FS315WT-hFc, uma proteína comparadora.

[037] As **Figura 4A e 4B** consistem em um gráfico que demonstra a afinidade de ligação à heparina de construções de folistatina recombinante se correlaciona com a propriedade PK. Os dados retratados nas Figuras 4A e 4B foram obtidos de uma administração intravenosa única de 1 mg/kg de cada variante de ligação à heparina a camundongos (n = 3). A Figura 4A retrata as concentrações plasmáticas vs. tempo após uma administração i.v. única de 1 mg/kg de variantes FS315-Fc. Os perfis farmacocinéticos mostraram que a diminuição da afinidade de ligação à heparina se correlacionava com comportamento PK progressivamente melhorado. A Figura 4B mostra a afinidade de ligação à heparina das variantes FS315-hFc, e a correlação com sua depuração do soro. A afinidade de ligação à heparina diminuída resulta em depuração *in vivo* reduzida.

[038] As **Figuras 5A e 5B** retratam um gel e um gráfico,

respectivamente, relacionados às variantes de hiperglicosilação FS e mudanças resultantes no peso molecular e PI. A Figura 5A retrata um gel com coloração com Azul Coomassie de variantes de hiperglicosilação reduzida FS315-hFc, que foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Setas indicam as variantes que exibiram uma mudança nítida no MW em função de hiperglicosilação. A Figura 5B retrata um gráfico que mostra um perfil de cIEF para duas variantes representativas. A variante hiperglicosilada K75N/C77T/K82T mostrou uma mudança ácida nítida comparada com a variante não hiperglicosilada K82T.

[039] A **Figura 6** é um gráfico que mostra perfis para variantes de hiperglicosilação FS315-hFc. Camundongos receberam uma dose única de 1 mg/kg de proteína por administração intravenosa (n = 3 por grupo). As variantes hiperglicosiladas K75N/C77T/K82T e C66A/K75N/C77T tiveram perfis farmacocinéticos significativamente aprimorados em relação à variante não hiperglicosilada K82T, bem como do tipo selvagem.

[040] A **Figura 7** é um gráfico que mostra força de preensão do membro torácico em camundongos *mdx mdx* tratados com veículo de PBS, FS315K(76,81,82)E-mFc a 10 mg/kg, ou ActRIIB-mFc a 3 mg/kg, em comparação com a força de preensão em camundongos do tipo selvagem. A força de preensão do membro torácico foi medida após 11 semanas de dosagem. Os dados mostram que houve um aumento significativo na força de preensão do membro torácico de camundongos *mdx* tratados com FS315K(76,81,82)E-mFc, comparada com a força de preensão de animais tratados somente com veículo.

[041] A **Figura 8A** retrata seqüências dentro da região de

ligação à heparina para variantes de ligação à heparina FS315-hFc. As seqüências dos resíduos 73-88 na região de ligação à heparina para o tipo selvagem, uma variante de substituição de HBS central Δ HBS, uma variante de deleção de HBS central del75-86, e uma série de variantes com mutação (ou mutações) pontual nos dois motivos básicos BBXB estão listadas na tabela.

[042] A **Figura 8B** retrata seqüências dentro da região de ligação à heparina para variantes de hiperglicosilação FS315-hFc. As seqüências dos resíduos 66-88 nas variantes de hiperglicosilação que criam um ou dois sítios de N-glicosilação de consenso (NXT/S) estão listadas na tabela. A seqüência de ligação à heparina central é mostrada em *itálico*. Os resíduos mutados são mostrados em **negrito**, e que criaram novos sítios de N-glicosilação são mostrados sublinhados.

[043] Na **Figura 9, painéis A-G**, são uma série de gráficos e micrográficos que retratam pesos corporais, pesos do músculo, concentrações séricas de fármaco e análise morfométrica de um estudo em camundongo C57BL/6 de 4 semanas. A Figura 9, painel A, é um gráfico que retrata pesos corporais da dosagem de FS-EEE-mFc. A Figura 9, painel B, é um gráfico que retrata pesos do músculo da dosagem de FS-EEE-mFc. A Figura 9, painel C, é um gráfico que retrata concentrações de FS-EEE-mFc de amostras de soro retiradas imediatamente antes da dosagem. A Figura 9, painel D, é um gráfico que retrata alterações do peso corporal no dia 28 da dosagem de FS-EEE-hFc. A Figura 9, painel E, é um gráfico que retrata pesos do músculo da dosagem de FS-EEE-hFc. A Figura 9, painel F, é uma série de micrográficos que mostram

análise morfométrica do quadríceps por coloração com Oregon Gree® 488 WGA do quadríceps. A Figura 9, painel G, é um gráfico que retrata um histograma de diâmetros de miofibras. *p<0,05 comparado com grupo dosado com veículo.

[044] A **Figura 10, painéis A-G**, são uma série de gráficos e micrográficos que retratam coloração imunoistoquímica e análise por qPCR de quadríceps *mdx*. A Figura 10, painel A, retrata uma imagem representativa de coloração IgG de camundongo-positiva que retrata área de necrose heterogênea do controle de veículo, e a Figura 10, painel B, é um gráfico que mostra toda a análise da imagem da lâmina de todos os grupos de doses. A Figura 10, painel, C retrata uma imagem representativa de coloração CD68-positiva para infiltração de macrófagos do controle de veículo, e a Figura 10, painel D, é um gráfico que mostra a análise total da imagem da lâmina. A Figura 10, painel E, é uma série de micrográficos que retratam coloração colágeno I-positiva para fibrose: (esquerda) controle de veículo e (direita) 30 mg/kg de FS-EEE-mFc. A Figura 10, painel F, é um gráfico que mostra a análise da imagem total de colágeno I. A Figura 10, painel G, é um gráfico que mostra qPCR de marcadores de fibrose e inflamação.

[045] A **Figura 11, painéis A-G**, são uma série gráficos e micrográficos que retratam pesos corporais, pesos do músculo, tamanho da fibra muscular, força de preensão e biomarcadores séricos de um estudo *mdx* sem exercícios de 12 semanas. A Figura 11, painel A, é um gráfico que retrata pesos corporais. A Figura 11, painel B, é um gráfico que retrata pesos do músculo. A Figura 11, painel C, é um gráfico que retrata a área do reto femoral do quadríceps. A Figura

11, painel D, é um micrográfico que retrata coloração por Oregon Green® 488 WGA do quadríceps, exemplo de grupo de veículo. A Figura 11, painel E, é um gráfico que retrata histograma da análise morfométrica do Quadríceps da distribuição do tamanho do diâmetro de miofibra. A Figura 11, painel F, é um gráfico que retrata a força de preensão do membro torácico: (esquerda) absoluta e (direita) normalizada para o peso corporal. A Figura 11, painel (G) é um gráfico que retrata biomarcadores séricos (esquerda) creatina-quinase, (do meio) troponina esquelética 1, (direita) troponina cardíaca 1. $*=p<0,05$ comparado com grupo *mdx* dosado com veículo.

[046] A **Figura 12, painéis A-D**, são uma série de gráficos e micrográficos que retratam coloração imunoistoquímica e análise por qPCR de diafragma *mdx*. A Figura 12, painel A, é um gráfico que retrata análise da imagem de coloração CD68-positiva. A Figura 12, painel B, é um gráfico que retrata análise da imagem de coloração colágeno I-positiva. A Figura 12, painel, C são micrográficos que retratam imagens ampliadas representativas de diafragma corado para colágeno-I: (esquerda) controle de veículo e (direita) 30 mg/kg de FS-EEE-mFc. A Figura 12, painel D, é um gráfico que retrata marcadores de inflamação e fibrose por qPCR. $*=p<0,05$ comparado com grupo *mdx* dosado com veículo.

[047] A **Figura 13, painéis A-H**, são uma série de gráficos que retratam pesos corporais, pesos de tecido, medições funcionais, medições comportamentais e análises séricas de um estudo *mdx* com exercícios de 12 semanas. A Figura 13, painel (A) retrata pesos corporais, (B) retrata pesos do músculo, e (C) retrata pesos dos órgãos. A Figura 13, painel

D, retrata força de preensão do membro torácico (superior) e normalizada para o peso corporal (inferior). A Figura 13, painel E, retrata a força *ex vivo* do músculo EDL (superior) e normalizada para área transversal (inferior). A Figura 13, painel F, retrata distância na esteira ergométrica forçada (superior) e normalizada para o peso corporal (inferior). A Figura 13, painel (G) retrata medições de creatina-quinase sérica e (H) retrata concentrações séricas de fármaco coletado no dia 56. $\ast=p<0,05$ comparado com grupo *mdx* dosado com veículo como descrito.

[048] A **Figura 14, painéis A-D**, são uma série de gráficos e micrográficos que retratam análise de tecido do quadríceps de um estudo *mdx* com exercícios de 12 semanas. Na Figura 14, os painéis A-C são imagens representativas do (superior) controle de veículo e (do meio) 30 mg/kg de FS-EEE-mFc e (inferior) análise total da imagem da lâmina para, painel (A), coloração IgG de camundongo-positiva para necrose, painel (B), coloração CD68-positiva para infiltração de macrófagos, e painel (C), coloração colágeno I-positiva para fibrose. A Figura 14, painel D, retrata qPCR de marcadores de fibrose e inflamação. $\ast=p<0,05$ comparado com grupo *mdx* dosado com veículo.

[049] A **Figura 15, painéis A-D**, são uma série de gráficos e micrográficos que retratam análise de tecido do diafragma de um estudo *mdx* com exercícios de 12 semanas. Os painéis (A-C) retratam imagens representativas do (superior) controle de veículo e (do meio) 30 mg/kg de FS-EEE-mFc e (inferior) análise total da imagem da lâmina para, painel (A), coloração IgG de camundongo-positiva para necrose, painel (B), coloração CD68-positiva para infiltração de

macrófagos, e painel (C), coloração colágeno I-positiva para fibrose. O Painel (D) retrata uma qPCR de marcadores de fibrose e inflamação. $p \leq 0,05$ comparado com grupo *mdx* dosado com veículo.

DEFINIÇÕES

[050] A fim de que a presente invenção seja mais prontamente compreendida, certos termos são primeiro definidos abaixo. Definições adicionais para os termos seguintes e para outros termos são apresentadas ao longo do relatório descritivo.

[051] **Afinidade:** Como é conhecido na técnica, o termo “afinidade” é uma medida do rigor com o qual um ligante particular se liga ao seu parceiro. Em algumas modalidades, o ligante ou parceiro é um polipeptídeo folistatina recombinante. Em algumas modalidades, o ligante ou parceiro é uma proteína de fusão folistatina-Fc recombinante. As afinidades podem ser medidas de diferentes formas. Em algumas modalidades, a afinidade é medida por um ensaio quantitativo. Em algumas dessas modalidades, a concentração do parceiro de ligação pode ser fixada para estar em excesso de concentração de ligante de modo a simular as condições fisiológicas. Alternativamente ou adicionalmente, em algumas modalidades, a concentração de parceiro de ligação e/ou a concentração de ligante pode ser variada. Em algumas dessas modalidades, a afinidade pode ser comparada com uma referência sob condições comparáveis (por exemplo, concentrações).

[052] **Melhora:** Como usado nesse relatório descritivo, o termo “melhora” significa a prevenção, redução ou atenuação de um estado, ou a melhora do estado de um indivíduo. Melhora inclui, mas não exige, recuperação completa ou prevenção

completa de uma condição de doença.

[053] **Animal**: Como usado nesse relatório descritivo, o termo “animal” se refere a qualquer membro do reino animal. Em algumas modalidades, “animal” se refere a humanos, em qualquer estágio de desenvolvimento. Em algumas modalidades, “animal” se refere a animais não humanos, em qualquer estágio de desenvolvimento. Em certas modalidades, o animal não humano é um mamífero (por exemplo, um roedor, um camundongo, um rato, um coelho, um macaco, um cão, um gato, um carneiro, gado, um primata e/ou um porco). Em algumas modalidades, animais incluem, sem limitação, mamíferos, pássaros, répteis, anfíbios, peixes e/ou vermes. Em algumas modalidades, um animal pode ser um animal transgênico, um animal modificado geneticamente e/ou um clone.

[054] **Aproximadamente ou cerca de**: Como usado nesse relatório descritivo, o termo “aproximadamente” ou “cerca de”, como aplicado a um ou mais valores de interesse, se refere a um valor que é similar a um valor de referência estabelecido. Em certas modalidades, o termo “aproximadamente” ou “cerca de” se refere a uma faixa de valores que caem dentro de 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, ou menos em qualquer direção (maior do que ou menor do que) do valor de referência estabelecido, salvo indicação em contrário ou de algum outro modo evidente pelo contexto (exceto quando esse número excedesse 100% de um valor possível).

[055] **Associado com**: Dois eventos ou entidades estão “associados” uns aos outros, como o termo é usado nesse relatório descritivo, se a presença, nível e/ou forma de um

está correlacionada com aquela do outro. Por exemplo, uma entidade particular (por exemplo, polipeptídeo) é considerado como estando associado com uma doença, distúrbio ou condição particular se sua presença, nível e/ou forma se correlaciona com a incidência e/ou suscetibilidade à doença, distúrbio ou condição (por exemplo, através de uma população relevante). Em algumas modalidades, duas ou mais entidades estão fisicamente “associadas” umas às outras se elas interagem, diretamente ou indiretamente, de modo que estejam e permaneçam em proximidade física entre elas. Em algumas modalidades, duas ou mais entidades que estão fisicamente associadas entre elas estão ligadas covalentemente umas às outras; em algumas modalidades, duas ou mais entidades que estão fisicamente associadas entre elas não estão ligadas covalentemente umas às outras, mas estão associadas não covalentemente, por exemplo, por meio de ligações hidrogênio, interação de van der Waals, interações hidrofóbicas, magnetismo, e combinações destes.

[056] **Biodisponibilidade**: Como usado nesse relatório descritivo, o termo “biodisponibilidade” geralmente se refere à percentagem da dose administrada que alcança a corrente sanguínea de um indivíduo.

[057] **Biologicamente ativo**: Como usada nesse relatório descritivo, a frase “biologicamente ativo” se refere a uma característica de qualquer agente que possui atividade em um sistema biológico e, particularmente, em um organismo. Por exemplo, um agente que, quando administrado a um organismo, possui um efeito biológico sobre aquele organismo, é considerado como sendo biologicamente ativo. Em modalidades particulares, quando um peptídeo é biologicamente ativo, uma

porção daquele peptídeo que compartilha pelo menos uma atividade biológica do peptídeo é tipicamente referida como uma porção “biologicamente ativa”.

[058] **Músculo cardíaco:** Como usado nesse relatório descritivo, o termo “músculo cardíaco” se refere a um tipo de músculo estriado involuntário encontrado nas paredes do coração e, particularmente, no miocárdio.

[059] **Carreador ou diluente:** Como usados nesse relatório descritivo, os termos “carreador” e “diluente” se referem um carreador ou substância de diluição farmacologicamente aceitável (por exemplo, seguro e atóxico para administração a um humano) útil para a preparação de uma formulação farmacêutica. Diluentes exemplares incluem água estéril, água bacteriostática para injeção (BWFI), uma solução com pH tamponado (por exemplo, solução salina tamponada com fosfato), solução salina estéril, solução de Ringer ou solução de dextrose.

[060] **Forma de dosagem:** Como usados nesse relatório descritivo, os termos “forma de dosagem” e “forma de dosagem unitária” se referem a uma unidade fisicamente distinta de uma proteína terapêutica (por exemplo, polipeptídeo folistatina recombinante ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante) para o paciente a ser tratado. Cada unidade contém uma quantidade predeterminada de material ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado. Deve ser subentendido, no entanto, que a dosagem total da composição será decidida pelo médico responsável dentro do escopo de uma avaliação médica sólida.

[061] **Folistatina ou folistatina recombinante:** Como usado nesse relatório descritivo, o termo “folistatina (FS)”

ou “folistatina recombinante” se refere a quaisquer proteínas ou polipeptídeos folistatina do tipo selvagem ou modificados (por exemplo, proteínas folistatina com mutações, deleções, inserções de aminoácidos, e/ou proteínas de fusão) que retêm atividade biológica substancial de folistatina, salvo especificação em contrário.

[062] **Região Fc:** Como usado nesse relatório descritivo, o termo “região Fc” se refere a um dímero de dois “polipeptídeos Fc”, cada “polipeptídeo Fc” compreendendo a região constante de um anticorpo, excluindo o primeiro domínio da região constante de imunoglobulina. Em algumas modalidades, uma “região Fc” inclui dois polipeptídeos Fc ligados por uma ou mais ligações dissulfeto, vinculadores químicos ou vinculadores peptídicos. O termo “polipeptídeo Fc” se refere aos últimos dois domínios da região constante de imunoglobulina de IgA, IgD e IgG, e os últimos três domínios da região constante de imunoglobulina de IgE e IgM, e também pode incluir parte ou toda a dobradiça flexível terminal-N a esses domínios. Para IgG, “polipeptídeo Fc” compreende domínios de imunoglobulina C γ 2 (C γ 2) e C γ 3 (C γ 3) e a parte inferior da dobradiça entre C γ 1 (C γ 1) e C γ 2. Embora as fronteiras do polipeptídeo Fc possam variar, o polipeptídeo Fc da cadeia pesada de IgG humana é normalmente definido para compreender resíduos que começam em T223 ou C226 ou P230, até seu terminal carboxil, em que a numeração é de acordo com o índice de EU como em Kabat e cols., (1991, Publicação NIH 91-3242, “National Technical Information Services”, Springfield, VA). Para IgA, o polipeptídeo Fc compreende os domínios de imunoglobulina C α 2 (C α 2) e C α 3 (C α 3) e a parte inferior da dobradiça

entre Calfa1 ($C\alpha 1$) e $C\alpha 2$. Uma região Fc pode ser sintética, recombinante ou gerada por fontes naturais como, por exemplo, IVIG.

[063] **Equivalente ou derivado funcional:** Como usado nesse relatório descritivo, o termo “equivalente funcional” ou “derivado funcional” significa, no contexto de um derivado funcional de uma seqüência de aminoácidos, uma molécula que retém uma atividade biológica (seja uma função ou estrutural) que é substancialmente similar àquela da seqüência original. Um derivado ou equivalente funcional pode ser um derivado natural ou é preparado sinteticamente. Derivados funcionais exemplares incluem seqüências de aminoácidos que possuem substituições, deleções ou adições de um ou mais aminoácidos, desde que a atividade biológica da proteína seja conservada. O aminoácido substituinte desejavelmente possui propriedades físico-químicas que são similares àquela do aminoácido substituído. Propriedades físico-químicas similares desejáveis incluem, similaridades em carga, volume, hidrofobicidade, hidrofiliicidade e semelhantes.

[064] **Proteína de fusão:** Como usado nesse relatório descritivo, o termo “proteína de fusão” ou “proteína quimérica” se refere a uma proteína criada por meio da união de duas ou mais proteínas originalmente separadas, ou porções destas. Em algumas modalidades, um vinculador ou espaçador estará presente entre cada proteína. Um exemplo não limitante de uma proteína de fusão é uma proteína de fusão-Fc. Um exemplo não limitante de uma proteína de fusão é uma proteína de fusão folistatina-Fc.

[065] **Meia-vida:** Como usado nesse relatório descritivo, o termo “meia-vida” é o tempo necessário para que uma

quantidade como, por exemplo, concentração ou atividade de proteína, caia à metade de seu valor como medido no começo de um período de tempo.

[066] **Hipertrofia:** Como usado nesse relatório descritivo, o termo “hipertrofia” se refere ao aumento no volume de um órgão ou tecido em função do aumento de suas células componentes.

[067] **Intensificar, aumentar ou reduzir:** Como usados nesse relatório descritivo, os termos “intensificar”, “aumentar” ou “reduzir”, ou equivalentes gramaticais, indicam valores que são em relação a uma medição no nível de base, por exemplo, uma medição no mesmo indivíduo antes do início do tratamento descrito nesse relatório descritivo, ou uma medição em um indivíduo de controle (ou em múltiplos indivíduos de controle) na ausência do tratamento descrito nesse relatório descritivo. Um “indivíduo de controle” é um indivíduo que sofre da mesma forma de doença que o indivíduo a ser tratado, que tem aproximadamente a mesma idade que o indivíduo a ser tratado.

[068] **Inibição:** Como usados nesse relatório descritivo, os termos “inibição”, “inibir” e “que inibe” se referem aos processos ou métodos de diminuição ou redução da atividade e/ou expressão de uma proteína ou um gene de interesse. Tipicamente, a inibição de uma proteína ou um gene se refere à redução da expressão ou de uma atividade relevante da proteína ou gene por pelo menos 10% ou mais, por exemplo, 20%, 30%, 40%, ou 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou mais, ou uma diminuição na expressão ou na atividade relevante de mais do que 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 50 vezes, 100 vezes ou mais, como medida por um ou mais métodos

descritos nesse relatório descritivo ou reconhecidos na técnica.

[069] ***In Vitro***: Como usado nesse relatório descritivo, o termo "*in vitro*" se refere aos eventos que ocorrem em um ambiente artificial, por exemplo, em um tubo de ensaio ou vaso de reação, em cultura de células etc., ao invés de dentro de um organismo multicelular.

[070] ***In Vivo***: Como usado nesse relatório descritivo, o termo "*in vivo*" se refere aos eventos que ocorrem dentro de um organismo multicelular, por exemplo, um humano e um animal não humano. No contexto de sistemas à base de células, o termo pode ser usado para se referir aos eventos que ocorrem dentro de uma célula viva (ao contrário, por exemplo, de sistemas *in vitro*).

[071] **K_D** : Como usado nesse relatório descritivo, o termo " K_D ", como usado nesse relatório descritivo, visa se referir à constante de dissociação, que é obtida a partir da proporção de K_d para K_a (ou seja, K_d/K_a) e é expressa como uma concentração molar (M). Os valores de K_D para um ligante podem ser determinados com o uso de métodos bem estabelecidos na técnica. Um método preferido para determinação da K_D de um ligante é por utilização de ressonância de plásmen de superfície, preferivelmente com o uso de um sistema biossensor como, por exemplo, um sistema BIAcore®.

[072] ***Vinculador***: Como usado nesse relatório descritivo, o termo "vinculador" se refere, em uma proteína de fusão, a uma sequência de aminoácidos diferente da que aparece em uma posição particular na proteína natural e é geralmente projetada para ser flexível ou para se interpor a uma estrutura, por exemplo, uma hélice- α , entre duas porções de

proteína. Um vinculador também é referido como um espaçador. Um vinculador ou um espaçador tipicamente não possui função biológica por ele próprio.

[073] **Farmacologicamente aceitável:** Como usado nesse relatório descritivo, o termo “farmacologicamente aceitável” se refere às substâncias que, dentro do escopo de uma avaliação médica sólida, são adequadas para uso em contato com os tecidos de seres humanos e animais sem toxicidade excessiva, irritação, resposta alérgica, ou outro problema ou complicação, compatível com uma proporção risco/benefício razoável.

[074] **Polipeptídeo:** O termo “polipeptídeo”, como usado nesse relatório descritivo, se refere a uma cadeia sequencial de aminoácidos ligados juntos por meio de ligações peptídicas. O termo é usado para se referir a uma cadeia de aminoácidos de qualquer comprimento, mas aqueles habilitados na técnica compreenderão que o termo não está limitado às cadeias longas e pode ser referir a uma cadeia mínima que compreende dois aminoácidos ligados juntos por meio de um ligação peptídica. Como é conhecido por aqueles habilitados na técnica, polipeptídeos podem ser processados e/ou modificados. Como usados nesse relatório descritivo, os termos “polipeptídeo” e “peptídeo” são usados de forma intercambiável.

[075] **Prevenir:** Como usado nesse relatório descritivo, o termo “prevenir” ou “prevenção”, quando usado em conexão com a ocorrência de uma doença, distúrbio e/ou condição, se refere à redução do risco de desenvolvimento da doença, distúrbio e/ou condição. Veja a definição de “risco”.

[076] **Proteína:** O termo “proteína”, como usado nesse

relatório descritivo, se refere a um ou mais polipeptídeos que funcionam como uma unidade distinta. Se um único polipeptídeo é a unidade distinta funcionante e não exige associação física permanente ou temporária com outros polipeptídeos a fim de formar a unidade funcionante distinta, os termos “polipeptídeo” e “proteína” podem ser usados de forma intercambiável. Se a unidade funcional distinta é composta por mais de um polipeptídeo que se associam fisicamente uns com os outros, o termo “proteína” se refere aos múltiplos polipeptídeos que estão acoplados fisicamente e funcionam juntos como a unidade distinta.

[077] **Risco:** Como será subentendido pelo contexto, um “risco” de uma doença, distúrbio e/ou condição compreende uma probabilidade de que um indivíduo particular irá desenvolver uma doença, distúrbio e/ou condição (por exemplo, distrofia muscular). Em algumas modalidades, o risco é expresso como uma percentagem. Em algumas modalidades, o risco é de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e até 100%. Em algumas modalidades, o risco é expresso como um risco em relação a um risco associado com uma amostra de referência ou grupo de amostras de referência. Em algumas modalidades, uma amostra de referência ou grupo de amostras de referência possuem um risco conhecido de uma doença, distúrbio, condição e/ou evento (por exemplo, distrofia muscular). Em algumas modalidades, uma amostra de referência ou grupo de amostras de referência são de indivíduos comparáveis com um indivíduo particular. Em algumas modalidades, o risco relativo é de 0,1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou mais.

[078] **Músculo estriado:** Como usado nesse relatório

descritivo, o termo “músculo estriado” se refere a um tecido muscular multinucleado com arranjo regular de suas unidades contráteis intracelulares, sarcômeros, que levam ao aparecimento de estriações com o uso de microscopia e sob controle voluntário. Tipicamente, o músculo estriado pode ser músculo cardíaco, músculo esquelético e músculos branquioméricos.

[079] **Músculo liso:** Como usado nesse relatório descritivo, o termo “músculo liso” se refere a um músculo não estriado, controlado involuntariamente, incluindo músculo unitário e multiunitário.

[080] **Indivíduo:** Como usado nesse relatório descritivo, o termo “indivíduo” se refere a um humano ou a qualquer animal não humano (por exemplo, camundongo, rato, coelho, cão, gato, gado, suíno, carneiro, cavalo ou primata). Um humano inclui formas pré- e pós-natal. Em muitas modalidades, um indivíduo é um ser humano. Um indivíduo pode ser um paciente, que se refere a um humano que se apresenta a um profissional médico para diagnóstico ou tratamento de uma doença. O termo “indivíduo” é usado nesse relatório descritivo de forma intercambiável com “pessoa” ou “paciente”. Um indivíduo pode sofrer de ou ser suscetível a uma doença ou distúrbio, mas pode ou não exibir sintomas da doença ou distúrbio.

[081] **Substancialmente:** Como usado nesse relatório descritivo, o termo “substancialmente” se refere à condição qualitativa de exibir extensão ou grau total ou quase total de uma característica ou propriedade de interesse. Aqueles habilitados na técnica biológica compreendem que fenômenos biológicos e químicos raramente, ou nunca, vão até o término

e/ou procedem até o término ou obtêm ou evitam um resultado absoluto. O termo “substancialmente”, portanto, é usado nesse relatório descritivo para capturar a ausência potencial de término inerente em muitos fenômenos biológicos e químicos.

[082] **Homologia substancial:** A frase “homologia substancial” é usada nesse relatório descritivo para se referir a uma comparação entre seqüências de aminoácidos ou de ácidos nucleicos. Como será observado por aqueles habilitados na técnica, duas seqüências são geralmente consideradas como sendo “substancialmente homólogas” caso contenham resíduos homólogos em posições correspondentes. Resíduos homólogos podem ser resíduos idênticos. Alternativamente, resíduos homólogos podem ser resíduos não idênticos com características estruturais e/ou funcionais apropriadamente similares. Por exemplo, como é bem conhecido por aqueles habilitados na técnica, certos aminoácidos são tipicamente classificados como aminoácidos “hidrofóbicos” ou “hidrofílicos”, e/ou como tendo cadeias laterais “polares” ou “não polares”. A substituição de um aminoácido por outro do mesmo tipo pode freqüentemente ser considerada uma substituição “homóloga”.

[083] Como é bem conhecido nessa técnica, seqüências de aminoácidos ou de ácidos nucleicos podem ser comparadas com o uso de qualquer um de diversos algoritmos, incluindo aqueles disponíveis em programas de computador comerciais como, por exemplo, BLASTN, para seqüências de nucleotídeos, e BLASTP, BLAST Gapped e PSI-BLAST, para seqüências de aminoácidos. Programas desse tipo exemplares são descritos em Altschul, *et cols.*, “Basic Local Alignment Search Tool”,

J. Mol. Biol., 215 (3): 403-410, 1990; Altschul, e cols., "Methods in Enzymology"; Altschul, e cols., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a New Generation of Protein Database Search Programs", *Nucleic Acids Res.* 25: 3.389-3.402, 1997; Baxevanis, e cols., "Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins", Wiley, 1998; e Misener, e cols., (eds.), "Bioinformatics Methods and Protocols" ("Methods in Molecular Biology", Vol. 132), Humana Press, 1999. Além da identificação de seqüências homólogas, os programas mencionados acima tipicamente fornecem uma indicação do grau de homologia. Em algumas modalidades, duas seqüências são consideradas como sendo substancialmente homólogas se pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de seus resíduos correspondentes são homólogos sobre um trecho relevante de resíduos. Em algumas modalidades, o trecho relevante é uma seqüência completa. Em algumas modalidades, o trecho relevante é de pelo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 ou mais resíduos.

[084] **Identidade substancial:** A frase "identidade substancial" é usada nesse relatório descritivo para se referir a uma comparação entre seqüências de aminoácidos ou de ácidos nucleicos. Como será observado por aqueles habilitados na técnica, duas seqüências são geralmente consideradas como sendo "substancialmente idênticas" caso contenham resíduos idênticos em posições correspondentes. Como é bem conhecido nessa técnica, seqüências de aminoácidos ou de ácidos nucleicos podem ser comparadas com o uso de

diversos algoritmos, incluindo aqueles disponíveis em programas de computador comerciais como, por exemplo, BLASTN, para seqüências de nucleotídeos, e BLASTP, BLAST Gapped e PSI-BLAST, para seqüências de aminoácidos. Programas desse tipo exemplares são descritos em Altschul, *e cols.*, "Basic Local Alignment Search Tool", *J. Mol. Biol.*, 215 (3): 403-410, 1990; Altschul, *e cols.*, "Methods in Enzymology"; Altschul *e cols.*, *Nucleic Acids Res.* 25: 3.389-3.402, 1997; Baxevanis *e cols.*, "Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins", Wiley, 1998; e Misener, *e cols.*, (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols* ("Methods in Molecular Biology", Vol. 132), Humana Press, 1999. Além da identificação de seqüências idênticas, os programas mencionados acima tipicamente fornecem uma indicação do grau de identidade. Em algumas modalidades, duas seqüências são consideradas como sendo substancialmente idênticas se pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de seus resíduos correspondentes são idênticos sobre um trecho relevante de resíduos. Em algumas modalidades, o trecho relevante é uma seqüência completa. Em algumas modalidades, o trecho relevante é de pelo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 ou mais resíduos.

[085] **Ressonância de plásmon de superfície:** como usado nesse relatório descritivo, o termo se refere a um fenômeno óptico que permite a análise de interações de ligação específicas em tempo real, por exemplo, por meio da detecção de alterações nas concentrações de proteína dentro de uma

matriz biossensora, por exemplo, por utilização de um sistema BIAcore® (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suécia e Piscataway, N.J.). Para descrições adicionais, veja Jonsson, U., e cols., (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51: 19-26; Jonsson, U., e cols., (1991) *Biotechniques* 11: 620-627; Johnsson, B., e cols., (1995) *J. Mol. Recognit.* 8: 125-131; e Johnson, B., e cols., (1991) *Anal. Biochem.* 198: 268-277.

[086] **Sofre de:** Um indivíduo que “sofre de” uma doença, distúrbio e/ou condição foi diagnosticado com ou exibe um ou mais sintomas da doença, distúrbio e/ou condição.

[087] **Suscetível a:** Um indivíduo que é “suscetível a” uma doença, distúrbio e/ou condição não foi diagnosticado com a doença, distúrbio e/ou condição. Em algumas modalidades, um indivíduo que é suscetível a uma doença, distúrbio e/ou condição pode não exibir sintomas da doença, distúrbio e/ou condição. Em algumas modalidades, um indivíduo que é suscetível a uma doença, distúrbio, condição ou evento (por exemplo, DMD) pode ser caracterizado por um ou mais dos seguintes: (1) uma mutação genética associada ao desenvolvimento da doença, distúrbio e/ou condição; (2) um polimorfismo genético associado ao desenvolvimento da doença, distúrbio e/ou condição; (3) expressão e/ou atividade aumentada e/ou diminuída de uma proteína associada à doença, distúrbio e/ou condição; (4) hábitos e/ou estilos de vida associados ao desenvolvimento da doença, distúrbio, condição, e/ou evento (5) foi submetido, planeja se submeter ou necessita de um transplante. Em algumas modalidades, um indivíduo que é suscetível a uma doença, distúrbio e/ou condição desenvolverá a doença, distúrbio e/ou condição. Em algumas modalidades, um indivíduo que é suscetível a uma

doença, distúrbio e/ou condição não desenvolverá a doença, distúrbio e/ou condição.

[088] **Tecidos-alvo:** Como usado nesse relatório descritivo, o termo “tecidos-alvo” se refere a qualquer tecido que é afetado por uma doença a ser tratada como, por exemplo, distrofia muscular de Duchenne (DMD). Em algumas modalidades, tecidos-alvo incluem aqueles tecidos que exibem patologia associada à doença, sintoma, ou característica, incluindo, sem limitação, perda muscular, deformação esquelética, cardiomiopatia e alteração da função respiratória.

[089] **Quantidade terapeuticamente eficaz:** Como usado nesse relatório descritivo, o termo “quantidade terapeuticamente eficaz” de um agente terapêutico significa uma quantidade que é suficiente, quando administrada a um indivíduo que sofre de ou suscetível a uma doença, distúrbio e/ou condição, para tratar, diagnosticar, evitar , e/ou retardar o surgimento do(s) sintoma(s) da doença, distúrbio e/ou condição. Será observado por aqueles habilitados na técnica que uma quantidade terapeuticamente eficaz é tipicamente administrada por meio de regime de dosagem que compreende pelo menos uma dose unitária.

[090] **Tratamento:** Como usado nesse relatório descritivo, o termo “tratar”, “tratamento” ou “que trata” se refere a qualquer método usado para aliviar, melhorar, inibir, evitar, retardar o surgimento, reduzir a severidade e/ou reduzir a incidência, parcialmente ou completamente, de um ou mais sintomas ou características de uma doença, distúrbio e/ou condição particular. O tratamento pode ser administrado a um indivíduo que não exibe sinais de uma doença e/ou exibe

apenas sinais iniciais da doença com o objetivo de diminuir o risco de desenvolvimento de patologia associada à doença.

DESCRIÇÃO DETALHADA DE CERTAS MODALIDADES

[091] A presente invenção fornece, entre outras coisas, métodos e composições para o tratamento de distrofia muscular, incluindo distrofia muscular de Duchenne (DMD) e/ou distrofia muscular de Becker, com base em folistatina como um terapêutico de proteína. Em algumas modalidades, a presente invenção fornece métodos de tratamento de DMD que incluem a administração a um indivíduo que sofre de ou suscetível à DMD de uma quantidade eficaz de uma proteína folistatina recombinante ou uma proteína de fusão folistatina-Fc recombinante, de modo que pelo menos um sintoma ou característica de DMD seja reduzido em intensidade, severidade ou frequência, ou tenha o surgimento retardado.

[092] Vários aspectos da invenção são descritos em detalhe nas seções seguintes. O uso de seções não visa limitar a invenção. Cada seção pode se aplicar a qualquer aspecto da invenção. Nesse pedido, o uso de “ou” significa “e/ou”, salvo especificação em contrário.

Distrofia muscular de Duchenne (DMD)

[093] A DMD é uma doença caracterizada por deterioração progressiva dos músculos e perda de funções relacionadas dos músculo por todo o corpo. Está contemplado que a presente invenção fornece métodos e composições para a regeneração de músculo e para o tratamento de fibrose, inflamação e outros sintomas ou características associadas à DMD e outras distrofias musculares em vários tecidos musculares. Em algumas modalidades, o uso de métodos e composições

fornecidos em um indivíduo resulta em uma diminuição de fibrose e/ou necrose naquele indivíduo.

Tecidos musculares

[094] Há dois tipos principais de tecido muscular em um animal – músculo estriado e músculo liso. Como usado nesse relatório descritivo, o termo “músculo estriado” se refere aos tecidos musculares que contêm sarcômeros de repetição. O músculo estriado tende a estar sob o controle voluntário e anexado ao esqueleto, embora haja algumas exceções, por exemplo, o músculo cardíaco, que possui várias propriedades de músculo estriado, mas não está sob o controle voluntário. Geralmente, o músculo estriado permite o movimento voluntário do corpo e inclui os grupos musculares principais, incluindo o quadríceps, gastrocnêmio, bíceps, tríceps, trapézio, deltóide, e muitos outros. O músculo estriado tende a ser muito longo e, muitos músculos estriados são capazes de funcionar independentemente. Alguns músculos estriados, no entanto, não estão anexados ao esqueleto, incluindo aqueles na boca, ânus, coração e porção superior do esôfago.

[095] O músculo liso, por outro lado, possui uma estrutura muito diferente. Ao invés de uma série de músculos longos com adesões esqueléticas separadas, o músculo liso tende a ser organizado em lâminas contínuas com ligações mecânicas entre células musculares lisas. O músculo liso está freqüentemente localizado nas paredes de órgãos ocos e não está normalmente sob o controle voluntário. Os músculos lisos que foram um órgão particular devem tolerar alguma carga e contrair concomitantemente. O músculo liso funciona, pelo menos em parte, para manipular alterações na carga em órgãos ocos causadas por movimento e/ou alterações na postura

ou pressão. Esse papel duplo significa que o músculo liso não deve ser somente capaz de contrair como um músculo estriado, mas também que ele deve ser capaz de contrair tonicamente para manter as dimensões do órgão contra cargas sustentadas. Exemplos de músculos lisos são aqueles que foram os vasos sanguíneos, bexiga, trato gastrintestinal como, por exemplo, o reto.

[096] A força de um músculo depende do número e tamanhos das células do músculo e de seu arranjo anatômico. O aumento do diâmetro de uma fibra muscular pelo aumento no tamanho das miofibrilas existentes (hipertrofia) e/ou pela formação de mais células musculares (hiperplasia) aumentará a capacidade de geração de força do músculo.

[097] Os músculos também podem ser agrupados por localização ou função. Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante é dirigida a um ou mais músculos da face, um ou mais músculos para mastigação, um ou mais músculos da língua e pescoço, um ou mais músculos do tórax, um ou mais músculos da cintura escapular e braços, um ou mais músculos do braço e ombro, um ou mais músculos ventrais e dorsais do antebraço, um ou mais músculos da mão, um ou mais músculos do eretor da espinha, um ou mais músculos da cintura pélvica e pernas, e/ou um ou mais músculos do membro anterior e pé.

[098] Em algumas modalidades, músculos da face incluem, sem limitação, músculos intra-oculares como, por exemplo, ciliar, dilatador da íris, esfíncter da íris; músculos do ouvido como, por exemplo, auriculares, temporoparietais, estapédio, tensor do tímpano; músculos do nariz como, por exemplo, procerus, nasais, dilatador do nariz, depressor do

septo nasal, elevador do lábio superior e da asa do nariz; músculos da boca como, por exemplo, elevador do ângulo da boca, depressor do ângulo da boca, orbicular da boca, bucinador, zigomático maior e menor, platisma, elevador do lábio superior, depressor do lábio inferior, risório, mental e/ou corrugador do supercílio.

[099] Em algumas modalidades, músculos da mastigação incluem, sem limitação, masseter, temporal, pterigóide medial, pterigóide lateral. Em algumas modalidades, músculos da língua e pescoço incluem, sem limitação, genioglosso, estiloglosso, palatoglosso, hioglosso, digástrico, estilo-hióideo, milo-hióideo, geni-hióideo, omo-hióideo, esterno-hióideo, esterno-tireóideo, tireóideo, esternocleidomastóideo, escaleno anterior, escaleno médio, e/ou escaleno posterior.

[100] Em algumas modalidades, músculos do tórax, cintura escapular e braços incluem, sem limitação, peitoral subclávio maior, peitoral menor, reto abdominal, oblíquo abdominal externo, oblíquo abdominal interno, transverso abdominal, diafragma, intercostais externos, intercostais internos, serrátil anterior, trapézio, elevador da escápula, rambóide maior, rambóide menor, latíssimo do dorso, deltóide, subescapular, supraespinhoso, infraespinhoso, redondo maior, redondo menor e/ou coracobraquial.

[101] Em algumas modalidades, músculos do braço e ombro incluem, sem limitação, cabeça longa do músculo bíceps braquial, cabeça curta do músculo bíceps braquial, cabeça longa do músculo tríceps braquial, cabeça lateral do músculo tríceps braquial, cabeça medial do músculo tríceps braquial, ancôneo, pronador redondo, supinador e/ou braquial.

[102] Em algumas modalidades, músculos do antebraço ventral e dorsal incluem, sem limitação, braquiorradial, flexor radial do carpo, flexor ulnar do carpo, palmar longo, extensor ulnar do carpo, extensor radial do carpo longo, extensor radial do carpo curto, extensor dos dedos, extensor do dedo mínimo.

[103] Em algumas modalidades, músculos da mão incluem, sem limitação, músculos intrínsecos da mão como, por exemplo, tenar, abductor curto do polegar, flexor curto do polegar, oponente do polegar, hipotenar, abductor do dedo mínimo, o flexor curto do dedo mínimo, oponente do dedo mínimo, palmar interósseo, dorsal interósseo e/ou lumbricais.

[104] Em algumas modalidades, músculos dos eretores da espinha incluem, sem limitação, cervical, espinhal, longuíssimo e/ou íleo-costal.

[105] Em algumas modalidades, músculos da cintura pélvica e das pernas incluem, sem limitação, psoas maior, ilíaco, quadrado femoral, adutor longo, adutor curto, adutor magno, grácil, sartório, quadríceps femoral como, por exemplo, reto femoral, vasto lateral, vasto medial, vasto intermediário, gastrocnêmio, fibular (peroneal) longo, solear, glúteo máximo, glúteo médio, glúteo mínimo, Isquiotibiais: bíceps femoral: cabeça longa, Isquiotibiais: bíceps femoral: cabeça curta, Isquiotibiais: semitendinoso, Isquiotibiais: semimembranoso, tensor da fáscia lata, pectíneo e/ou tibial anterior.

[106] Em algumas modalidades, músculos do membro anterior e pé incluem, sem limitação, extensor digital longo, extensor longo do hálux, peroneal curto, plantar, tibial posterior, flexor longo do hálux, extensor curto dos dedos,

extensor curto do hálux, adutor do hálux, flexor curto do hálux, adutor do dedo mínimo, flexor do dedo mínimo, oponente do dedo mínimo, extensor curto dos dedos, lumbricais do pé, quadrado plantar ou flexor acessório, flexor curto dos dedos, dorsal interósseo e/ou plantar interósseo.

[107] Os alvos musculares exemplares estão resumidos na **Tabela 1**.

Tabela 1: Alvos musculares.

ORBICULAR DOS OLHOS			
Intra-ocular: ciliar, dilatador da íris, esfíncter da íris			
Ouvido: auriculares, temporoparietais, estapédio, tensor do tímpano			
Nariz: procerus, nasais, dilatador do nariz, depressor do septo nasal, elevador do lábio superior e da asa do nariz			
Boca: elevador do ângulo da boca, depressor do ângulo da boca, orbicular da boca			
Bucinator	Zigomático maior e menor	Platisma	Elevador do lábio superior
Depressor do lábio inferior	Risório	Mental	Corrugador do supercílio
Ancôneo	Pronador redondo	Supinador	Braquial
MÚSCULOS OF MASTICATION			
Masseter	Temporal	Medial pterigóide	Lateral pterigóide
MÚSCULOS DA LÍNGUA E PESCOÇO			
Genioglosso	Estiloglosso	Palatoglosso	Hio-glosso

Digástrico	Estilo-hióideo	Milo-hióideo	Geni-hióideo
Omo-hióideo	Esterno-hióideo	Esterno-tireóideo	Tireóideo
Esternocleidomastóideo	Escaleno anterior	Escaleno médio	Escaleno posterior
MÚSCULOS DO TÓRAX, CINTURA ESCAPULAR E BRAÇOS			
Subclávio	Peitoral maior	Peitoral menor	Reto abdominal
Oblíquo abdominal externo	Oblíquo abdominal interno	Transverso abdominal	Diafragma
Intercostais externos	Intercostais internos	Serrátil anterior	Trapézio
Elevador da escápula	Rambóide maior	Rambóide menor	Latíssimo do dorso
Deltóide	Subescapular	Supraespinhoso	Infraespinhoso
Redondo maior	Redondo menor	Coracobraquial	
BRAÇO E OMBRO			
Cabeça longa do músculo bíceps	cabeça curta do músculo	cabeça longa do músculo	Cabeça lateral do tríceps braquial

braquial	bíceps braquial	tríceps braquial	
Cabeça medial do músculo tríceps braquial	Ancôneo	Pronador redondo	Supinador
braquial			
MÚSCULOS DO ANTEBRAÇO: Ventrals e Dorsais			
Braquiorradial	Flexor radial do carpo	Flexor ulnar do carpo	Palmar longo
Extensor ulnar do carpo	Extensor radial do carpo longo	Extensor radial do carpo curto	Extensor dos dedos
Extensor do dedo mínimo	Eretor da espinha: cervical	Eretor da espinha: espinhal	Eretor da espinha: longuíssimo
Eretor da espinha: íleoocostal			
Músculos intrínsecos da mão: tenar, abdutor curto do polegar, flexor curto do			

polegar e o oponente do polegar			
Músculos intrínsecos da mão: hipotenar, abdutor do dedo mínimo, o flexor curto do dedo mínimo e o oponente do dedo mínimo			
Músculos intrínsecos da mão: palmar interósseo, dorsal interósseo e lumbricais			
MÚSCULOS DA CINTURA PÉLVICA E PERNAS			
Iliopsoas: psoas maior	Iliopsoas: ilíaco	Quadrado femoral	Adutor longo
Adutor curto	Adutor magno	Grácil	Sartório
Quadríceps femoral: reto femoral	Quadríceps femoral: vasto lateral	Quadríceps femoral: vasto medial	Quadríceps femoral: vasto intermediário
Gastrocnêmio	Fibular (peroneal) longo	Solear	Glúteo máximo
Glúteo médio	Glúteo mínimo	Isquiotibiais: Bíceps femoral:	Isquiotibiais: Bíceps femoral: cabeça curta

		cabeça longa	
Isquiotibiais: Semitendinoso	Isquiotibiais: Semimembranoso	Tensor da fáscia lata	Pectíneo
Tibial anterior			
MÚSCULOS DO MEMBRO ANTERIOR E PÉ			
Extensor digital longo	Extensor longo do hálux	Peroneal curto	Plantar
Tibial posterior	Flexor longo do hálux	Extensor curto dos dedos	Extensor curto do hálux
Adutor do hálux	Flexor curto do hálux	Adutor do dedo mínimo	Flexor do dedo mínimo
Oponente do dedo mínimo	Extensor curto dos dedos	Lumbricais do pé	Quadrado plantar ou flexor acessório
Flexor curto dos dedos	Dorsal interósseo	Plantar interósseo	

Distrofia muscular

[108] Distrofias musculares são um grupo de distúrbios hereditários que causam degeneração dos músculos, levando à fraqueza e déficit de movimentos. Uma característica central de todas as distrofias musculares é que elas são de natureza progressivas. As distrofias musculares incluem, sem limitação: distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de Emery-Dreifuss, distrofia muscular fâscio-escápulo-humeral, distrofias musculares das cinturas e distrofia miotônica Tipos 1 e 2, incluindo a forma congênita de distrofia miotônica Tipo 1. Os sintomas podem variar por tipo de distrofia muscular com alguns ou todos músculos sendo afetados. Sintomas exemplares de distrofias musculares incluem desenvolvimento retardado de habilidades motoras musculares, dificuldade de utilização de um ou mais grupos musculares, dificuldade na deglutição, fala ou alimentação, babar, queda da pálpebra, quedas frequentes, perda de força em um músculo ou grupo de músculos como um adulto, perda do tamanho do músculo, problemas para caminhar em decorrência de fraqueza ou biomecânica do corpo alterada, hipertrofia muscular, pseudohipertrofia muscular, infiltração gordurosa dos músculos, troca de músculo por tecido não contrátil (por exemplo, fibrose muscular), necrose muscular, e/ou déficit cognitivo ou comportamental/retardo mental.

[109] Embora não haja curas conhecidas para as distrofias musculares, vários tratamentos de suporte são usados, que incluem tanto terapias sintomáticas quanto de modificação da doença. Corticosteróides, fisioterapia, dispositivos ortóticos, cadeiras de rodas, ou outros

dispositivos médicos auxiliares para ADLs e função pulmonar são comumente usados em distrofias musculares. Marcapassos cardíacos são usados para evitar morte súbita por arritmias cardíacas na distrofia miotônica. Agentes anti-miotônicos que melhoram os sintomas de miotonia (incapacidade de relaxar) incluem mexiletina e, em alguns casos, fenitoína, procainamida e quinina.

Distrofia muscular de Duchenne

[110] A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma forma de distrofia muscular recessiva ligada ao X que resulta em degeneração muscular e eventual morte. A DMD é caracterizada por fraqueza nos músculos proximais, marcha anormal, pseudohipertrofia nos músculos gastrocnêmios (panturrilha), e creatina-quinase elevada (CK). Muitos pacientes com DMD são diagnosticados em torno de 5 anos de idade, quando os sinais/sintomas tipicamente se tornam mais óbvios. Os indivíduos afetados tipicamente param de andar por volta de 10-13 de idade e morrem do meio para o fim da terceira década de vida, ou antes disso, em consequência de disfunção cardiorrespiratória.

[111] O distúrbio da DMD é causado por uma mutação no gene de distrofina, localizado no cromossomo humano X, que codifica a proteína distrofina, um componente estrutural importante dentro do tecido muscular que fornece estabilidade estrutural ao complexo de distroglicano (DGC) da membrana celular. A distrofina liga a rede de filamento de actina citoplasmática interna e a matriz extracelular, fornecendo força física às fibras musculares. Conseqüentemente, a alteração ou ausência de distrofina resulta em rasgos anormais da membrana do sarcolema e necrose

de fibras musculares. Embora pessoas de ambos os sexos possam carregar a mutação, mulheres raramente exibem sinais severos da doença.

[112] Um sintoma primário de DMD é fraqueza muscular associada à perda muscular, com os músculos voluntários tipicamente sendo afetados primeiro, afetando especialmente os músculos dos quadris, músculos da área pélvica, coxas, ombros e panturrilha. A fraqueza muscular também ocorre nos braços, pescoço e outras áreas. As panturrilhas estão freqüentemente aumentadas. Os sinais e sintomas normalmente aparecem antes dos 6 anos de idade e podem aparecer precocemente na infância. Outros sintomas físicos incluem, sem limitação, habilidade retardada para caminhar independentemente, dificuldade progressiva para caminhar, subir escadas ou correr, e eventual perda de habilidade para caminhar (normalmente por volta dos 15 anos de idade); quedas freqüentes; fadiga; dificuldade com habilidades motoras (correr, saltar, pular); lordose lombar aumentada, levando ao encurtamento dos músculos flexores do quadril; contraturas do tendão de Aquiles e funcionalidade prejudicada dos isquiotibiais por causa do encurtamento das fibras musculares e da fibrose que ocorre no tecido conjuntivo; deformidades da fibra muscular; pseudohipertrofia (aumento) dos músculos da língua e panturrilha causada por substituição de tecido muscular por gordura e tecido conjuntivo; risco maior de distúrbios neurocomportamentais (por exemplo, ADHD), distúrbios do aprendizado (dislexia), e fraquezas não progressivas em habilidades cognitivas específicas (em particular memória verbal de curto prazo); deformidades esqueléticas (incluindo escoliose em alguns casos).

Proteínas folistatina recombinantes

[113] A folistatina (FS), uma glicoproteína monomérica, foi originalmente identificada do fluido folicular ovariano suíno, e denominada com base em sua função para suprimir especificamente a secreção de hormônio folículo-estimulante (FSH) da hipófise. Subseqüentemente, a função fisiológica da folistatina humana foi adicionalmente compreendida por sua ligação e inibição de certos membros do TGF- β , principalmente activinas e miostatina. Activinas desempenham papéis importantes em vários processos biológicos, incluindo desenvolvimento e crescimento embrionários, reprodução, metabolismo de energia, homeostasia óssea, inflamação e fibrose. A miostatina, também conhecida como fator de crescimento e diferenciação-8 (GDF-8), é um regulador negativo importante bem conhecido da miogênese e da massa muscular esquelética. A inibição de miostatina causa aumentos significantes na massa muscular esquelética por hipertrofia. A folistatina, como um antagonista natural de activinas e miostatina, foi indicada como um alvo terapêutico promissor para o tratamento de doenças humanas associadas com inflamação, fibrose e distúrbios musculares, por exemplo, distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker (BMD) e miosite por corpo de inclusão (IBM).

[114] O gene da folistatina se localiza no cromossomo 5q11.2. Um evento de *splicing* alternativo no processamento de RNA resulta em dois precursores de folistatina codificados, uma proteína precursora de 344 aminoácidos e um precursor de 317 aminoácidos com terminal carboxil truncado de 27 aminoácidos. Os primeiros 29 resíduos de aminoácidos

do precursor correspondem à suposta sequência sinalizadora, o que resulta em duas isoformas de FS maduras centrais do terminal-N, FS315 e FS288. É relatado que uma variante adicional de FS, FS303, surge da clivagem proteolítica de FS315. As três isoformas desempenham papéis biológicos diferentes com base em suas afinidades diferentes para ligação ao ligante e localização. FS315 foi sugerida como a isoforma circulante predominante no soro humano, enquanto FS303 é a isoforma predominante no fluido folicular ovariano. A estrutura do domínio FS é uma proteína em mosaico típica derivada de embaralhamento de éxons, que é composta por um domínio do terminal-N (ND) de 63 resíduos, seguido por três domínios FS sucessivos (FSD1, FSD2 e FSD3), e uma cauda do terminal-C altamente ácida (AD) nas isoformas FS315 e FS303 (Figura 1). Os três domínios FS, que compartilham cerca de 50% de homologia de sequência primária, estão claramente relacionados por alinhamento de seus dez resíduos de cisteína. A estrutura cristal de FSD1 indicou que os domínios FS podem ser divididos em dois subdomínios distintos: os módulos do terminal-N EGF-like e os domínios de inibidor de protease de Kazal do terminal-C, e é previsto que cada domínio FS forme uma unidade de enovelamento autônoma por meio das ligações dissulfeto intradomínio formadas pelas 10 cisteínas conservadas.

[115] A associação de FS com colunas de afinidade de heparina-sefarose e cadeias de sulfato de heparano de proteoglicanos na superfície celular foi descrita nos estudos originais de isolamento e caracterização. Estudos posteriores identificaram uma sequência de ligação à heparina central (HBS) na FS, que é um segmento de 12

resíduos altamente básicos (resíduos 75-86) localizado no domínio FSD1. A região HBS contém dois motivos de ligação à heparina de consenso BBXB, em que B é uma lisina (K) ou arginina (R), e funciona como um determinante importante para ligação à heparina. A substituição do HBS ou mutações pontuais nos motivos BBXB podem reduzir ou abolir a ligação à heparina. Em estudos animais recentes, uma FS315 modificada geneticamente com HBS removido fundida a um domínio Fc de Ig1 murídea (FS315 Δ HBS-Fc) aumentou significativamente a exposição e meia-vida em camundongos, e também exibiu efeitos farmacológicos dose-dependentes em um modelo em camundongo de atrofia muscular, o que ressalta a importância da manipulação da afinidade de ligação à heparina para desenvolver variantes de FS recombinantes terapeuticamente relevantes.

[116] A modificação sistemática por engenharia genética de proteína de FS recombinante para aplicações terapêuticas é em grande parte inexplorada. Em algumas modalidades, são apresentadas nesse relatório descritivo variantes de FS recombinantes modificadas geneticamente. Em algumas modalidades, as variantes de FS recombinantes modificadas geneticamente são fundidas ao Fc de IgG. Em algumas modalidades, as variantes de FS recombinantes modificadas geneticamente são fundidas ao Fc de IgG1 humana.

[117] Em algumas modalidades, a carga de certos resíduos nos motivos básicos BBXB dentro do HBS de FS afeta a afinidade de ligação à heparina. FS315 é composta por um domínio do terminal-N (ND), três domínios FS (FSD1, FSD2 e FSD3) e uma cauda do terminal-C altamente ácida (AD) (Figura 1). Dois motivos de ligação à heparina centrais KKCR e KKNK,

que são ricos em resíduos básicos, estão localizados no FSD1, o que o torna o domínio mais básico (pI 8,9), comparado com FSD2 (pI 6,7) e FSD3 (pI 4,8). A análise estrutural de 20 estruturas tridimensionais de proteína não redundantes em complexo com heparina mostrou que interações eletrostáticas e de ligação hidrogênio contribuem, no máximo, na ligação entre resíduos catiônicos (K ou R) e grupos aniônicos na heparina. Uma estrutura cristal do domínio FS FSD1 complexado com análogos de heparina também indicou que análogos de heparina se associam com o HBS altamente básico por meio de seus grupos sulfato carregados negativamente por interações eletrostáticas. Em algumas modalidades, a substituição de resíduos catiônicos com resíduos aniônicos nos motivos BBXB da região HBS quebrará as interações eletrostáticas e abolirá a ligação à heparina. Em algumas modalidades, variantes substituídas com resíduo negativo K(76,81,82)E e K(76,81,82)D tiveram afinidades de ligação à heparina indetectáveis em ensaios de ligação a SPR, enquanto uma variante substituída com resíduo neutro K(76,81,82)A teve uma K_D de ligação de 9,4 nM, confirmando o efeito maior na eliminação da ligação à heparina com o uso de substituições carregadas negativamente. Com o impacto significativo de substituições com carga negativada sobre a afinidade de ligação à heparina, a introdução somente de algumas mutações pontuais para obter a mesma alteração na inibição observada com a variante de substituição de HBS Δ HBS e a variante de deleção de HBS del75-86. Em nossas mãos, a utilização de substituições mínimas permitiu níveis de expressão aumentados para nossas variantes de FS em CHO e agregação de proteína reduzida em nosso eluado de proteína A, bem como

reteve afinidades de ligação à activina A e miostatina similares às do tipo selvagem.

[118] Em algumas modalidades, o aumento da extensão de substituições de ácido glutâmico em variantes de folistatina recombinantes diminui progressivamente a ligação à heparina. Em algumas modalidades, o segundo motivo BBXB KKNK (81-84) desempenha um papel mais dominante na ligação à heparina do que o primeiro motivo BBXB KKCR (75-78). Em algumas modalidades, o terceiro resíduo básico em cada um dos motivos FS BBXB possui um efeito mais fraco sobre a ligação à heparina. Em algumas modalidades, os dois primeiros resíduos básicos no motivo FS BBXB influenciam a ligação e/ou depuração de heparina mais do que o terceiro resíduo básico no motivo FS BBXB.

[119] Por geração de uma série de uma, duas ou três substituições de aminoácidos para os resíduos cruciais nos motivos BBXB usando o resíduo carregado negativamente ácido glutâmico E, foram identificadas posições cruciais e combinações para ligação à heparina. A avaliação de seis resíduos básicos nos dois motivos BBXB indicou que K81 e K82 no segundo motivo BBXB desempenham um papel dominante para a interação eletrostática, na medida em que observamos o maior impacto sobre a ligação à heparina com a variante dupla K(81,82)E, comparada com seis outras variantes duplas, incluindo K(75,76)E, K(76,82)E, K(76,84)E, R78E/K82E, R78E/K84E e K(82,84)E (**Tabela 8b**). Em algumas modalidades, variantes com a mutação K82E mostraram consistentemente um aumento de aproximadamente 2 vezes nos níveis de expressão de proteína, implicando o impacto positivo de K82E sobre o enovelamento de proteína. Em algumas modalidades, foram

geradas variantes com graus diferentes de ligação à heparina, que possuem uma faixa de redução de 4-100 vezes ou mais em nossa faixa de testagem, comparadas com o tipo selvagem. Foi demonstrado que a associação entre FS e proteoglicanos de sulfato de heparano da superfície celular causou uma captação e depuração celulares rápidas. Múltiplas variantes foram selecionadas com afinidades de ligação à heparina diferentes, e essas foram administradas como doses intravenosas únicas (1 mg/kg) a fêmeas de camundongos CD1. Todas as variantes mostraram perfis farmacocinéticos aprimorados, comparadas com o tipo selvagem, e a ligação à heparina diminuída claramente se correlacionava com AUC aumentada e depuração diminuída (**Tabela 11**). Os dados apresentados nos Exemplos mostram que a associação com proteoglicanos de sulfato de heparano da superfície celular é um dos processos determinantes para o perfil farmacocinético *in vivo* da proteína folistatina. Para aplicações terapêuticas, a exposição e perfil farmacocinético da proteína folistatina podem ser modulados por manipulação da ligação à heparina.

[120] Em contraste com o relacionamento entre a ligação à heparina e AUC ou depuração, não há relacionamento direto na meia-vida terminal, embora muitas das variantes tivessem meia-vida estendida, comparadas com o tipo selvagem. Como a meia-vida de um fármaco depende tanto da depuração quanto do volume de distribuição, o volume de distribuição (**Tabela 11**), que pode resultar da carga e estrutura da proteína, poderia ser o fator que contribuiu para o relacionamento não direto entre meia-vida terminal e ligação à heparina.

[121] O efeito de mutações dentro do região HBS na

ligação ao ligante foi estudado com diferentes isoformas/variantes de FS e diferentes sistemas de ensaio, o que resultou em diferentes conjuntos de dados. Uma redução de aproximadamente 20 vezes na inibição de miostatina e uma redução de aproximadamente 5 vezes na inibição de activina A para a variante del75-86 puderam ser causadas por alterações na conformação da molécula. Em algumas modalidades, a variante de folistatina recombinante reduz a inibição de miostatina por cerca de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2,5, 2, 1,5, ou 1 vez em comparação com folistatina do tipo selvagem. Em algumas modalidades, a folistatina recombinante reduz a inibição de activina A por cerca de 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1 vez em comparação com folistatina do tipo selvagem.

[122] A tecnologia de *glycoengineering* está se tornando uma estratégia atrativa para aprimorar as propriedades farmacêuticas de produtos terapêuticos. Há muitas abordagens para a modificação genética por *glycoengineering* da via de biossíntese do hospedeiro por meio da superexpressão ou ruptura de enzimas relevantes; 2) a interferência metabólica da via de biossíntese do hospedeiro por utilização de inibidores de enzima solúveis; 3) modificação pós-tradução enzimática ou quimio-enzimática de proteínas purificadas; e 4) introdução de novos sítios de glicosilação para aumentar o teor de carboidratos ou bloquear ligação específica.

[123] Em algumas modalidades, um sítio de hiperglicosilação é encontrado em N75 de folistatina. A estrutura cristal de FSD1 indica que os resíduos 64-74 formam uma alça, seguida por fita β 1 (75-79) e fita β 2 (85-89). O

resíduo 75 se localiza em uma volta- β do tipo II (72-75) que conecta a alça e fita β 1, consistente com o achado de que a glicosilação ocorre frequentemente em uma região da alça exposta com alguma flexibilidade.

[124] Duas variantes de hiperglicosilação K75N/C77N/K82T e C66A/K75N/C77T mostraram exposição *in vivo* significativamente aumentada, comparadas com o tipo selvagem em estudos em camundongos. Não houve redução da ligação à heparina *in vitro* para C66A/K75N/C77T com adição de glicano on N75.

[125] Em algumas modalidades, o primeiro motivo BBXB (resíduos 75-78) influencia a ligação à heparina menos do que o segundo motivo BBXB (resíduos 81-84). Sem se prender à teoria, a exposição *in vivo* aproximadamente 10 vezes aumentada para C66A/K75N/C77T poderia ser causada por ocupação de glicano aumentada, o que reduz a depuração açúcar-dependente *in vivo* para moléculas FS315-Fc recombinantes, e também possivelmente, por algum grau, bloqueia um pouco da ligação à heparina por adição de um glicano volumoso *in vivo*. A variante K75N/C77N/K82T teve ocupação de glicano maior e afinidade de ligação à heparina *in vitro* mais fraca do que C66A/K75N/C77T, que contribuiu para o aumento maior na exposição *in vivo*.

[126] Como usadas nesse relatório descritivo, proteínas folistatina recombinantes adequadas para a presente invenção incluem quaisquer proteínas folistatina do tipo selvagem e modificadas (por exemplo, proteínas folistatina com mutações, deleções, inserções de aminoácidos, e/ou proteínas de fusão) que retêm atividade biológica substancial de folistatina. Tipicamente, uma proteína folistatina

recombinante é produzida usando tecnologia recombinante. No entanto, proteínas folistatina (do tipo selvagem ou modificadas) purificadas de fontes naturais ou sintetizadas quimicamente podem ser usadas de acordo com a presente invenção. Tipicamente, uma proteína folistatina recombinante adequada ou uma proteína de fusão de folistatina recombinante possui uma meia-vida *in vivo* igual ou maior do que cerca de 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 2 dias, 2,5 dias, 3 dias, 3,5 dias, 4 dias, 4,5 dias, 5 dias, 5,5 dias, 6 dias, 6,5 dias, 7 dias, 7,5 dias, 8 dias, 8,5 dias, 9 dias, 9,5 dias ou 10 dias. Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante possui uma meia-vida *in vivo* entre 0,5 e 10 dias, entre 1 dia e 10 dias, entre 1 dia e 9 dias, entre 1 dia e 8 dias, entre 1 dia e 7 dias, entre 1 dia e 6 dias, entre 1 dia e 5 dias, entre 1 dia e 4 dias, entre 1 dia e 3 dias, entre 2 dias e 10 dias, entre 2 dias e 9 dias, entre 2 dias e 8 dias, entre 2 dias e 7 dias, entre 2 dias e 6 dias, entre 2 dias e 5 dias, entre 2 dias e 4 dias, entre 2 dias e 3 dias, entre 2,5 dias e 10 dias, entre 2,5 dias e 9 dias, entre 2,5 dias e 8 dias, entre 2,5 dias e 7 dias, entre 2,5 dias e 6 dias, entre 2,5 dias e 5 dias, entre 2,5 dias e 4 dias, entre 3 dias e 10 dias, entre 3 dias e 9 dias, entre 3 dias e 8 dias, entre 3 dias e 7 dias, entre 3 dias e 6 dias, entre 3 dias e 5 dias, entre 3 dias e 4 dias, entre 3,5 dias e 10 dias, entre 3,5 dias e 9 dias, entre 3,5 dias e 8 dias, entre 3,5 dias e 7 dias, entre 3,5 dias e 6 dias, entre 3,5 dias e 5 dias, entre 3,5 dias e 4 dias, entre 4 dias e 10 dias, entre 4 dias e 9 dias, entre 4 dias e 8 dias, entre 4 dias e 7 dias, entre 4 dias e 6 dias, entre 4 dias e 5 dias, entre 4,5 dias e 10 dias, entre 4,5 dias e 9 dias,

entre 4,5 dias e 8 dias, entre 4,5 dias e 7 dias, entre 4,5 dias e 6 dias, entre 4,5 dias e 5 dias, entre 5 dias e 10 dias, entre 5 dias e 9 dias, entre 5 dias e 8 dias, entre 5 dias e 7 dias, entre 5 dias e 6 dias, entre 5,5 dias e 10 dias, entre 5,5 dias e 9 dias, entre 5,5 dias e 8 dias, entre 5,5 dias e 7 dias, entre 5,5 dias e 6 dias, entre 6 dias e 10 dias, entre 7 dias e 10 dias, entre 8 dias e 10 dias, entre 9 dias e 10 dias.

[127] A folistatina (FS) foi isolada primeiro de fluido folicular, como uma fator de proteína capaz de suprimir a secreção de hormônio estimulante de célula folicular (FSH) pela hipófise. FS exerce sua influência sobre FSH, pelo menos em parte, por meio da ligação e neutralização de activina.

[128] Há pelo menos três isoformas de FS: FS288, FS303 e FS315 (**Tabela 3**). A proteína FS315 de comprimento total compreende uma cauda do terminal-C ácida de 26 resíduos codificada pelo éxon 6 (ID. DE SEQ. Nº: 2, cauda do terminal-C com sublinhado simples). Em alguns casos, a isoforma FS315 pode compreender uma seqüência sinalizadora (ID. DE SEQ. Nº: 1, seqüência sinalizadora está designada em negrito e *itálico*). A isoforma FS288 é produzida por meio de *splicing* alternativo no terminal-C e, dessa forma, termina com éxon 5 (ID. DE SEQ. Nº: 5). A proteínas folistatina possui uma estrutura distinta composta por uma região do terminal-N de 63 aminoácidos que contém resíduos hidrofóbicos importantes para ligação à activina, com a maior porção da proteína (resíduos 64-288, por exemplo, como mostrado no ID. DE SEQ. Nº: 2) compreendendo três domínios FS de 10 cisteínas de aproximadamente 73-75 aminoácidos cada. Esses domínios de 10 cisteínas, do terminal-N para o terminal-C, são denominados

domínio 1, domínio 2 e domínio 3, respectivamente (ou seja, FSD1, FSD2 e FSD3). FS288 tende a ser ligado ao tecido em função da presença de um domínio de ligação à heparina, enquanto FS315 tende a ser uma forma circulante, potencialmente pelo fato de o domínio de ligação à heparina ser mascarado pelo terminal-C estendido. Acredita-se que FS303 (ID. DE SEQ. Nº: 4) seja produzida por clivagem proteolítica do domínio do terminal-C de FS315. Em alguns casos, a isoforma FS303 pode compreender uma seqüência sinalizadora (ID. DE SEQ. Nº: 3, seqüência sinalizadora está designada em **negrito e itálico**). FS303 possui um nível intermediário de ligação na superfície celular entre aquele de FS288 e FS315.

[129] O domínio ou seqüência de ligação à heparina (por exemplo, HBS) compreende aminoácidos que correspondem aos resíduos 75-86 de FS315 e está dentro do FSD1, como mostrado, por exemplo, no ID. DE SEQ. Nº: 2. O HBS está designado por sublinhado duplo. As proteínas FS303 e FS288 também compreendem um HBS nos aminoácidos correspondentes (também designados por sublinhado duplo). A mutação, deleção ou substituição de aminoácidos dentro dessa região pode reduzir ou abolir a ligação à heparina e, dessa forma, reduzir a depuração e aumentar a meia-vida de proteínas de fusão folistatina-Fc terapêuticas.

[130] Em algumas modalidades, a substituição de pelo menos um ou mais aminoácidos dentro do HBS, com um aminoácido que possui uma carga menos positiva, resulta na proteína folistatina recombinante ter afinidade de ligação à heparina diminuída. Em algumas modalidades, a substituição de pelo menos um ou mais aminoácidos dentro do HBS, com um aminoácido

que possui uma carga mais neutra ou negativa, resulta na proteína folistatina recombinante ter afinidade de ligação à heparina diminuída. Em algumas modalidades, a substituição com um aminoácido que possui uma carga reduzida em comparação com o aminoácido original resulta na proteína folistatina recombinante ter afinidade de ligação à heparina diminuída. Em algumas modalidades, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 substituições de aminoácidos presentes no HBS com aminoácidos que possuem uma carga menos positiva, uma carga neutra, uma carga mais negativa ou uma carga reduzida resulta na proteína folistatina recombinante ter afinidade de ligação à heparina diminuída. Em algumas modalidades, 1, 2 ou 3 substituições de aminoácidos presentes no HBS com aminoácidos que possuem uma carga menos positiva, uma carga neutra, uma carga mais negativa ou uma carga reduzida resulta na proteína folistatina recombinante ter afinidade de ligação à heparina diminuída. Em algumas modalidades, a substituição de mais de um aminoácido no HBS com aminoácidos menos positivamente carregados, aminoácidos neutros, um aminoácido carregado negativamente ou um aminoácido com carga reduzida resulta em ligação à heparina progressivamente diminuída que corresponde à quantidade de substituições de aminoácidos feitas. Por exemplo, a substituição de 3 aminoácidos no HBS com aminoácidos que possuem uma carga menos positiva, uma carga neutra, uma carga mais negativa ou um aminoácido com carga reduzida resulta em menos ligação à heparina pela proteína folistatina recombinante em comparação com a substituição de apenas 2 aminoácidos no HBS com aminoácidos que possuem uma carga menos positiva, uma carga neutra, uma carga mais negativa ou

um aminoácido com carga reduzida. Como outro exemplo, a substituição de 2 aminoácidos no HBS com aminoácidos que possuem uma carga menos positiva, uma carga neutra, uma carga mais negativa ou um aminoácido com carga reduzida resulta em menos ligação à heparina pela proteína folistatina recombinante em comparação com a substituição de apenas 1 aminoácido no HBS com um aminoácido com uma carga menos positiva, uma carga neutra, uma carga mais negativa ou um aminoácido com carga reduzida.

[131] Aqueles habilitados na técnica reconhecerão que certos aminoácidos são carregados menos positivamente, são neutros, são carregados negativamente ou possuem uma carga reduzida em comparação com outros aminoácidos. Aminoácidos podem ser separados com base na carga líquida, como indicado pelo ponto isoelétrico de um aminoácido. O ponto isoelétrico é o pH no qual a carga líquida média da molécula de aminoácido é zero. Quando $\text{pH} > \text{pI}$, um aminoácido possui uma carga líquida negativa, e quando o $\text{pH} < \text{pI}$, um aminoácido possui uma carga líquida positiva. Em algumas modalidades, o valor de pI medido para uma proteína folistatina recombinante é entre cerca de 3 e 9 (por exemplo, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, e 9) e quaisquer valores entre esses. Em algumas modalidades, o valor de pI medido para uma proteína folistatina recombinante é entre cerca de 4 e 7 (por exemplo, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0), e quaisquer valores entre esses. Pontos isoelétricos exemplares de aminoácidos são mostrados na **Tabela 2** abaixo. Geralmente aminoácidos com cadeias laterais positivas carregadas eletricamente incluem, por exemplo, Arginina (R), Histidina (H) e Lisina (K). Aminoácidos com

cadeias laterais negativas carregadas eletricamente incluem, por exemplo, Ácido aspártico (D) e Ácido glutâmico (E). Aminoácidos com propriedades polares incluem, por exemplo, Serina (S), Treonina (T), Asparagina (N), Glutamina (Q) e Cisteína (C), Tirosina (Y) e Triptofano (W). Aminoácidos não polares incluem, por exemplo, Alanina (A), Valina (V), Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Fenilalanina (F), Glicina (G) e Prolina (P).

[132] Em algumas modalidades, mutações pontuais no HBS incluem uma ou mais substituições de um ou mais resíduos de lisina (K) no HBS. Por exemplo, um ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5) resíduos de lisina são substituídos por outro aminoácido no HBS do polipeptídeo folistatina. O HBS compreende aminoácidos que correspondem aos resíduos 75-86 de FS315, especificamente, resíduos KKCRMNKKNKPR. Em algumas modalidades, a substituição de um ou mais aminoácidos carregados negativamente, por exemplo, Ácido glutâmico (E) e/ou Ácido aspártico (D), para o aminoácido lisina (K) resulta em uma alteração da carga global do polipeptídeo folistatina recombinante, conhecida como uma mudança de pI. Em algumas modalidades, uma alteração na carga global da molécula de folistatina aumenta a depuração e meia-vida *in vivo*. Em uma modalidade, uma alteração na carga global do polipeptídeo folistatina recombinante torna mais lenta a depuração *in vivo*. Em algumas modalidades, a substituição de um ou mais aminoácidos carregados negativamente, por exemplo, Ácido glutâmico (E) e/ou Ácido aspártico (D), por um ou mais aminoácidos lisina (K) resulta em uma alteração da carga global da molécula de folistatina recombinante. Em algumas modalidades, a substituição de um ou mais aminoácidos

carregados negativamente, por exemplo, Ácido glutâmico (E) e/ou Ácido aspártico (D), por um ou mais aminoácidos lisina (K) resulta em uma diminuição nas quantidades de espécies de peso molecular elevado durante a expressão do polipeptídeo folistatina recombinante. Em algumas modalidades, a substituição de um ou mais aminoácidos carregados negativamente, por exemplo, Ácido glutâmico (E) e/ou Ácido aspártico (D), por um ou mais aminoácidos lisina (K) resulta em expressão aumentada do polipeptídeo folistatina recombinante.

Tabela 2: Pontos isoelétricos de aminoácidos.

<u>Aminoácido</u>	<u>Abreviação de uma letra</u>	<u>pI (ponto isoelétrico)</u>
Alanina	A	6,0
Arginina	R	10,76
Asparagina	N	5,41
Ácido aspártico	D	2,77
Cisteína	C	5,07
Ácido glutâmico	E	3,22
Glutamina	Q	5,65
Glicina	G	5,97
Histidina	H	7,59
Isoleucina	I	6,02
Leucina	L	5,98
Lisina	K	9,74
Metionina	M	5,74
Fenilalanina	F	5,48
Prolina	P	6,30
Serina	S	5,58
Treonina	T	5,60

Triptofano	W	5,89
Tirosina	Y	5,66
Valina	V	5,96

[133] Foi demonstrado que FS inibe tanto miostatina quanto activina *in vitro* e que essa inibição pode levar à hipertrofia muscular *in vivo* em camundongos (Lee e cols., "Regulation of Muscle Mass by Follistatin and Activins", (2010), *Mol. Endocrinol.*, 24 (10): 1.998-2.008; Gilson e cols., "Follistatin Induces Muscle Hypertrophy Through Satellite Cell Proliferation and Inhibition of Both Myostatin and Activin", (2009), *J. Physiol. Endocrinol.*, 297 (1): E157-E164). Sem se prender a uma teoria particular, esse efeito observado pode ser, pelo menos parcialmente, decorrente do fato de que FS evita a ativação da via de Smad2/3 por miostatina e activina. Foi demonstrado que a ativação da via de Smad2/3 resulta na regulação negativa do crescimento muscular (Zhu e cols., "Follistatin Improves Skeletal Muscle Healing After Injury and Disease Through an Interaction with Muscle Regeneration, Angiogenesis, and Fibrosis", (2011), *Musculoskeletal Pathology*, 179 (2): 915-930).

[134] As seqüências de aminoácidos de proteínas FS315, FS303 e FS288 humanas do tipo selvagem ou de ocorrência natural típicas são mostradas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Isoformas de folistatina humana exemplares.

Isoforma	Seqüência da isoforma de folistatina
FS315 com seqüência sinalizadora	MVRARHQPGGLCLLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKE ECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKC <u>RMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQ</u> YQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGV

	TYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRG RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNS ISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW (ID. DE SEQ. N°: 1)
FS315	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFN GGAPNCIPCKETCENVDCGPG<u>GKKCRMNKKNKPRC</u>VCAPDCSNITWKGVPVCGLD GKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAY CVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIK AKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASE CAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNS<u>ISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW</u> (ID. DE SEQ. N°: 2)
FS303 com seqüência sinalizadora	<i>MVRARHQPGGLCLLLLLLCQFMEDRSAQ</i>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKE ECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFN<i>GGAPNCIPCKETCENVDCGPG<u>GKKC</u></i> <i>RMNKKNKPRC</i>VCAPDCSNITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQ YQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGV TYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRG RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNS ISEDTEEEEEDEDQ (ID. DE SEQ. N°: 3)
FS303	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFN GGAPNCIPCKETCENVDCGPG<u>GKKCRMNKKNKPRC</u>VCAPDCSNITWKGVPVCGLD GKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAY CVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIK AKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASE CAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQ (ID. DE SEQ. N°: 4)
FS288 com seqüência sinalizadora	<i>MVRARHQPGGLCLLLLLLCQFMEDRSAQ</i>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKE ECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFN<i>GGAPNCIPCKETCENVDCGPG<u>GKKC</u></i> <i>RMNKKNKPRC</i>VCAPDCSNITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQ YQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGV TYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRG RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCN

	(ID. DE SEQ. N° 119)
FS288	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFN GGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGVPVCGLD GKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAY CVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIK AKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASE CAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCN (ID. DE SEQ. N°: 5)

[135] Dessa forma, em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção é FS315 humana (ID. DE SEQ. N°: 1 ou ID. DE SEQ. N°: 2). Como revelado nesse relatório descritivo, ID. DE SEQ. N°: 2 representa a sequência de aminoácidos canônica para a proteína folistatina humana. Em algumas modalidades, uma proteína folistatina pode ser uma isoforma de *splice* ou variante proteolítica como, por exemplo, FS303 (ID. DE SEQ. N°: 3 ou ID. DE SEQ. N°: 4). Em algumas modalidades, uma proteína folistatina pode ser uma isoforma de *splice* como, por exemplo, FS288 (ID. DE SEQ. N°: 5). Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada pode ser um homólogo ou um análogo de uma proteína do tipo selvagem ou de ocorrência natural. Por exemplo, um homólogo ou um análogo de proteína folistatina humana do tipo selvagem ou de ocorrência natural pode conter uma ou mais substituições, deleções, e/ou inserções de aminoácidos ou domínios, comparada com uma proteína folistatina do tipo selvagem ou de ocorrência natural (por exemplo, ID. DE SEQ. N°: 1, ID. DE SEQ. N°: 2, ID. DE SEQ. N°: 3, ID. DE SEQ. N°: 4, ID. DE SEQ. N°: 5) enquanto retém, ao mesmo tempo, atividade substancial da proteína folistatina (por exemplo, inibição de miostatina ou activina). Dessa forma, em algumas

modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção é substancialmente homóloga à proteína folistatina humana FS315 (ID. DE SEQ. N°: 1). Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção possui uma sequência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais homóloga ao ID. DE SEQ. N°: 1. Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção é substancialmente idêntica à proteína folistatina humana FS315 (ID. DE SEQ. N°: 1). Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção possui uma sequência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica ao ID. DE SEQ. N°: 1.

[136] Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção é substancialmente homóloga à proteína folistatina humana FS315 (ID. DE SEQ. N°: 2). Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção possui uma sequência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais homóloga ao ID. DE SEQ. N°: 2. Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção é substancialmente idêntica à proteína folistatina humana FS315 (ID. DE SEQ. N°: 2). Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção possui uma sequência de aminoácidos pelo menos 50%,

55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica ao ID. DE SEQ. N°: 2.

[137] Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção é substancialmente homóloga à proteína folistatina humana FS303 (ID. DE SEQ. N°: 3). Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção possui uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais homóloga ao ID. DE SEQ. N°: 3. Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção é substancialmente idêntica à proteína folistatina humana FS303 (ID. DE SEQ. N°: 3). Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção possui uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica ao ID. DE SEQ. N°: 3.

[138] Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção é substancialmente homóloga à proteína folistatina humana FS303 (ID. DE SEQ. N°: 4). Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção possui uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais homóloga ao ID. DE SEQ. N°: 4. Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção é

substancialmente idêntica à proteína folistatina humana FS303 (ID. DE SEQ. N°: 4). Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção possui uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica ao ID. DE SEQ. N°: 4.

[139] Dessa forma, em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção é substancialmente homóloga à proteína folistatina humana FS288 (ID. DE SEQ. N°: 5). Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção possui uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais homóloga ao ID. DE SEQ. N°: 5. Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção é substancialmente idêntica à proteína folistatina humana FS288 (ID. DE SEQ. N°: 5). Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção possui uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica ao ID. DE SEQ. N°: 5.

[140] Homólogos ou análogos de proteínas folistatina humanas podem ser preparados de acordo com métodos para alteração da seqüência de polipeptídeos conhecidos por aqueles habilitados na técnica, tais como são encontrados em referências que compilam esses métodos. Como será observado por aqueles habilitados na técnica, duas seqüências são

geralmente consideradas como sendo “substancialmente homólogas” caso contenham resíduos homólogos em posições correspondentes. Resíduos homólogos podem ser resíduos idênticos. Alternativamente, resíduos homólogos podem ser resíduos não idênticos com características estruturais e/ou funcionais apropriadamente similares. Por exemplo, como é bem conhecido por aqueles habilitados na técnica, certos aminoácidos são tipicamente classificados como aminoácidos “hidrofóbicos” ou “hidrofílicos”, e/ou como tendo substituições de cadeia lateral “polar” ou “não polar” de um aminoácido por outro do mesmo tipo, e essa substituição pode freqüentemente ser considerada uma substituição “homóloga”. Em algumas modalidades, substituições conservativas de aminoácidos incluem substituições feitas entre aminoácidos dentro dos seguintes grupos: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; e (g) E, D. Em algumas modalidades, um “substituição conservativa de aminoácido” se refere a uma substituição de aminoácido que não altera as características relativas de carga ou tamanho da proteína na qual a substituição de aminoácido é feita.

[141] Como é bem conhecido nessa técnica, seqüências de aminoácidos ou de ácidos nucleicos podem ser comparadas com o uso de diversos algoritmos, incluindo aqueles disponíveis em programas de computador comerciais como, por exemplo, BLASTN, para seqüências de nucleotídeos, e BLASTP, BLAST Gapped e PSI-BLAST, para seqüências de aminoácidos. Programas desse tipo exemplares são descritos em Altschul, *e cols.*, “Basic Local Alignment Search Tool”, *J. Mol. Biol.*, 215 (3): 403-410, 1990; Altschul, *e cols.*, “Methods in Enzymology”; Altschul, *e cols.*, “Gapped BLAST and PSI-BLAST:

a New Generation of Protein Database Search Programs", *Nucleic Acids Res.* 25: 3.389-3.402, 1997; Baxevanis, e cols., "Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins", Wiley, 1998; e Misener, e cols., (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols* ("Methods in Molecular Biology", Vol. 132), Humana Press, 1999. Além da identificação de seqüências homólogas, os programas mencionados acima tipicamente fornecem uma indicação do grau de homologia.

[142] Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção contém uma ou mais deleções, inserções ou substituições de aminoácidos, comparada com uma proteína folistatina humana do tipo selvagem. Por exemplo, uma proteína folistatina recombinante adequada pode conter deleções, inserções e/ou substituições de aminoácidos como fornecidas na **Tabela 4**. As deleções, inserções e/ou substituições de aminoácidos exemplares são exemplificadas em FS315 que corresponde ao ID. DE SEQ. N°: 2. Em algumas modalidades, as mesmas deleções, inserções ou substituições podem estar presentes, nas localizações correspondentes, em FS315 que compreende a seqüência sinalizadora (por exemplo, ID. DE SEQ. N°: 1), FS303 (por exemplo, ID. DE SEQ. N°: 3, ID. DE SEQ. N°: 4) ou FS288 (por exemplo, ID. DE SEQ. N°: 5).

Tabela 4. Proteínas folistatina recombinantes exemplares.

ID. de Seqüência N° (descrição da mutação*)	Proteínas folistatina recombinantes exemplares
ID. DE SEQ. N° 12 (deleção de	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIP

aminoácidos 75 a 86; ponto de quebra indicado por ^^)	CKETCENVDCGPGVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKAR CKEQPELEVQYQGR ^^ CKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGND GVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCL WDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
ID. DE SEQ. Nº: 13 (deleção de aminoácidos 75 a 84 e inserção de QSCVVDQTGS (ID. DE SEQ. Nº: 14)**	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGQSCVVDQTGSPRCVCAPDCS NITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCCKEPELEVQYQGRCKKTCRD VFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVK HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
ID. DE SEQ. Nº: 15 (K(81,82)A)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNAANKPRVCAPDCS NITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCCKEPELEVQYQGRCKKTCRD VFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVK HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
ID. DE SEQ. Nº: 16 (K(76, 81, 82)A)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKACRMNAANKPRVCAPDCS NITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCCKEPELEVQYQGRCKKTCRD VFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVK HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
ID. DE SEQ. Nº: 17	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF

(K82E)	KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMN<u>K</u>ENKPRVCAPDCS NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYL CGNDGVTYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVK HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
ID. DE SEQ. Nº: 18 (K(75,76)E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG<u>E</u>ECRMNKKNKPRVCAPDCS NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYL CGNDGVTYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVK HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
ID. DE SEQ. Nº: 19 (K(76,82)E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK<u>E</u>CRMN<u>K</u>ENKPRVCAPDCS NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYL CGNDGVTYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVK HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
ID. DE SEQ. Nº: 20 (K(81,82)E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRM<u>N</u>EEENKPRVCAPDCS NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYL CGNDGVTYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVK HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
ID. DE SEQ. Nº: 21 (K(76,81,82)E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK<u>E</u>CRM<u>N</u>EEENKPRVCAPDCS NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD

	VFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEV HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
ID. DE SEQ. Nº: 22 (K(76,81,82)E/V88E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKE <u>CRMNEEN</u> KPRCECAPDCS NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEV HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
ID. DE SEQ. Nº: 23 (K84E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNE <u>PRCVCAPDCS</u> NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEV HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
ID. DE SEQ. Nº: 24 (K(76,84)E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKE <u>CRMNKKNE</u> PRCVCAPDCS NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEV HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
ID. DE SEQ. Nº: 25 (K(82,84)E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKEN <u>ENE</u> PRCVCAPDCS NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR

	GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVK HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
ID. DE SEQ. Nº: 26 (R78E/K84E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCEMKNKNEPRVCAPDCS NITWKGPPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVK HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
ID. DE SEQ. Nº: 27 (K(76, 82, 84)E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKCECRMKNENEPRVCAPDCS NITWKGPPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVK HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
ID. DE SEQ. Nº: 28 (R78E/K82E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCEMKNKENKPRVCAPDCS NITWKGPPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVK HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
ID. DE SEQ. Nº: 29 (R78E/K(82, 84)E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCEMKNENEPRVCAPDCS NITWKGPPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVK HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW

ID. DE SEQ. Nº: 30 K(76,81)E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKE <u>CRMNE</u> KNKPRVCAPDCS NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFPCGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVK HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW
ID. DE SEQ. Nº: 31 (K82T)#	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMN <u>KTN</u> KPRVCAPDCS NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFPCGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVK HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW
ID. DE SEQ. Nº: 32 (P85T)#	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKK <u>NKTR</u> CVAPDCS NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFPCGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVK HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW
ID. DE SEQ. Nº: 33 (R78N/N80T)#	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCN <u>MT</u> KKNKPRVCAPDCS NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFPCGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVK HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW
ID. DE SEQ. Nº: 34 (R86N/V88T)#	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKKN <u>PNC</u> TAPDCS

	NITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVK HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW
ID. DE SEQ. Nº: 35 (K75N/C77T/K82T)#	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPNKTRMKNKTNKPRVCAPDCS NITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVK HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW
ID. DE SEQ. Nº: 36 (G74N/K76S)#	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPNKSCRMNKNKNKPRVCAPDCS NITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVK HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW
ID. DE SEQ. Nº: 37 (G74N/K76T)#	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPNKTCRMNKNKNKPRVCAPDCS NITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVK HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW
ID. DE SEQ. Nº: 38 (G74N/K76T/P85T)#	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPNKTCRMNKNKNKTRCVCAPDCS NITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSA

	CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVG GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEV HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
ID. DE SEQ. Nº: 39 (C66S/K75N/C77T)#	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETS <u>EN</u> VDCGPGN <u>K</u> TRMNKKNKPRCVCAPDCS NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVG GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEV HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
ID. DE SEQ. Nº: 40 (C66A/K75N/C77T)#	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETA <u>EN</u> VDCGPGN <u>K</u> TRMNKKNKPRCVCAPDCS NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVG GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEV HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
ID. DE SEQ. Nº 101 (K75N/C77S/K82T)#	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGN <u>K</u> <u>S</u> RMN <u>K</u> TNKPRCVCAPDCS NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVG GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEV HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
ID. DE SEQ. Nº 102 (C66S/K75N/C77S)#	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETS <u>EN</u> VDCGPGN <u>K</u> <u>S</u> RMNKKKNKPRCVCAPDCS NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVG GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEV

	HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
ID. DE SEQ. N° 103 (C66A/K75N/C77S)#	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETA <u>EN</u> VDCGPGN <u>KSR</u> MNKKNKPRCVCAPDCS NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFPCGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVK HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
ID. DE SEQ. N° 104 K(81,82)D	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMND <u>DN</u> KPRCVCAPDCS NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFPCGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVK HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
ID. DE SEQ. N° 105 K(76,81,82)D	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK <u>DCRM</u> ND <u>DN</u> KPRCVCAPDCS NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFPCGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVK HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW
ID. DE SEQ. N° 106 K(76,82)D	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK <u>DCRM</u> NK <u>DN</u> KPRCVCAPDCS NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRD VFPCGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSA CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVK HSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW

* numeração de aminoácidos corresponde à seqüência de FS315

(por exemplo, ID. DE SEQ. Nº: 2); alterações de aminoácidos comparadas com a sequência de FS315 do tipo selvagem estão sublinhadas.

** Substituição de QSCVVDQTGS foi publicada em *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2015) 354 (2): 238. Isso foi usado como um controle experimental.

variante de hiperglicosilação

[143] A glicosilação é uma modificação pós-tradução complexa para glicoproteínas, e afeta a solubilidade, enovelamento, estabilidade, transporte celular, imunogenicidade, bioatividade e distribuição da proteína. Atualmente mais de 15 glico-anticorpos modificados geneticamente estão sendo avaliados em estudos clínicos. Isoformas de FS nativas possuem três sítios de N-glicosilação em asparagina N95, N112 e N259 (Figura 1). A introdução de novos sítios de glicosilação na alça de ligação à heparina de FS para modular potencialmente o teor de carboidratos, bloquear a ligação à heparina e reduzir o risco de imunogenicidade é inexplorada.

[144] Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção inclui mutantes de hiperglicosilação da região HBS que possuem uma sequência de consenso N-X-T/S. O consenso N-X-T/S é um motivo de sequência de consenso de glicosilação, em que X pode ser qualquer aminoácido, exceto prolina entre Asn (N) e Thr (T) ou Asn (N) e Ser (S). Em algumas modalidades, a adição de sequência de consenso de glicosilação mascara, prejudica ou evita a ligação à heparina. Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção compreende as seqüências de aminoácidos fornecidas

na **Tabela 5** que correspondem às posições 66 a 88 das proteínas folistatina humanas do tipo selvagem FS315, FS303 e FS288 (por exemplo, ID. DE SEQ. N°: 2, ID. DE SEQ. N°: 4 ou ID. DE SEQ. N°: 5). Em algumas modalidades, variantes de hiperglicosilação possuem parâmetros PK aprimorados. Em algumas modalidades, variantes de hiperglicosilação não possuem uma alteração líquida na carga, como indicado pelo pI (ponto isoelétrico).

[145] Em algumas modalidades, a deleção, inserção ou substituição de aminoácidos dentro do polipeptídeo folistatina está dentro do HBS. Em algumas modalidades, a deleção, inserção ou substituição de aminoácidos está perto, ou adjacente ao HBS, por exemplo, dentro de 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 aminoácido do aminoácido do terminal-N ou terminal-C do HBS. Sem se prender à teoria, está contemplado que alterações dentro, perto ou adjacente ao HBS reduzem a ligação à heparina. A ligação à heparina reduzida é contemplada para aprimorar os parâmetros farmacocinéticos da proteína recombinante como, por exemplo, meia-vida sérica *in vivo*. Sem se prender à teoria, também é contemplado que alterações dentro, perto ou adjacente ao HBS podem reduzir a imunogenicidade e/ou aumentar a expressão da proteína recombinante. Em algumas modalidades, expressão aumentada de folistatina recombinante está presente com uma ou mais mutações de HBS K75D, K75E, K76D, K76E, K81D, K81E, K81D ou K82E. Em algumas modalidades, expressão aumentada de folistatina recombinante está presente com a mutação de HBS K82E. Em algumas modalidades, a substituição de pelo menos um resíduo de aminoácido (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,

8, 9 ou 10) dentro do HBS com pelo menos um resíduo de aminoácido que possui uma carga menos positiva pode reduzir a ligação à heparina pela proteína folistatina recombinante.

[146] Em algumas modalidades, substituições de aminoácidos dentro do polipeptídeo folistatina introduzem sítios de glicosilação de consenso dentro da região de ligação à heparina (por exemplo, K82T, P85T, R78N/N80T, R86N/V88T, K75N/C77T/K82T, G74N/K76S, G74N/K76T, G74N/K76T/P85T, C66S/K75N/C77T, C66A/K75N/C77T K75N/C77S/K82T, C66S/K75N/C77S, C66A/K75N/C77S). Prevê-se que a glicosilação subsequente do(s) aminoácido(s) mascare o domínio de ligação à heparina e, dessa forma, reduza a ligação da proteína recombinante à heparina. Espera-se também que a presença do glicano mascare o(s) aminoácido(s) substituído(s) modulando, dessa forma, qualquer aumento potencial na imunogenicidade conferido pela proteína recombinante. Prevê-se também que a hiperglicosilação aumente a solubilidade e/ou meia-vida da proteína recombinante. Variantes de hiperglicosilação exemplares são mostradas, como indicado, nas Tabelas 4, 5 e 9.

Tabela 5. Sequências de FS exemplares.

ID. de Sequência Nº (descrição da mutação*)	Sequência de FS que corresponde aos aminoácidos 66 a 88 de folistatina do tipo selvagem*
FS-WT aminoácidos 66 a 88 ID. DE SEQ. Nº 107	CENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCV
FSdelHBS (FSD2) (FS315; FS303; FS288) ID. DE SEQ. Nº 108	CENVDCGPGSTCVVDQTNNAYCV
FS315HBS (del75-86)	CENVDCGPG-----CV

ID. DE SEQ. Nº 109	
ID. DE SEQ. Nº: 41 FS315delHBS/FSTL-D2 (deleção de aminoácidos 75 a 84 e inserção de QSCVVDQTGS (ID. DE SEQ. Nº: 14))**	CENVDCGPGQSCVVDQTGSPRCV
ID. DE SEQ. Nº: 42 (K(81,82)A)	CENVDCGPGKKCRMNAANKPRCV
ID. DE SEQ. Nº: 43 (K(76,81,82)A)	CENVDCGPGKACRMNAANKPRCV
ID. DE SEQ. Nº: 44 (K82E)	CENVDCGPGKKCRMNKENKPRCV
ID. DE SEQ. Nº: 45 (K(75,76)E)	CENVDCGPGEECRMNKKNKPRCV
ID. DE SEQ. Nº: 46 (K(76,82)E)	CENVDCGPGKECRMNKENKPRCV
ID. DE SEQ. Nº: 47 (K(81,82)E)	CENVDCGPGKKCRMNEENKPRCV
ID. DE SEQ. Nº: 48 (K(76,81,82)E)	CENVDCGPGKECRMNEENKPRCV
ID. DE SEQ. Nº: 49 (K(76,81,82)E/V88E)	CENVDCGPGKECRMNEENKPRCE
ID. DE SEQ. Nº: 50 (K84E)	CENVDCGPGKKCRMNKKNEPRCV
ID. DE SEQ. Nº: 51 (K(76,84)E)	CENVDCGPGKECRMNKKNEPRCV
ID. DE SEQ. Nº: 52 (K(82,84)E)	CENVDCGPGKKCRMNKENEPRCV
ID. DE SEQ. Nº: 53 (R78E/K84E)	CENVDCGPGKKCEMNKKNEPRCV

ID. DE SEQ. Nº: 54 (K(76,82,84)E)	CENVDCGPGK <u>E</u> CRM <u>N</u> K <u>E</u> N <u>E</u> PRCV
ID. DE SEQ. Nº: 55 (R78E/K82E)	CENVDCGPGKK <u>C</u> EM <u>N</u> K <u>E</u> NKPRCV
ID. DE SEQ. Nº: 56 (R78E/K(82,84)E)	CENVDCGPGKK <u>C</u> EM <u>N</u> K <u>E</u> N <u>E</u> PRCV
ID. DE SEQ. Nº: 57 (K(76,81)E)	CENVDCGPGK <u>E</u> CRM <u>N</u> <u>E</u> K <u>N</u> KPRCV
ID. DE SEQ. Nº: 58 (K82T)#	CENVDCGPGKKCRM <u>N</u> K <u>T</u> NKPRCV
ID. DE SEQ. Nº: 59 (P85T)#	CENVDCGPGKKCRM <u>N</u> K <u>K</u> N <u>K</u> <u>T</u> RCV
ID. DE SEQ. Nº60 (R78N/N80T)#	CENVDCGPGKKCN <u>M</u> T <u>K</u> K <u>N</u> KPRCV
ID. DE SEQ. Nº61 (R86N/V88T)#	CENVDCGPGKKCRM <u>N</u> K <u>K</u> N <u>K</u> P <u>N</u> <u>C</u> <u>T</u>
ID. DE SEQ. Nº62 (K75N/C77T/K82T)#	CENVDCGPG <u>N</u> K <u>T</u> RM <u>N</u> K <u>T</u> NKPRCV
ID. DE SEQ. Nº63 (G74N/K76S)#	CENVDCGPN <u>K</u> <u>S</u> CRM <u>N</u> K <u>K</u> NKPRCV
ID. DE SEQ. Nº64 (G74N/K76T)#	CENVDCGPN <u>K</u> <u>T</u> CRM <u>N</u> K <u>K</u> NKPRCV
ID. DE SEQ. Nº65 (G74N/K76T/P85T)#	CENVDCGPN <u>K</u> <u>T</u> CRM <u>N</u> K <u>K</u> N <u>K</u> <u>T</u> RCV
ID. DE SEQ. Nº66 (C66S/K75N/C77T)#	<u>S</u> ENVDCGPG <u>N</u> K <u>T</u> RM <u>N</u> K <u>K</u> NKPRCV
ID. DE SEQ. Nº67 (C66A/K75N/C77T)#	<u>A</u> ENVDCGPG <u>N</u> K <u>T</u> RM <u>N</u> K <u>K</u> NKPRCV
ID. DE SEQ. Nº 111 (K75N/C77S/K82T)#	CENVDCGPG <u>N</u> K <u>S</u> RM <u>N</u> K <u>T</u> NKPRCV

ID. DE SEQ. Nº 112 (C66S/K75N/C77S)#	<u>S</u> ENVDCGPG <u>N</u> K <u>S</u> RMNKKNKPRCV
ID. DE SEQ. Nº 113 (C66A/K75N/C77S)#	<u>A</u> ENVDCGPG <u>N</u> K <u>S</u> RMNKKNKPRCV
ID. DE SEQ. Nº 114 K(81,82)D	CENVDCGPGKKCRM <u>N</u> DDNKPRCV
ID. DE SEQ. Nº 115 K(76,81,82)D	CENVDCGPGK <u>D</u> CRM <u>N</u> DDNKPRCV
ID. DE SEQ. Nº 116 K(76,82)D	CENVDCGPGK <u>D</u> CRMN <u>K</u> DNKPRCV

* numeração de aminoácidos corresponde à seqüência de FS315 (por exemplo, ID. DE SEQ. Nº: 2); alterações de aminoácidos estão sublinhadas.

**Substituição de QSCVVDQTGS foi publicada em *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2015) 354(2): 238. Isso foi usado como um controle experimental.

variante de hiperglicosilação.

Proteínas de fusão de folistatina

[147] Está contemplado que uma proteína folistatina recombinante adequada pode estar em uma configuração de proteína de fusão. Por exemplo, uma proteína folistatina recombinante adequada para a presente invenção pode ser uma proteína de fusão entre um domínio de folistatina e outro domínio ou porção que tipicamente pode facilitar um efeito terapêutico de folistatina como, por exemplo, por intensificação ou aumento da estabilidade, potência e/ou liberação de proteína folistatina, ou redução ou eliminação de imunogenicidade, ou depuração. Esses domínios ou porções adequados para uma proteína folistatina de fusão incluem, sem limitação, domínio Fc, domínio XTEN ou fusões de albumina

humana.

Domínio Fc

[148] Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada contém um domínio Fc ou uma porção deste que se liga ao receptor FcRn. Como um exemplo não limitante, um domínio Fc adequado pode ser derivado de uma subclasse de imunoglobulina como, por exemplo, IgG. Em algumas modalidades, um domínio Fc adequado é derivado de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Em algumas modalidades, um domínio Fc adequado é derivado de IgM, IgA, IgD ou IgE. Domínios Fc particularmente adequados incluem aqueles derivados de anticorpos humanos ou humanizados. Em algumas modalidades, um domínio Fc adequado é uma porção Fc modificada, por exemplo, uma porção Fc humana modificada.

[149] Em algumas modalidades, um domínio Fc adequado compreende uma sequência de aminoácidos como fornecida na **Tabela 6.**

Tabela 6. Domínios Fc exemplares.

ID. de Sequência N° (descrição)	Domínio Fc*
ID. DE SEQ. N°6 (Fc de IgG1 humana do tipo selvagem)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. N°7 (Fc de IgG1 humana-LALA)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG

	NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. N°8 (Fc de IgG1 humana-NHance)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEAL <u>K</u> FHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. N°9 (Fc de IgG1 humana-LALA + NHance)	DKTHTCPPCPAPE <u>A</u> AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEAL <u>K</u> FHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. N°: 10	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. N°: 11	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

* numeração de aminoácidos baseada na numeração de EU.
Mutações LALA e NHance estão sublinhadas.

[150] Em algumas modalidades, um domínio Fc adequado compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais homóloga ou idêntica ao ID. DE SEQ. N°6, ID. DE SEQ. N°7, ID. DE SEQ. N°8, ID. DE SEQ. N°9, ID. DE SEQ. N°: 10 ou ID. DE SEQ. N°: 11.

[151] Está contemplado que a ligação aumentada entre o

domínio Fc e o receptor FcRn resulta em meia-vida sérica prolongada da proteína recombinante. Dessa forma, em algumas modalidades, um domínio Fc adequado compreende uma ou mais mutações de aminoácidos que levam à ligação aumentada ao FcRn. Várias mutações dentro do domínio Fc que resultam em ligação aumentada ao FcRn são conhecidas na técnica e podem ser adaptadas para a prática da presente invenção. Em algumas modalidades, um domínio Fc adequado compreende uma ou mais mutações em uma ou mais posições que correspondem a Thr 250, Met 252, Ser 254, Thr 256, Thr 307, Glu 380, Met 428, His 433 e/ou Asn 434 de IgG1 humana, de acordo com a numeração de EU.

[152] Em algumas modalidades, um domínio Fc adequado compreende uma ou mais mutações em uma ou mais posições que correspondem a L234, L235, H433 e N434 de IgG1 humana, de acordo com a numeração de EU.

[153] A porção Fc de uma proteína de fusão recombinante pode levar ao direcionamento às células que expressam receptores Fc, levando a efeitos pró-inflamatórios. Algumas mutações no domínio Fc reduzem a ligação da proteína recombinante ao receptor Fc gama e, desse modo, inibem funções efetoras. Em uma modalidade, a função efetora é citotoxicidade mediada por células anticorpo-dependente (ADCC). Por exemplo, um domínio Fc adequado pode conter mutações de L234A (Leu234Ala) e/ou L235A (Leu235Ala) (numeração de EU). Em algumas modalidades, as mutações L234A e L235A também são referidas como as mutações LALA. Como um exemplo não limitante, um domínio Fc adequado pode conter mutações L234A e L235A (numeração de EU). Uma sequência de domínio Fc exemplar que compreende as mutações L234A e L235A

é mostrada como ID. DE SEQ. N°7 na **Tabela 6**.

[154] Em algumas modalidades, um domínio Fc adequado pode conter mutações de H433K (His433Lys) e/ou N434F (Asn434Phe) (numeração de EU). Como um exemplo não limitante, um domínio Fc adequado pode conter mutações H433K e N434F (numeração de EU). Em algumas modalidades as mutações H433K e N434F também são referidas como as mutações NHance. Uma seqüência de domínio Fc exemplar que incorpora as mutações H433K e N434F é mostrada como ID. DE SEQ. N°8 na **Tabela 6**.

[155] Em algumas modalidades, um domínio Fc adequado pode conter mutações de L234A (Leu234Ala), L235A (Leu235Ala), H433K (His433Lys) e/ou N434F (Asn434Phe) (numeração de EU). Como um exemplo não limitante, um domínio Fc adequado pode conter mutações L234A, L235A, H433K e N434F (numeração de EU). Uma seqüência de domínio Fc exemplar que incorpora as mutações L234A, L235A, H433K e N434F é mostrada como ID. DE SEQ. N°9 na **Tabela 6**.

[156] Substituições de aminoácidos adicionais que podem ser incluídas no domínio Fc incluem aquelas descritas, por exemplo, nas Patentes U.S. N°s 6.277.375; 8.012.476; e 8.163.881, que são incorporadas nesse relatório descritivo por referência.

Vinculador ou espaçador

[157] Um domínio de folistatina pode ser ligado diretamente ou indiretamente a um domínio Fc. Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante adequada contém um vinculador ou espaçador que une um domínio de folistatina e um domínio Fc. Um vinculador ou espaçador de aminoácido é geralmente projetado para ser flexível ou se interpor em uma estrutura, por exemplo, uma alfa-hélice,

entre as duas porções de proteína. Um vinculador ou espaçador pode ser relativamente curto, ou pode ser mais longo. Tipicamente, um vinculador ou espaçador contém por exemplo, 3-100 (por exemplo, 5-100, 10-100, 20-100, 30-100, 40-100, 50-100, 60-100, 70-100, 80-100, 90-100, 5-55, 10-50, 10-45, 10-40, 10-35, 10-30, 10-25, 10-20) aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, um vinculador ou espaçador é igual ou mais longo do que 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, ou 100 aminoácidos de comprimento. Tipicamente, um vinculador mais longo pode diminuir o impedimento estérico. Em algumas modalidades, um vinculador compreenderá uma mistura de resíduos de glicina e serina. Em algumas modalidades, o vinculador pode adicionalmente compreender resíduos de treonina, prolina e/ou alanina. Dessa forma, em algumas modalidades, o vinculador compreende entre 10-100, 10-90, 10-80, 10-70, 10-60, 10-50, 10-40, 10-30, 10-20, 10-15 aminoácidos. Em algumas modalidades, o vinculador compreende pelo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, ou 95 aminoácidos. Em algumas modalidades, o vinculador não é um vinculador que consiste em ALEVLFGQP (ID. DE SEQ. N°68).

[158] Como exemplos não limitantes, vinculadores ou espaçadores adequados para a presente invenção incluem, sem limitação:

GGG (ID. DE SEQ. N°69);

GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (vinculador GAG, ID. DE SEQ. N°70);

GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (vinculador GAG2, ID. DE SEQ. N°71); e

GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGG
 GAP (vinculador GAG3, ID. DE SEQ. N°72).

[159] Vinculadores ou espaçadores adequados também incluem aqueles que possuem uma sequência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais homóloga ou idêntica aos vinculadores exemplares acima, por exemplo, vinculador GAG (ID. DE SEQ. N°70), vinculador GAG2 (ID. DE SEQ. N°71), ou vinculador GAG3 (ID. DE SEQ. N°72). Vinculadores adicionais adequados para uso com algumas modalidades podem ser encontrados em US20120232021, depositado em 2 de março de 2012, cuja revelação é incorporada nesse relatório descritivo por referência em sua totalidade.

[160] Em algumas modalidades, é fornecido um vinculador que se associa ao polipeptídeo folistatina com o domínio Fc sem afetar substancialmente a habilidade do polipeptídeo folistatina para se ligar a qualquer um de seus ligantes cognatos (por exemplo, activina A, miostatina, heparina etc.). Em algumas modalidades, é fornecido um vinculador de modo que a ligação de um peptídeo folistatina à heparina não seja alterada, comparado com o polipeptídeo folistatina isoladamente.

Proteínas de fusão de folistatina exemplares

[161] Em modalidades particulares, uma proteína de fusão de folistatina recombinante adequada inclui um polipeptídeo folistatina e um domínio Fc, em que o polipeptídeo folistatina compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica à proteína

FS315 humana do tipo selvagem (ID. DE SEQ. Nº: 1 ou ID. DE SEQ. Nº: 2), proteína FS303 (ID. DE SEQ. Nº: 3 ou ID. DE SEQ. Nº: 4) ou FS288 (ID. DE SEQ. Nº: 5). Em modalidades particulares, uma proteína de fusão de folistatina recombinante adequada inclui um polipeptídeo folistatina, um domínio Fc, e um vinculador que se associa ao polipeptídeo folistatina com o domínio Fc, em que o polipeptídeo folistatina compreende uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica à proteína FS315 humana do tipo selvagem (ID. DE SEQ. Nº: 1) ou proteína FS315 (ID. DE SEQ. Nº: 2). Tipicamente, uma proteína de fusão de folistatina recombinante adequada é capaz de ligação à activina A e miostatina. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão de folistatina recombinante adequada possui uma meia-vida *in vivo* que varia de cerca de 0,5-6 dias (por exemplo, cerca de 0,5-5,5 dias, cerca de 0,5-5 dias, cerca de 1-5 dias, cerca de 1,5-5 dias, cerca de 1,5-4,5 dias, cerca de 1,5-4,0 dias, cerca de 1,5-3,5 dias, cerca de 1,5-3 dias, cerca de 1,5-2,5 dias, cerca de 2-6 dias, cerca de 2-5,5 dias, cerca de 2-5 dias, cerca de 2-4,5 dias, cerca de 2-4 dias, cerca de 2-3,5 dias, cerca de 2-3 dias). Em algumas modalidades, uma proteína de fusão de folistatina recombinante adequada possui uma meia-vida *in vivo* que varia de cerca de 2-10 dias (por exemplo, que varia de cerca de 2,5-10 dias, de cerca de 3-10 dias, de cerca de 3,5-10 dias, de cerca de 4-10 dias, de cerca de 4,5-10 dias, de cerca de 5-10 dias, de cerca de 3-8 dias, de cerca de 3,5-8 dias, de cerca de 4-8 dias, de cerca de 4,5-8 dias, de cerca de 5-8 dias, de cerca de 3-6 dias, de cerca de 3,5-6 dias, de cerca

de 4-6 dias, de cerca de 4,5-6 dias, de cerca de 5-6 dias).

[162] Como exemplos não limitantes, proteínas de fusão folistatina-Fc adequadas podem ter uma sequência de aminoácidos mostrada na Tabela 7.

Tabela 7: Proteínas de fusão folistatina-Fc exemplares.

ID. de Sequência N° (descrição da mutação*)	Proteínas de fusão folistatina-Fc recombinantes exemplares #
ID. DE SEQ. N° 73 (deleção de aminoácidos 75 a 86; ponto de quebra indicado por ^^)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGVCAPDCSNITWKGPCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGR ^^ CKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVTCNTRICPEPASSEQYLCGNDGVTYS SACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRC SLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSI SEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEWDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. N°74 (deleção de aminoácidos 75 a 84 e inserção de QSCVVDQTGS (ID. DE SEQ. N°: 14)**	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGQSCVVDQTGSPRCVAPDCSNITWKGPCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNTRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEWDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY

	PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. Nº75 (K(81,82)A)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNAANKPRVCAPDCSNITWKGVPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEW DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. Nº76 (K(76,81,82)A)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKACRMNAANKPRVCAPDCSNITWKGVPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEW DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. Nº77 (K82E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKENKPRVCAPDCSNITWKGVPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI

	LEWDKTHTCPPCPAPEA<u>A</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. Nº 78 (K(75,76)E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPG<u>E</u>ECRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEWDKTHTCPPCPAPEA<u>A</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. Nº 79 (K(76,82)E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK<u>E</u>ECRMNKENKPRCVCAPDCSNITWKGPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEWDKTHTCPPCPAPEA<u>A</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. Nº 80 (K(81,82)E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNE<u>E</u>ENKPRCVCAPDCSNITWKGPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN

	NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEWDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. Nº81 (K(76,81,82)E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKECRMNEENKPRCVCAPDCSNITWKGVPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEWDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. Nº82 (K(76,81,82)E/ V88E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKECRMNEENKPRCECAPDCSNITWKGVPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEWDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ID. DE SEQ. Nº83 (K84E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNEPRVCAPDCSNITWKGVPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEWDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. Nº84 (K(76,84)E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK~~E~~CRMNKKNEPRVCAPDCSNITWKGVPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEWDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. Nº85 (K(82,84)E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKEN~~E~~PRVCAPDCSNITWKGVPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEWDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

	KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. Nº86 (R78E/K84E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCEMKNKNEPRCVCAPDCSNITWKGVPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEW DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. Nº87 (K(76,82,84)E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKCEMKNKENEPRCVCAPDCSNITWKGVPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEW DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. Nº88 (R78E/K82E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCEMKNKENKPRCVCAPDCSNITWKGVPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA

	TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEWDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. Nº89 (R78E/K(82,84) E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCEMKNENEPRVCAPDCSNITWKGVPVC LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEWDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. Nº90 K(76,81)E)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKCECRMNEKNKPRVCAPDCSNITWKGVPVC LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEWDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. Nº91	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKTNKPRVCAPDCSNITWKGVPVC

(K82T)	LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEWDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. Nº92 (P85T)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKTRCVCAPDCSNITWKGVPVG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEWDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. Nº93 (R78N/N80T)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCNMTKKNKPRCVCAPDCSNITWKGVPVG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEWDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC

	SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. N°94 (R86N/V88T)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPNCTCAPDCSNITWKGVPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEW DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. N°95 (K75N/C77T/K82 T)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGNKTRMNKTNKPRCVCAPDCSNITWKGVPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEW DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. N°96 (G74N/K76S)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPNKSCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGVPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEW DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE

	DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. Nº97 (G74N/K76T)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPNKTCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEWDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTEPVTCTVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. Nº98 (G74N/K76T/P85 T)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPNKTCRMNKKNKTRCVCAPDCSNITWKGPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEWDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTEPVTCTVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. Nº99 (C66S/K75N/C77 T)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETSENVDCGPGNKTRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG

	KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEWDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. N°: 100 (C66A/K75N/C77 T)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETAENVDCGPGNKTRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEWDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. N° 117 (K(76,82)D)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKDCRMNKDNKPRCVCAPDCSNITWKGPPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEWDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ID. DE SEQ. N°	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF

120 (K(81,82)D)	NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMND <u>DN</u> KPRCVCAPDCSNITWKG ~~P~~ VCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEW <i>DKTHTCPPCPAPEAAGG</i> PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE <i>DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC</i> <i>KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY</i> <i>PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC</i> <i>SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</i>
ID. DE SEQ. Nº 118 (K(76,81,82)D)	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK <u>DC</u> RMND <u>DN</u> KPRCVCAPDCSNITWKG ~~P~~ VCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEG KCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSI LEW <i>DKTHTCPPCPAPEAAGG</i> PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE <i>DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC</i> <i>KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY</i> <i>PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC</i> <i>SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</i>

* numeração dos aminoácido de FS corresponde à sequência de FS315 (por exemplo, ID. DE SEQ. Nº: 2).

** Substituição de QSCVVDQTGS foi publicada em *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2015) 354 (2): 238. Isso foi usado como um controle experimental.

sequência em negrito e itálico corresponde à Fc de IgG1 humana que compreende mutações LALA nas posições 234 e 235 (sublinhadas e de acordo com a numeração de EU) (ID. DE SEQ. Nº7).

[163] Em algumas modalidades, as proteínas de fusão folistatina-Fc recombinantes podem ser designadas como FS315K(81,82)A-hFcLALA, FS315K(81,82)A-GGG-hFcLALA, FS315K(76,81,82)A-hFcLALA, FS303K(76,81,82)A-hFcLALA, FS315K(76,81,82)A-GGG-hFcLALA, FS303K(76,81,82)A-GGG-hFcLALA, FS315K82T-hFcLALA, FS303K82T-hFcLALA, FS315K82T-GGG-hFcLALA, FS303K82T-GGG-hFcLALA, FS315K(76,81)E-hFcLALA, FS315K(76,81,82)E/V88E-hFcLALA, FS315WT-hFcLALA, FS315K(75,76)E-hFcLALA, FS315K(76,82)E-hFcLALA, FS315K(76,82)D-hFcLALA, FS315R86N/V88T-hFcLALA, FS315K75N/C77T/K82T-hFcLALA, FS315K75N/C77S/K82T-hFcLALA, FS315 del75-86-hFcLALA, FS315K(81,82)E-hFcLALA, FS315K(81,82)D-hFcLALA FS315K82E-hFcLALA, FS315K(76,81,82)E-hFcLALA, FS315K(76,81,82)D-hFcLALA, FS315R78N/N80T-hFcLALA, FS315P85T-hFcLALA, FS315K(76,81)E-hFcLALA ou FS315K75N/C77N/K82T-hFcLALA.

[164] Está contemplado que uma proteína de fusão folistatina-Fc pode ser fornecida em várias configurações, incluindo configurações homodiméricas ou monoméricas. Por exemplo, uma configuração homodimérica adequada pode ser projetada para ter a extremidade do terminal-C do parceiro de fusão (por exemplo, um polipeptídeo folistatina mais vinculador) anexada à extremidade do terminal-N de ambas as fitas do polipeptídeo Fc. Uma configuração monomérica adequada pode ser projetada para ter a extremidade do terminal-C do parceiro de fusão (por exemplo, um polipeptídeo folistatina mais vinculador) fundida a um dímero de Fc, ou a um monômero de Fc. Uma configuração monomérica pode diminuir o impedimento estérico.

[165] Como usado nesse relatório descritivo, o termo

“percentual (%) de identidade de seqüência de aminoácidos” com relação a uma seqüência de proteína de referência (por exemplo, uma seqüência de proteína folistatina de referência) identificada nesse relatório descritivo é definido como a percentagem de resíduos de aminoácidos em uma seqüência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácidos na seqüência de referência, após alinhamento das seqüências e introdução de lacunas (*gaps*), se necessário, para obter o percentual máximo de identidade de seqüência, e não considerando quaisquer substituições conservativas como parte da identidade de seqüência. O alinhamento para fins de determinação do percentual de identidade de seqüência de aminoácidos pode ser obtido de várias formas que estão dentro dos conhecimentos na técnica, por exemplo, usando software de computador disponível publicamente como, por exemplo, o software BLAST, ALIGN ou Megalign (DNASTAR). Aqueles habilitados na técnica podem determinar parâmetros apropriados para medição do alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para obter alinhamento máximo ao longo do comprimento total das seqüências que estão sendo comparadas. De preferência, o software WU-BLAST-2 é usado para determinar a identidade de seqüência de aminoácidos (Altschul e cols., “Methods in Enzymology” 266, 460-480 (1996); <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>). WU-BLAST-2 usa vários parâmetros de pesquisa, a maioria deles ajustada para valores-padrão. Os parâmetros ajustáveis são configurados com os seguintes valores: amplitude de sobreposição = 1, fração de sobreposição = 0,125, limiar de palavra (T) = 11. Os parâmetros de pontuação HSP (S) e HSP S2 são valores dinâmicos e são estabelecidos pelo próprio

programa, dependendo da composição da sequência particular, no entanto, os valores mínimos podem ser ajustados e são configurados como indicado acima.

[166] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão folistatina-Fc recombinante inibe a ligação e/ou atividade de miostatina. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão folistatina-Fc recombinante possui uma K_D de mais do que cerca de 0,1 pM, mais do que cerca de 0,5 pM, mais do que cerca de 1 pM, mais do que cerca de 5 pM, mais do que cerca de 10 pM, mais do que cerca de 50 pM, mais do que cerca de 100 pM, mais do que cerca de 500 pM ou mais do que cerca de 1000 pM quando se liga à miostatina. A afinidade de uma proteína de fusão folistatina-Fc recombinante pode ser medida, por exemplo, em um ensaio de ressonância de plásmom de superfície, por exemplo, um ensaio BIAcore.

[167] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão folistatina-Fc recombinante inibe a ligação e/ou atividade de activina A. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão folistatina-Fc recombinante possui uma K_D de mais do que cerca de 0,1 pM, mais do que cerca de 0,5 pM, mais do que cerca de 1 pM, mais do que cerca de 5 pM, mais do que cerca de 10 pM, mais do que cerca de 50 pM, mais do que cerca de 100 pM, mais do que cerca de 500 pM ou mais do que cerca de 1000 pM quando se liga à activina A. A afinidade de uma proteína de fusão folistatina-Fc recombinante pode ser medida, por exemplo, em um ensaio de ressonância de plásmom de superfície, por exemplo, um ensaio BIAcore.

[168] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão folistatina-Fc recombinante possui uma afinidade de ligação reduzida para heparina, comparada com a afinidade de ligação

de uma proteína folistatina do tipo selvagem-Fc para heparina. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão folistatina-Fc recombinante possui uma K_D de mais do que cerca de 0,01 nM, mais do que cerca de 0,05 nM, mais do que cerca de 0,1 nM, mais do que cerca de 0,5 nM, mais do que cerca de 1 nM, mais do que cerca de 5 nM, mais do que cerca de 10 nM, mais do que cerca de 50 nM, mais do que cerca de 100 nM, mais do que cerca de 150 nM, mais do que cerca de 200 nM, mais do que cerca de 250 nM ou mais do que cerca de 500 nM quando se liga à heparina.

[169] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão folistatina-Fc recombinante possui uma K_D de mais do que cerca de 1 nM, mais do que cerca de 5 nM, mais do que cerca de 10 nM, mais do que cerca de 50 nM, mais do que cerca de 100 nM, mais do que cerca de 500 nM, ou mais do que cerca de 1.000 nM quando se liga a um receptor Fc. Em algumas modalidades, o receptor Fc é um receptor $Fc\gamma$. Em algumas modalidades, o receptor $Fc\gamma$ é $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RIIA$, $Fc\gamma RIIB$, $Fc\gamma RIIIA$ ou $Fc\gamma RIIB$.

[170] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão folistatina-Fc recombinante possui ligação mínima ou não apreciável à BMP-9. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão folistatina-Fc recombinante possui ligação mínima ou não apreciável à BMP-10. Em algumas modalidades, a ligação mínima ou não apreciável é determinada na faixa de 190 pM a 25.000 pM.

[171] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão folistatina-Fc recombinante é caracterizada por uma IC_{50} abaixo de cerca de 20 nM, abaixo de cerca de 15 nM, abaixo de cerca de 10 nM, abaixo de cerca de 5 nM, abaixo de cerca

de 4 nM, abaixo de cerca de 3 nM, abaixo de cerca de 2 nM, abaixo de cerca de 1 nM, abaixo de cerca de 0,5 nM, abaixo de cerca de 0,25 nM, abaixo de cerca de 0,1 nM, abaixo de cerca de 0,05 nM ou abaixo de cerca de 0,01 nM em um ensaio de estimulação de miostatina.

[172] Em algumas modalidades, uma proteína de fusão folistatina-Fc recombinante é caracterizada por uma IC₅₀ abaixo de cerca de 20 nM, abaixo de cerca de 15 nM, abaixo de cerca de 10 nM, abaixo de cerca de 5 nM, abaixo de cerca de 4 nM, abaixo de cerca de 3 nM, abaixo de cerca de 2 nM, abaixo de cerca de 1 nM, abaixo de cerca de 0,5 nM, abaixo de cerca de 0,25 nM, abaixo de cerca de 0,1 nM, abaixo de cerca de 0,05 nM ou abaixo de cerca de 0,01 nM em um ensaio de estimulação de activina A.

[173] Em algumas modalidades, a administração de uma proteína de fusão folistatina-Fc recombinante *in vivo* resulta em um aumento na massa de um músculo em relação a um controle. Em algumas modalidades, a massa do músculo é, por exemplo, o peso do músculo. Em algumas modalidades, o músculo é um ou mais músculos esqueléticos, por exemplo, aqueles apresentados na **Tabela 1**. Em algumas modalidades, o músculo é selecionado do grupo que consiste em diafragma, tríceps, solear, tibial anterior, gastrocnêmio, extensor digital longo, reto abdominal, quadríceps, e combinações destes.

[174] Em algumas modalidades, a administração de folistatina-Fc resulta em hipertrofia muscular. Em algumas modalidades, a administração de folistatina-Fc resulta em melhora na função muscular.

Produção de folistatina recombinante ou proteínas de fusão folistatina-Fc recombinantes

[175] Uma proteína folistatina recombinante ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante adequada para a presente invenção pode ser produzida por qualquer meio disponível. Por exemplo, uma proteína folistatina recombinante ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante pode ser produzida recombinantemente por utilização de uma sistema de célula hospedeira modificado geneticamente para expressar uma ácido nucleico que codifica uma proteína folistatina recombinante ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante. Alternativamente ou adicionalmente, uma proteína folistatina recombinante ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante pode ser produzida por ativação de genes endógenos. Alternativamente ou adicionalmente, uma proteína folistatina recombinante ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante pode ser parcialmente ou totalmente preparada por síntese química.

[176] Quando as proteínas são produzidas recombinantemente, qualquer sistema de expressão pode ser usado. Apenas como alguns exemplos, sistemas de expressão conhecidos incluem, por exemplo, células de *E. coli*, de ovo, de baculovírus, de planta, de levedura ou de mamíferos, por exemplo, células CHO e/ou outras células de mamíferos descritas abaixo.

[177] Em algumas modalidades, proteínas folistatina recombinantes ou proteínas de fusão folistatina-Fc recombinantes adequadas para a presente invenção são produzidas em células de mamíferos. Exemplos não limitantes de células de mamíferos que podem ser usadas de acordo com a presente invenção incluem linhagem de mieloma de camundongo BALB/c (NS0/1, ECACC No: 85110503); retinoblastos humanos

(PER.C6, CruCell, Leiden, Holanda); linhagem de rim de macaco CV1 transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linhagem de rim embrionário humano (células HEK293 ou 293 subclonadas para crescimento em cultura em suspensão, Graham e cols., *J. Gen Virol.*, 36: 59, 1977); linhagem de célula de fibrossarcoma humano (por exemplo, HT1080); células de rim de filhote de hamster (BHK21, ATCC CCL 10); células de ovário de hamster chinês +/-DHFR (CHO, Urlaub e Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4.216, 1980); células de Sertoli de camundongo (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23: 243-251, 1980); células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células de rim de macaco verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de rim canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de rato-búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); células de tumor mamário de camundongo (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather e cols., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383: 44-68, 1982); células MRC 5; células FS4; e a linhagem de hepatoma humano (Hep G2).

[178] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece proteínas folistatina recombinantes ou proteínas de fusão folistatina-Fc recombinantes produzidas por células não humanas ou células humanas. Em algumas modalidades, a presente invenção fornece proteínas folistatina recombinantes ou proteínas de fusão folistatina-Fc recombinantes produzidas por células CHO ou células HT1080.

[179] Tipicamente, células que são modificadas geneticamente para expressar uma proteína folistatina recombinante ou uma proteína de fusão folistatina-Fc

recombinante pode compreender um transgene que codifica uma proteína folistatina recombinante ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante descrita nesse relatório descritivo. Deve ser observado que os ácidos nucleicos que codificam uma proteína folistatina recombinante ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante pode conter seqüências reguladoras, seqüências de controle de gene, promotores, seqüências não codificadoras e/ou outras seqüências apropriadas para expressão da proteína folistatina recombinante ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante. Tipicamente, a região codificadora está ligada operativamente a um ou mais desses componentes de ácido nucleico.

[180] A região codificadora de um transgene pode incluir uma ou mais mutações silenciosas para otimizar o uso de códons para um tipo de célula particular. Por exemplo, os códons de um transgene de folistatina podem ser otimizados para expressão em uma célula de vertebrado. Em algumas modalidades, os códons de um transgene de folistatina podem ser otimizados para expressão em uma célula de mamífero, por exemplo, uma célula CHO. Em algumas modalidades, os códons de um transgene de folistatina podem ser otimizados para expressão em uma célula humana.

Composição farmacêutica e administração

[181] A presente invenção ainda fornece composições farmacêuticas que compreendem ingredientes terapeuticamente ativos de acordo com a invenção (por exemplo, proteína folistatina recombinante, ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante), juntos com um ou mais carreadores ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis. Essas composições

farmacêuticas podem opcionalmente compreender uma ou mais substâncias terapeuticamente ativas adicionais.

[182] Embora as descrições de composições farmacêuticas fornecidas nesse relatório descritivo sejam dirigidas principalmente às composições farmacêuticas que são adequadas para administração ética a humanos, será subentendido por aqueles habilitados na técnica que essas composições são geralmente adequadas para administração a animais de todos os tipos. A modificação de composições farmacêuticas adequadas para administração a humanos a fim de torná-las composições adequadas para administração a vários animais é bem compreendida, e o farmacologista veterinário comum pode projetar e/ou realizar essa modificação com experimentação de rotina, se necessário.

[183] As formulações das composições farmacêuticas descritas nesse relatório descritivo podem ser preparadas por qualquer método conhecido ou que venha a ser desenvolvido na técnica de farmacologia. Em geral, esses métodos preparatórios incluem a etapa de colocação do ingrediente ativo em associação com um diluente ou outro excipiente ou carreador e/ou um ou mais outros ingredientes acessórios e, a seguir, se necessário e/ou desejável, moldar e/ou embalar o produto em uma unidade de dose única ou multidoses desejada.

[184] Uma composição farmacêutica de acordo com a invenção pode ser preparada, embalada e/ou vendida a granel, como uma dose unitária única, e/ou como várias doses unitárias únicas. Como usado nesse relatório descritivo, o termo “dose unitária” é uma quantidade distinta da composição farmacêutica que compreende uma quantidade predeterminada do

ingrediente ativo. A quantidade do ingrediente ativo é geralmente igual à dosagem do ingrediente ativo que seria administrada a um indivíduo e/ou uma fração conveniente dessa dosagem como, por exemplo, metade ou um terço dessa dosagem.

[185] Quantidades relativas do ingrediente ativo, o excipiente ou carreador farmacêuticamente aceitável, e/ou quaisquer ingredientes adicionais em uma composição farmacêutica de acordo com a invenção irão variar, dependendo da identidade, tamanho e/ou condição do indivíduo tratado e dependendo ainda da via pela qual a composição será administrada. Apenas como exemplo, a composição pode compreender entre 0,1% e 100% (p/p) de ingrediente ativo.

[186] As formulações farmacêuticas podem adicionalmente compreender um excipiente ou carreador farmacêuticamente aceitável que, como usado nesse relatório descritivo, inclui qualquer um e todos os solventes, meios de dispersão, diluentes, ou outros veículos líquidos, auxiliares de dispersão ou suspensão, agentes tensoativos, agentes isotônicos, agentes espessantes ou emulsificantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubrificantes e semelhantes, como adequado à forma de dosagem desejada particular. "Remington's The Science and Practice of Pharmacy", 21ª Edição, A.R. Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006; incorporado nesse relatório descritivo por referência) revela vários excipientes usados na formulação de composições farmacêuticas e técnicas conhecidas para a preparação destes. Exceto quando qualquer meio excipiente ou carreador convencional for incompatível com uma substância ou seus derivados, por exemplo, por produção de qualquer efeito biológico indesejável ou

interaja de uma forma deletéria com qualquer outro componente (ou componentes) da composição farmacêutica, seu uso é contemplado como estando dentro do escopo dessa invenção.

[187] Em algumas modalidades, um excipiente ou carreador farmacêuticamente aceitável é pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% puro. Em algumas modalidades, um excipiente ou carreador é aprovado para uso em humanos e para uso veterinário. Em algumas modalidades, um excipiente ou carreador é aprovado pelo FDA ("United States Food and Drug Administration"). Em algumas modalidades, um excipiente ou carreador é de grau farmacêutico. Em algumas modalidades, um excipiente ou carreador atende aos padrões da "United States Pharmacopoeia" (USP), da "European Pharmacopoeia" (EP), da "British Pharmacopoeia" e/ou da "International Pharmacopoeia".

[188] Excipientes ou carreadores farmacêuticamente aceitáveis usados na fabricação de composições farmacêuticas incluem, sem limitação, diluentes inertes, agentes dispersantes e/ou de granulação, agentes tensoativos e/ou emulsificantes, agentes desintegrantes, agentes de aglutinação, conservantes, agentes de tamponamento, agentes lubrificantes e/ou óleos. Esses excipientes ou carreadores podem opcionalmente ser incluídos em formulações farmacêuticas. Excipientes ou carreadores como, por exemplo, manteiga de cacau e ceras para supositório, agentes corantes, agentes de revestimento, agentes adoçantes, flavorizantes e/ou perfumantes podem estar presentes na composição, de acordo com o julgamento do formulador.

[189] Excipientes ou carreadores farmacêuticamente

aceitáveis adequados incluem, sem limitação, água, soluções de sal (por exemplo, NaCl), solução salina, solução salina tamponada, álcoois, glicerol, etanol, goma arábica, óleos vegetais, álcoois benzílicos, polietileno glicóis, gelatina, carboidratos como, por exemplo, lactose, amilose ou amido, açúcares como, por exemplo, manitol, sacarose, ou outros, dextrose, estearato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, óleo de perfume, ésteres de ácido graxo, hidroximetilcelulose, polivinil pirrolidona etc., bem como combinações destes. As preparações farmacêuticas podem, se desejado, ser misturadas com agentes auxiliares (por exemplo, lubrificantes, conservantes, estabilizantes, agentes umidificantes, emulsificantes, sais para influenciar a pressão osmótica, tampões, substâncias corantes, flavorizantes e/ou aromáticas e semelhantes) que não reajam de forma deletéria com os compostos ativos ou interfiram com sua atividade. Em uma modalidade preferida, é usado um carreador hidrossolúvel adequado para administração intravenosa.

[190] Uma composição farmacêutica ou medicamento adequado, se desejado, também pode conter quantidades menores de agentes umidificantes ou emulsificantes, ou agentes de tamponamento do pH. Uma composição pode ser uma solução líquida, suspensão, emulsão, comprimido, pílula, cápsula, formulação de liberação sustentada, ou pó. Uma composição também pode ser formulada como um supositório, com aglutinantes e carreadores tradicionais como, por exemplo, triglicerídeos. Formulações orais podem incluir carreadores padronizados como, por exemplo, graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, estearato de

magnésio, polivinil pirrolidona, sacarina sódica, celulose, carbonato de magnésio etc.

[191] Uma composição farmacêutica ou medicamento pode ser formulado de acordo com os procedimentos de rotina como uma composição farmacêutica adaptada para administração a seres humanos. Por exemplo, em algumas modalidades, uma composição para administração intravenosa tipicamente é uma solução em tampão aquoso isotônico estéril. Quando necessário, a composição também pode incluir um agente solubilizante e um anestésico local para diminuir a dor no local da injeção. Geralmente, os ingredientes são fornecidos separadamente ou misturados juntos em forma de dosagem unitária, por exemplo, como um pó seco liofilizado ou concentrado livre de água em um recipiente lacrado hermeticamente como, por exemplo, uma ampola ou sachê que indica a quantidade de agente ativo. Quando a composição deve ser administrada por infusão, ela pode ser dispensada com uma garrafa de infusão que contém água estéril de grau farmacêutico, solução salina ou dextrose/água. Quando a composição é administrada por injeção, uma ampola de água estéril para injeção ou solução salina pode ser fornecida de modo que o ingredientes possa ser misturado antes da administração.

[192] Uma proteína folistatina recombinante ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante descrita nesse relatório descritivo pode ser formulada como formas neutras ou de sal. Sais farmaceuticamente aceitáveis incluem aqueles formados com grupos amino livres como, por exemplo, aqueles derivados de ácidos clorídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico etc., e aqueles formados com grupos carboxil livres

como, por exemplo, aqueles derivados de sódio, potássio, amônio, cálcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína etc.

[193] Considerações gerais na formulação e/ou fabricação de agentes farmacêuticos podem ser encontradas, por exemplo, em "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" 21ª Edição, Lippincott Williams & Wilkins, 2005 (incorporado nesse relatório descritivo por referência).

Vias de administração

[194] Uma proteína folistatina recombinante ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante descrita nesse relatório descritivo (ou uma composição ou medicamento que contém uma proteína folistatina recombinante descrita nesse relatório descritivo) é administrada por qualquer via apropriada. Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante, proteína de fusão folistatina-Fc recombinante ou uma composição farmacêutica que contém a mesma é administrada sistemicamente. A administração sistêmica pode ser administração intravenosa, intradérmica, inalação, transdérmica (tópica), intra-ocular, intramuscular, subcutânea, intramuscular, oral e/ou transmucosa. Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante, proteína de fusão folistatina-Fc recombinante ou uma composição farmacêutica que contém a mesma é administrada por via subcutânea. Como usado nesse relatório descritivo, o termo "tecido subcutâneo" é definido como uma camada de tecido conjuntivo frouxo, irregular, imediatamente abaixo da pele. Por exemplo, a administração subcutânea pode ser realizada por injeção de uma composição em áreas que incluem, sem limitação, a região da coxa, região abdominal, região glútea

ou região escapular. Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante, proteína de fusão folistatina-Fc recombinante ou uma composição farmacêutica que contém a mesma é administrada por via intravenosa. Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante, proteína de fusão folistatina-Fc recombinante ou uma composição farmacêutica que contém a mesma é administrada oralmente. Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante, proteína de fusão folistatina-Fc recombinante ou uma composição farmacêutica que contém a mesma é administrada por via intramuscular. Por exemplo, a administração intramuscular pode ser realizada por injeção de uma composição into áreas incluindo, sem limitação, um músculo da região da coxa, região abdominal, região glútea, região escapular, ou a qualquer músculo revelado na **Tabela 1**. Mais de uma via pode ser usada concomitantemente, se desejado.

[195] Em algumas modalidades, a administração resulta apenas em um efeito localizado em um indivíduo, enquanto, em outras modalidades, a administração resulta em efeito ao longo de várias porções de um indivíduo, por exemplo, efeitos sistêmicos. Tipicamente, a administração resulta em liberação de uma proteína folistatina recombinante ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante a um ou mais tecidos-alvo. Em algumas modalidades, a proteína folistatina recombinante ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante é liberada a um ou mais tecidos-alvo incluindo, sem limitação, coração, cérebro, medula espinhal, músculo estriado (por exemplo, músculo esquelético), músculo liso, rim, fígado, pulmão e/ou baço. Em algumas modalidades, a proteína folistatina recombinante ou proteína de fusão

folistatina-Fc recombinante é liberada ao coração. Em algumas modalidades, a proteína folistatina recombinante ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante é liberada ao músculo estriado, em particular, músculo esquelético. Em algumas modalidades, a proteína folistatina recombinante ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante é liberada ao tríceps, tibial anterior, solear, gastrocnêmio, bíceps, trapézio, deltóide, quadríceps e/ou diafragma.

Formas de dosagem e regime de dosagem

[196] Em algumas modalidades, uma composição é administrada em uma quantidade terapeuticamente eficaz e/ou de acordo com um regime de dosagem que está correlacionado com um desfecho desejado particular (por exemplo, com tratamento ou redução do risco para uma distrofia muscular, por exemplo, distrofia muscular de Duchenne).

[197] Doses ou quantidades particulares a serem administradas de acordo com a presente invenção podem variar, por exemplo, dependendo da natureza e/ou extensão do desfecho desejado, em particular da via e/ou momento da administração, e/ou de uma ou mais características (por exemplo, peso, idade, história pessoal, característica genética, parâmetro de estilo de vida, severidade do defeito cardíaco e/ou nível de risco de defeito cardíaco etc., ou combinações destes). Essas doses ou quantidades podem ser determinadas por aqueles habilitados. Em algumas modalidades, uma dose ou quantidade apropriada é determinada de acordo com técnicas clínicas padronizadas. Alternativamente ou adicionalmente, em algumas modalidades, uma dose ou quantidade apropriada é determinada por meio do uso de um ou mais ensaios *in vitro* ou *in vivo* para ajudar a identificar faixas de dosagem ou quantidades

desejáveis ou ótimas a serem administradas.

[198] Em várias modalidades, uma proteína folistatina recombinante é administrada em uma quantidade terapeuticamente eficaz. Geralmente, uma quantidade terapeuticamente eficaz é suficiente para obter um benefício significativo ao indivíduo (por exemplo, tratamento, modulação, cura, prevenção e/ou melhora da doença ou condição subjacente). Em algumas modalidades particulares, doses ou quantidades apropriadas a serem administradas podem ser extrapoladas de curvas de dose-resposta derivadas de sistemas de teste *in vitro* ou em modelo animal.

[199] Em algumas modalidades, uma quantidade terapeuticamente eficaz de folistatina-Fc para tratamento de distrofia muscular é administrada por via intravenosa. Em algumas modalidades, a quantidade terapeuticamente eficaz administrada por via intravenosa é entre cerca de 0,5 mg/kg até cerca de 75 mg/kg de peso corporal do animal ou humano; no entanto doses acima ou abaixo dessa faixa exemplar estão dentro do escopo dessa revelação. Em algumas modalidades, a dose terapeuticamente eficaz é entre cerca de 0,5 mg/kg e 75 mg/kg de peso corporal do animal ou humano (ou seja, a dose terapeuticamente eficaz é cerca de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 60, 65, 70 ou cerca de 75 mg/kg). Em algumas modalidades, a dose terapeuticamente eficaz que é administrada por via intravenosa é cerca de 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg e 25 mg/kg.

[200] Em algumas modalidades, a quantidade

terapeuticamente eficaz é administrada por via intravenosa entre cerca de 5,0 e 18,0 mg/kg (ou seja, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 15,5, 16,0, 16,5, 17,0, 17,5 e 18,0 mg/kg, e quaisquer valores entre esses). Em algumas modalidades, a quantidade eficaz é pelo menos cerca de 8 mg/kg. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz é pelo menos cerca de 10 mg/kg. Em algumas modalidades, a administração intravenosa ocorre uma vez por mês. Em algumas modalidades, a administração intravenosa ocorre duas vezes por mês.

[201] Em algumas modalidades, uma quantidade terapêuticamente eficaz de folistatina-Fc para tratamento de distrofia muscular é administrada por via subcutânea. Em algumas modalidades, a quantidade terapêuticamente eficaz administrada por via subcutânea é entre cerca de 20 mg/kg e 110 mg/kg de peso corporal do animal ou humano (ou seja, a dose terapêuticamente eficaz é cerca de 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105 ou cerca de 110 mg/kg). Em algumas modalidades, a quantidade terapêuticamente eficaz administrada por via subcutânea é entre cerca de 1,0 mg/kg e 50 mg/kg de peso corporal do animal ou humano (ou seja, a dose terapêuticamente eficaz é cerca de 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 11,0, 12,0, 13,0, 14,0, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, e cerca de 50 mg/kg). Em algumas modalidades, a quantidade terapêuticamente eficaz administrada por via subcutânea é cerca de 3 mg/kg, 5 mg/kg,

10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg e 30 mg/kg).

[202] Em algumas modalidades, uma quantidade terapeuticamente eficaz de folistatina-Fc para tratamento de distrofia muscular é administrada por via subcutânea. Em algumas modalidades, a quantidade terapeuticamente eficaz é administrada por via subcutânea entre cerca de 1,5 e 7,0 mg/kg (ou seja, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 e 7,0 mg/kg, e quaisquer valores entre esses). Em algumas modalidades, a quantidade terapeuticamente eficaz é pelo menos cerca de 2,0 mg/kg. Em algumas modalidades, a quantidade terapeuticamente eficaz é pelo menos cerca de 3,0 mg/kg. Em algumas modalidades, a administração subcutânea ocorre uma vez por semana. Em algumas modalidades, a administração subcutânea ocorre duas vezes por semana. Em algumas modalidades, a administração subcutânea ocorre uma vez a cada duas semanas.

[203] Em algumas modalidades, a proteína folistatina-Fc possui proporcionalidade de dose. Em algumas modalidades, a proteína folistatina-Fc possui linearidade de dose. Em algumas modalidades, a proporcionalidade de dose e/ou linearidade de dose ocorre quando aumentos na dose administrada são acompanhados por aumentos proporcionais na exposição e desfecho. Em algumas modalidades, quanto maior a dose administrada, maior o efeito sobre o desfecho benéfico. Em algumas modalidades, o peso corporal do indivíduo tratado aumenta de uma forma dose-dependente.

[204] Em algumas modalidades, a administração de folistatina-Fc resulta em hipertrofia muscular. Em algumas modalidades, a administração de folistatina-Fc resulta em melhora na função muscular. Em algumas modalidades,

patologia do quadríceps e diafragma são melhoradas mediante tratamento com folistatina modificada geneticamente. Em algumas modalidades, o tratamento com folistatina-Fc de indivíduos que possuem distrofia muscular resulta em melhora maior na função muscular do que o tratamento com um antagonista de miostatina. Em algumas modalidades, o tratamento com folistatina-Fc de indivíduos que possuem distrofia muscular resulta em melhora maior na patologia muscular do que o tratamento com um antagonista de miostatina.

[205] Em algumas modalidades, uma composição fornecida é fornecida como uma formulação farmacêutica. Em algumas modalidades, uma formulação farmacêutica é ou compreende uma quantidade de dose unitária para administração de acordo com um regime de dosagem correlacionado com a obtenção da incidência ou risco reduzido de uma distrofia muscular, por exemplo, distrofia muscular de Duchenne.

[206] Em algumas modalidades, uma formulação que compreende uma proteína folistatina recombinante ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante descrita nesse relatório descritivo é administrada como uma dose única. Em algumas modalidades, uma formulação que compreende uma proteína folistatina recombinante ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante descrita nesse relatório descritivo é administrada em intervalos regulares. A administração em um "intervalo", como usado nesse relatório descritivo, indica que a quantidade terapeuticamente eficaz é administrada periodicamente (como distinta de uma dose por uma vez). O intervalo pode ser determinado por técnicas clínicas padronizadas. Em algumas modalidades, uma

formulação que compreende uma proteína folistatina recombinante ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante descrita nesse relatório descritivo é administrada bimestralmente, mensalmente, duas vezes ao mês, a cada três semanas, a cada duas semanas, semanalmente, duas vezes por semana, três vezes por semana, diariamente, duas vezes ao dia, ou a cada seis horas. O intervalo de administração para um único indivíduo não precisa ser em um intervalo fixo, mas pode ser variado ao longo do tempo, dependendo das necessidades do indivíduo.

[207] Como usado nesse relatório descritivo, o termo “bimestralmente” significa administração uma vez a cada dois meses (ou seja, uma vez a cada dois meses); o termo “mensalmente” significa administração uma vez por mês; o termo “a cada três semanas” significa administração uma vez a cada três semanas (ou seja, uma vez a cada três semanas); o termo “a cada duas semanas” significa administração uma vez a cada duas semanas (ou seja, uma vez a cada duas semanas); o termo “semanalmente” significa administração uma vez por semana; e o termo “diariamente” significa administração uma vez a cada dia.

[208] Em algumas modalidades, uma formulação que compreende uma proteína folistatina recombinante ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante descrita nesse relatório descritivo é administrada em intervalos regulares indefinidamente. Em algumas modalidades, uma formulação que compreende uma proteína folistatina recombinante ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante descrita nesse relatório descritivo é administrada em intervalos regulares por um período definido.

[209] Como descrito nesse relatório descritivo, o termo “quantidade terapeuticamente eficaz” é largamente determinado com base na quantidade total do agente terapêutico contido nas composições farmacêuticas da presente invenção. Uma quantidade terapeuticamente eficaz é comumente administrada em um regime de dosagem que pode compreender múltiplas doses unitárias. Para qualquer composição particular, uma quantidade terapeuticamente eficaz (e/ou uma dose unitária apropriada dentro de um regime de dosagem eficaz) pode variar, por exemplo, dependendo da via de administração ou da combinação com outros agentes farmacêuticos.

[210] Em algumas modalidades, a administração de uma proteína folistatina recombinante ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante reduz a intensidade, severidade ou frequência, ou retarda o surgimento de pelo menos um sinal ou sintoma de DMD. Em algumas modalidades, a administração de uma proteína folistatina recombinante ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante reduz a intensidade, severidade ou frequência, ou retarda o surgimento de pelo menos um sinal ou sintoma de DMD selecionado do grupo que consiste em perda muscular, deformação esquelética, cardiomiopatia, isquemia muscular, déficit cognitivo e alteração da função respiratória.

[211] Em algumas modalidades, a administração de uma proteína folistatina recombinante ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante melhora o desfecho clínico, como medido por um teste de caminhada de 6 minutos, teste quantitativo de força muscular, teste de desempenho motor cronometrado. Escalas da função dos membros de Brooke e

Vignos, teste da função pulmonar (capacidade vital forçada, volume expiratório forçado em 1 segundo, taxa de fluxo expiratório de pico, pressões inspiratórias e expiratórias máximas), qualidade de vida relacionada à saúde, flexores do joelho e cotovelo, extensores do cotovelo, abdução do ombro, força de preensão, tempo até se elevar da posição supina, Avaliação Ambulatorial "North Start", caminhada/corrida cronometrada de 10 metros, escala de Egen-Klassifikation, pontuação de Gowers, habilidade motora de Hammersmith, miometria manual, amplitude de movimento, goniometria, hipercapnia, Escalas de Nayley do Desenvolvimento Infantil e da Criança e/ou uma escala de carga do cuidador.

Terapia combinada

[212] Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante é administrada em combinação com um ou mais agentes terapêuticos conhecidos (por exemplo, corticosteróides) atualmente usados para o tratamento de uma distrofia muscular. Em algumas modalidades, os agentes terapêuticos conhecidos são administrados de acordo com seu regime de dosagem e/ou posologia padronizada ou aprovada. Em algumas modalidades, os agentes terapêuticos conhecidos são administrados de acordo com um regime que é alterado, comparado com seu regime de dosagem e/ou posologia padronizada ou aprovada. Em algumas modalidades, esse regime alterado difere do regime de dosagem padronizado ou aprovado em que uma ou mais doses unitárias são alteradas (por exemplo, reduzidas ou aumentadas) em quantidade, e/ou em que a dosagem é alterada em frequência (por exemplo, em que um ou mais intervalos entre doses unitárias são expandidos, resultando em frequência menor, ou são reduzidos, resultando

em frequência maior).

[213] Em algumas modalidades, uma proteína folistatina recombinante ou proteína de fusão folistatina-Fc recombinante é administrada em combinação com um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Em uma modalidade o agente terapêutico adicional é um corticosteróide, por exemplo, prednisona. Em outra modalidade, o agente terapêutico adicional é um glicocorticóide, por exemplo, deflazacort. Em outra modalidade, o agente terapêutico adicional é um anticorpo anti-Flt-1 ou fragmento de ligação ao antígeno deste. Em outra modalidade, o agente terapêutico adicional é um produto terapêutico de modulação do RNA. O produto terapêutico de modulação do RNA pode ser um produto terapêutico de uso alternativo de éxon ou terapia gênica. O produto terapêutico de modulação do RNA pode ser, por exemplo, Drispersen, CAT-1004, FG3019, PR0044, PR0045, Eteplirsen (AVI-4658), SRP-4053, SRP-4045, SRP-4050, SRP-4044, SRP-4052, SRP-4055 ou SRP-4008. Em algumas modalidades, o agente terapêutico adicional é usado atualmente para tratamento de uma distrofia muscular. Em outras modalidades, o agente terapêutico adicional também pode ser usado para tratar outras doenças ou distúrbios. Em algumas modalidades, os agentes terapêuticos conhecidos são administrados de acordo com seu regime de dosagem e/ou posologia padronizada ou aprovada. Em algumas modalidades, os agentes terapêuticos conhecidos são administrados de acordo com um regime que é alterado, comparado com seu regime de dosagem e/ou posologia padronizada ou aprovada. Em algumas modalidades, esse regime alterado difere do regime de dosagem padronizado ou aprovado em que uma ou mais doses unitárias

são alteradas (por exemplo, reduzidas ou aumentadas) em quantidade, e/ou em que a dosagem é alterada em frequência (por exemplo, em que um ou mais intervalos entre doses unitárias são expandidos, resultando em frequência menor, ou são reduzidos, resultando em frequência maior).

EXEMPLOS

Exemplo 1. Proteínas de fusão folistatina-Fc visam miostatina

[214] Esse exemplo ilustra a ligação da proteína de fusão folistatina-Fc aos ligantes-alvo e não-alvo. Sem se prender à teoria, está contemplado que a ativação de via de Smad2/3 por miostatina e activina A leva à inibição da expressão de proteína miogênica e, como resultado, mioblastos não se diferenciam em músculo. Portanto, miostatina e activina A são consideradas alvos viáveis para estimulação de regeneração muscular. No entanto, muitos antagonistas de miostatina e activina A como, por exemplo, receptor solúvel de activina tipo IIB (sActRIIB) também se ligam às proteínas morfogênicas ósseas (BMPs) em função de certas similaridades estruturais. BMPs, especialmente, BMP-9 e BMP-10, são consideradas sinais morfogênicos cruciais, orquestrando a arquitetura de tecidos por todo o corpo. A inibição dessas BMPs pode levar a condições patológicas indesejáveis. A folistatina também se liga aos proteoglicanos de sulfato de heparano da superfície celular por meio de uma sequência de ligação à heparina (HBS) básica no primeiro de três domínios FS. Sem se prender à teoria, a inativação, redução ou modulação de ligação à heparina, por exemplo, por mutação ou deleção da HBS pode aumentar a exposição e/ou meia-vida *in vivo* de folistatina e/ou proteínas de fusão de folistatina.

Como descrito em detalhe abaixo, os dados experimentais descritos nesse exemplo confirmam que proteínas de fusão folistatina-Fc visam especificamente miostatina com alta afinidade e não se ligam às BMPs não-alvo ou heparina com afinidade significativa.

[215] Especificamente, a afinidade de ligação (K_D) e a cinética de proteínas de fusão folistatina-Fc para miostatina, activina A, heparina, BMP-9 e BMP-10 foram avaliadas usando ensaios BIAcore® e métodos padronizados, como descrito abaixo.

[216] Para determinar a afinidade e a cinética de ligação para miostatina, anti-Fc humano (Catálogo GE #BR-1008-39) foi imobilizado sobre chip com duas células de fluxo CM5 por 420 segundos em uma taxa de fluxo de 10 µl/min. O tampão de corrida foi HBS-EP+. Todas as amostras e controles foram diluídos até 10 µg/ml usando o tampão de corrida. Miostatina (0,1 mg/ml em 4 mM de HCl) (R&D Systems, Número de catálogo 788-G8-010/CF) foi diluída até 0,3125, 0,625, 1,25, 2,5 e 5 nM com base no peso molecular de 25 kDa. O ensaio foi realizado com um ajuste de captura de 8 segundos em uma taxa de fluxo de 50 µl/min, associação por 300 segundos em uma taxa de fluxo de 50 µl/min e dissociação por 1.200 segundos em uma taxa de fluxo de 50 µl/min, seguido por regeneração usando 3 M de $MgCl_2$ por 30 segundos em uma taxa de fluxo de 60 µl/min.

[217] Para determinar a afinidade e a cinética de ligação para Activina A, anti-Fc humano (Catálogo GE #BR-1008-39) foi imobilizado sobre chip com duas células de fluxo CM5 por 420 segundos em uma taxa de fluxo de 10 µl/min. O tampão de corrida foi HBS-EP+. Todas as amostras e controles foram

diluídos até 10 µg/ml usando o tampão de corrida. Activina A (0,1 mg/ml em 4 mM de HCl) (R&D Systems, Número de catálogo 338-AC-050 CF) foi diluída até 0,156, 0,3125, 0,625, 1,25, e 2,5 nM usando o peso molecular de 26 kDa.

[218] Para determinar a afinidade e a cinética de ligação para heparina, heparina biotinilada foi preparada no dia do ensaio a 1 mg/ml, e depois diluída até 100 µg/ml em HBS+N. Células de fluxo do chip de estreptavidina foram preparadas por imobilização por 5 minutos a 5 µl/min a 100 µg/ml usando tampão HBS+N. As amostras foram diluídas em HBS+EP até uma concentração de 0,31 nM a 25 nM. O ensaio foi realizado usando um tempo de associação de 300 segundos em uma taxa de fluxo de 30 µl/min e um tempo de dissociação de 300 segundos, seguido por regeneração com 4 M de NaCl por 30 segundos, imediatamente seguido por segunda regeneração com 4 M de NaCl por 30 segundos.

[219] Para determinar a afinidade e a cinética de ligação para BMP-9 e/ou BMP-10, anti-humano Fc foi acoplado a FC3 e FC4 a aproximadamente 6.000 a 9.000 RU em um chip CM5. A proteína ActRIIB-Fc foi usada como um controle positivo (R&D Systems, Número de catálogo 339-RBB-100) para ligação à BMP-9 e BMP-10. Para análise de ligação à BMP-9, todas as amostras foram diluídas até 2,5 µg/ml e o tampão de corrida foi HBS+EP. Para análise da ligação à BMP-10, todas as amostras foram diluídas até 5 µg/ml e o tampão de corrida foi HBS+EP + 0,5 mg/ml de BSA. As condições de análise incluem um tempo de contato de 180 segundos, um tempo de dissociação de 300 segundos e uma taxa de fluxo de 30 µl/minuto. BMP-9 (R&D Systems, Número de catálogo 3209-BP-010CF) e BMP-10 (R&D Systems, Número de catálogo 2926-BP-

025CF) foram diluídas em diluições seriais de três vezes de 25 nM até 0,19 nM. Resultados exemplares são mostrados na **Tabela 8A** e **Tabela 8B**.

Tabela 8A. Dados de afinidade e cinética de ligação exemplares para proteínas de fusão folistatina-Fc selecionadas.

<i>Proteína de fusão folistatina-Fc</i>	<i>Ligação à Miostatina KD (pM) Faixa testada 5-0,31 nM</i>	<i>Ligação à Activina A KD (pM) Faixa testada 2,5-0,15 nM</i>	<i>Ligação à heparina KD (nM) Faixa testada 25-0,31 nM</i>	<i>BMP-9 Faixa testada 25-0,190 nM</i>	<i>BMP-10 Faixa testada 25-0,190 nM</i>
FS315WT-hFc	6-10	1-2	0,3	Nenhuma ligação na faixa testada	Nenhuma ligação na faixa testada
FS315WT-hFcLALA	20,2	Não testada	0,16	Não testada	Não testada
ActRIIB-Fc	Não testada	Não testada	Não testada	0,44	0,9
FS315K(81,82)A- hFcLALA	11,9	Não testada	1,50	Nenhuma ligação na faixa testada	Nenhuma ligação na faixa testada
FS315K(81,82)A-GGG-	10,7	Não testada	1,30	Não testada	Não testada

hFcLALA					
FS315K(76,81,82)A-hFcLALA	11,3	Não testada	9,40	Nenhuma ligação na faixa testada	Nenhuma ligação na faixa testada
FS303K(76,81,82)A-hFcLALA	12,7	Não testada	0,57	Nenhuma ligação na faixa testada	Nenhuma ligação na faixa testada
FS315K(76,81,82)A-GGG-hFcLALA	10,9	Não testada	3,70	Não testada	Não testada
FS303K(76,81,82)A-GGG-hFcLALA	11,6	Não testada	0,51	Não testada	Não testada
FS315K82T-hFcLALA	15,0	Não testada	1,40	Nenhuma ligação na faixa testada	Nenhuma ligação na faixa testada
FS303K82T-hFcLALA	9,7	Não testada	0,33	Nenhuma ligação na faixa testada	Nenhuma ligação na faixa testada
FS315K82T-GGG-	13,0	Não testada	1,30	Não testada	Não testada

hFcLALA					
FS303K82T-GGG-hFcLALA	9,6	Não testada	0,18	Não testada	Não testada
FS315K82E-hFcLALA	11,90	Não testada	1,50	Não testada	Não testada
FS315K(75,76)E-hFcLALA	11,70	Não testada	1,10	Não testada	Não testada
FS315K(76,81)E-hFcLALA	11	Não testada	4	Não testada	Não testada
FS315K(76,82)E-hFcLALA	10,50	Não testada	4	Não testada	Nenhuma ligação na faixa testada
FS315K(81,82)E-hFcLALA	9,87	Não testada	11	Não testada	Nenhuma ligação na faixa testada
FS315K(81,82)D-hFcLALA	7,09	0,47	20,6	Nenhuma ligação na faixa testada	Nenhuma ligação na faixa testada
FS315K(76,81,82)E-	2-6	1-2	>25	Nenhuma ligação	Nenhuma ligação

hFcLALA				na faixa testada	na faixa testada
FS315K(76,81,82)D- hFcLALA	5,92	0,76	>25	Nenhuma ligação na faixa testada	Nenhuma ligação na faixa testada
FS315K(76,81,82)E/V 88E-hFcLALA	4,5	Não testada	>25	Não testada	Não testada
FS315(del75-86)- hFcLALA	57,10	Não testada	>25	Não testada	Nenhuma ligação na faixa testada
FS315R86N/V88T- hFcLALA	12,70	Não testada	1,30-1,7	Não testada	Nenhuma ligação na faixa testada
FS315K75N/C77T/K82T - hFcLALA	40,30	Não testada	1 4	Não testada	Nenhuma ligação na faixa testada
FS315R78N/N80T- hFcLALA	13,00	Não testada	0,85	Não testada	Não testada

FS315P85T-hFcLALA	12,40	Não testada	0,37	Não testada	Não testada
FS315C66A/K75N/C77T -hFcLALA	24,4	Não testada	3fold menos do que FS315wt-hFc	Nenhuma ligação na faixa testada	Nenhuma ligação na faixa testada
FS315C66S/K75N/C77T -hFcLALA	6,4	Não testada	3fold menos do que FS315wt-hFc	Nenhuma ligação na faixa testada	Nenhuma ligação na faixa testada
FS315K(76,81,82)E- mFc	14,8	Não testada	>25	Não testada	Não testada
MOLÉCULAS MONOVALENTES:					
monoFS315wt-hFcLALA	2,89	Não testada	29,2	Não testada	Não testada
monoFS315 Δ HBS- hFcLALA	3,3	Não testada	>25	Não testada	Não testada
monoFS315K(76,81,82)E-hFcLALA	<4	Não testada	>25	Nenhuma ligação na faixa testada	Nenhuma ligação na faixa testada

Tabela 8B. Dados de afinidade e cinética de ligação exemplares para proteínas de fusão folistatina-Fc selecionadas.

Variante FS315-hFc	Ligação à heparina K_D (nM)	Ligação à Miostatina K_D (pM)	Ligação ao FCRN K_D (nM)	cIEF (pI)
do tipo selvagem	0,2	20,2	31,4	5,07-5,89
Δ HBS	ND*	17,4	48	4,82-5,72
del75-86	ND*	57,1	38,8	4,83-5,26
K84E	0,9	9,9	34,9	5,07-6,01
K82E	1,5	11,9	10,5	5,48-6,09
K(76,84)E	0,8	9	33	4,87-5,95
R78E/K84E	0,8	7,2	45,5	5,06-5,96
K(75,76)E	1,1	11,7	34,2	5,05-5,26
K(82,84)E	1,1	9	45,1	4,86-5,95
R78E/K82E	1,3	3,9	53,3	4,96-5,96
K(81,82)A	1,5	11,9	38,5	5,31-5,96
K(76,82)E	3,9	10,5	38,2	4,89-5,26
K(81,82)E	10,7	9,9	40,8	4,83-5,25
K(81,82)D	20,6	7,1	24,7	4,88-5,59
K(76,81,82)A	9,4	11,3	41,6	5,24-5,93
K(76,82,84)E	13,8	4,7	50,8	4,85-5,80
K(76,81,82)E	ND*	4,2	44	4,87-5,80
K(76,81,82)D	ND*	5,9	59,9	4,82-5,67

ND*: Nenhuma ligação detectável à heparina nas faixas de concentração de FS testadas 0,019-25 nM

[220] Como mostrado na **Tabela 8**, proteínas de fusão de folistatina se ligam à miostatina com alta afinidade, mas

não se ligam à BMP-9 e/ou BMP-10. Em estudos que testam a ligação da proteína de fusão folistatina-Fc à BMP-10, nenhuma constante cinética foi determinada na faixa testada (25,000 a 190 pM). Isso representa uma afinidade de ligação aproximadamente 430 vezes maior do que a K_D de ligação à miostatina mais fraca. Em estudos que testam a ligação da proteína de fusão folistatina-Fc à BMP-9, nenhuma constante cinética foi determinada na faixa testada (25.000 a 190 pM). Isso representa uma afinidade de ligação aproximadamente 1.400 vezes maior do que a K_D de ligação à miostatina mais fraca.

Exemplo 2. A carga dos motivos básicos (BBXB) dentro da HBS de FS afeta a afinidade de ligação à heparina

[221] A depuração hepática rápida mediada por heparina de FS nativa, até mesmo quando fundida ao fragmento Fc de anticorpo, limita seu potencial terapêutico. Para superar essa limitação, a alça de ligação à heparina de FS foi visada para modulação da atividade de ligação à heparina por mutagênese sítio-dirigida. Mutações de resíduos de lisina dentro dos motivos de ligação à heparina da isoforma FS288 ((K(75,76)A, K(81,82)A e K(76,81,82)A)) resultaram em ligação à heparina diminuída em um ensaio de competição. Foi formulada a hipótese de que a substituição de resíduos com carga positiva dentro de dois motivos BBXB com aminoácidos que possuem uma carga negativa resultará em uma diminuição da ligação à heparina ainda maior do que a observada com substituições de alanina. Para testar essa hipótese, foram geradas variantes K(81,82)E, K(81,82)D, K(76,81,82)E e K(76,81,82)D para comparar com K(81,81)A & K(76,81,82)A. Em algumas modalidades, as variantes e o tipo selvagem

apresentados nesse relatório descritivo são proteínas recombinantes da isoforma FS315 fundidas à porção Fc de IgG1 humana diretamente. A interação de ligação entre variantes de FS e heparina foi medida usando um método de ressonância de plásmon de superfície (SPR). As afinidades de ligação foram medidas e relatadas pela constante de dissociação em equilíbrio (K_D) (**Tabelas 8A e 8B**). Após substituição para resíduos mais negativos, tanto K(81,82)E quanto K(81,82)D tiveram uma redução de 7-13 vezes na ligação à heparina, comparadas com K(81,82)A, indicando a atividade de ligação à heparina ainda mais prejudicada. Consistentemente, as variantes triplas K(76,81,82)E e K(76,81,82)D também tiveram afinidades altamente reduzidas, comparadas com K(76,81,82)A. Moléculas que contêm variantes triplas tanto E quanto D não tiveram ligação à heparina detectável em nossa faixa de testagem. No entanto, a K_D da ligação de SPR à heparina foi de 9,4 nM para K(76,81,82)A, que possui afinidade comparável ou mais forte do que as variantes duplas K(81,82)E e K(81,82)D. esses dados indicam que a substituição com menos aminoácidos carregados negativamente pode reduzir a ligação à heparina similar a múltiplos sítios substituídos com aminoácidos neutros. Tomados em conjunto, esses dados mostraram que a alteração da carga dos motivos básicos BBXB dentro da HBS de FS afeta significativamente a afinidade de ligação à heparina.

[222] Os dados também demonstraram que as variantes triplas K(76,81,82)E e K(76,81,82)D, que alteraram dois motivos BBXB mostraram maior redução na afinidades, comparadas com as variantes duplas K(81,82)E e K(81,82)D, que só alteraram um dos dois motivos BBXB, indicando que

ambos os motivos contribuem para a ligação à heparina (**Tabela 8B**). Para compreender ainda mais o papel do(s) resíduo(s) básico(s) crucial dentro dos dois motivos BBXB sobre a afinidade de ligação à heparina, foi gerada uma série variantes nas quais um, dois ou três resíduos básicos foram substituídos com ácido glutâmico carregado negativamente E. Duas variantes de HBS com alterações maiores também foram geradas: 1) uma variante de substituição de HBS Δ HBS na qual a HBS (resíduos 75 - 86) foi substituída pelo segmento correspondente de FSD2 (resíduos 148 - 159), que não possui nenhuma capacidade de ligação à heparina, e 2) uma variante de deleção de HBS del75-86 na qual a HBS de 12aa central foi deletada (as seqüências estão listadas nas Figuras 8A e 8B). A isoforma recombinante do tipo selvagem FS315 fundida com hFc teve potência similar à miostatina e activina que FS315 nativa (R&D, N^a de Catálogo 4889-FN/CF) no ensaio baseado em células. Esse equivalente foi denominado “do tipo selvagem” e usado como o controle. Os dados de ligação de SPR mostraram que todas as variantes com uma, duas ou três substituições de ácido glutâmico tinham afinidades reduzidas até graus diferentes, comparadas com o tipo selvagem (redução de 4-100 vezes ou ligação indetectável em nossa faixa de testagem) (**Tabela 8B**). Os dados mostraram que o aumento da extensão de substituições de ácido glutâmico diminuiu progressivamente a ligação à heparina. Por exemplo, os valores da K_D da ligação à heparina foram 1,5 nM, 10,7 nM e ligação indetectável para K82E, K(81,82)E e K(76,81,82)E, respectivamente. K(76,81,82)E, Δ HBS e a variante del75-86s mostraram ligação à heparina abolida similar (**Tabela 8B**), indicando que as afinidades de ligação à heparina de FS foram eficazmente

abolidas com três mutações pontuais de carga negativa.

[223] Por avaliação das diferentes variantes, as seguintes conclusões foram obtidas com relação ao papel de resíduos básicos em dois motivos FS BBXB. Em primeiro lugar, o segundo motivo BBXB KKNK (81-84) desempenhou um papel mais dominante na ligação à heparina do que o primeiro motivo BBXB KKCR (75-78), como indicado por $K(81,82)E$ (K_D 10,7 nM) que possui ligação aproximadamente 10 vezes mais fraca, comparada com $K(75,76)E$ (K_D 1,1 nM) (**Tabela 8B**). Em segundo lugar, o terceiro resíduo básico em cada um dos motivos FS BBXB teve um efeito bem mais fraco sobre a ligação à heparina. Os dados (**Tabela 8B**) mostram que: 1) uma variante dupla $K(76,82)E$ com as mutações de segundos resíduos básicos em ambos os motivos teve ligação 5 vezes mais fraca do que uma variante dupla R78/K84 com as mutações de terceiros resíduos básicos em ambos os motivos; 2) a adição de mutações do terceiro resíduo básico de cada um dos motivos (R78E e K84E) à variante K82E não afetou a afinidade de ligação, já que as K_D s para K82E, K78E/82E, e $K(82,84)E$ foram 1,5 nM, 1,3 nM e 1,1 nM, respectivamente; e 3) a variante $K(81,82)E$ se liga à heparina aproximadamente 10 vezes mais fraca do que a variante $K(82,84)E$, 10,7 nM vs. 1,1 nM; e $K(76,81,82)E$ teve uma afinidade de ligação bem mais fraca do que $K(76,82,84)E$, indicando um papel menor de K84. Em algumas modalidades, os dados demonstraram que os dois primeiros resíduos básicos são mais importantes do que o terceiro resíduo básico nos motivos FS BBXB para ligação à heparina. Tomados em conjunto, esses dados demonstraram que a quantidade, a posição de substituições de aminoácidos e a carga do resíduo afetam as afinidades de ligação à heparina.

Exemplo 2. Ligação da proteína de fusão folistatina-Fc ao receptor FcRn

[224] Algumas mutações no domínio Fc levaram à ligação reduzida com o receptor FcRn e, dessa forma, têm meia-vida sérica *in vivo* reduzida. A afinidade de ligação de proteínas de fusão folistatina-Fc ao receptor FcRn foi avaliada usando métodos padronizados. Resultados exemplares são mostrados na **Tabela 9**.

Tabela 9. Dados de ligação ao FcRn exemplares.

Proteína de fusão folistatina-Fc	KD (nM)
FS315WT-hFc	114,0
FS315K(81,82)A-hFcLALA	107,0
FS315K(76,81,82)A-hFcLALA	86,5
FS315K(76,82)E-hFcLALA	125,0
FS315K(81,82)E-hFcLALA	178,0
FS315K(81,82)D-hFcLALA	24,7
FS315K(76,81,82)E-hFcLALA	96-131
FS315K(76,81,82)D-hFcLALA	59,9
FS315 Δ HBS-hFcLALA	372,0
FS315(del75-86)-hFcLALA	126,0
FS315K82T--hFcLALA	44,8
FS303K82T-hFcLALA	27,6
FS315R86N/V88T-hFcLALA	69,5
FS315K75N/C77T/K82T-hFcLALA	126,0
FS315C66A/K75N/C77T-hFcLALA	28,0
FS315C66S/K75N/C77T-hFcLALA	83,0
monoFS315K(76,81,82)E-hFcLALA	40,6
monoFS315-hFcLALA	12,8
monoFS315 Δ HBS-hFcLALA	36,7

[225] Algumas mutações no domínio Fc levam à ligação reduzida com o receptor Fc Gama IA e, dessa forma, possuem função efetora reduzida. A afinidade de ligação de proteínas de fusão folistatina-Fc ao receptor Fc Gama IA foi avaliada usando métodos padronizados. A afinidade de ligação de proteínas de fusão folistatina-Fc ao receptor Fc Gama IA foi avaliada usando métodos padronizados.

[226] Para determinar as afinidades de ligação para o receptor Fc gama IA, proteínas folistatina-Fc foram diluídas em acetato de sódio, pH 5,0, até 2,5 µg/ml e imobilizadas em chip CM5 a aproximadamente 150 RU. Receptor Fc Gama RIA foi adquirido como estoque liofilizado de R&D Systems, Nº de Catálogo 1257-FC-050. Para análise do receptor Fc Gama IA, o tampão de corrida foi HBS-P+. As condições de análise incluem um tempo de contato de 180 segundos, um tempo de dissociação de 600 segundos e uma taxa de fluxo de 30 µl/minuto. As condições de regeneração foram 10 mM de fosfato de sódio, pH 2,5, 500 mM de NaCl por 10 segundos a 30 µl/min com estabilidade por 30 segundos. Receptor Fc Gama IA foi diluído 62,5 nM-0,49 nM. Resultados exemplares são mostrados na **Tabela 10**.

Tabela 10. Dados de ligação ao Fc Gama IA.

Proteína de fusão folistatina-Fc	<i>Fc gama IA KD (nM)</i>
FS315wt-hFc (proteína comparadora)	0,14
FS315K(76,81,82)E-hFcLALA	81,9
FS315K(76,81,82)D-hFcLALA	58,8

Exemplo 3. Proteínas de fusão folistatina-Fc possuem meia-vida sérica estendida

[227] Em algumas modalidades, a afinidade de ligação à

heparina afeta o perfil farmacocinético *in vivo*. É relatado que folistatina possui uma meia-vida sérica curta. Por exemplo, a proteína FS315 comercial típica possui uma meia-vida sérica de cerca de uma hora. Nesse exemplo, a meia-vida *in vivo* de proteínas de fusão folistatina-Fc que compreendem as várias mutações, como mostrado na Figura 3A, Figura 3B e **Tabela 11**, foram determinadas como tendo meias-vidas séricas significativamente estendidas, comparadas com uma proteína comparadora.

[228] **Tabela 11.** Após administração, os níveis séricos de proteína de fusão folistatina-Fc foram coletados em vários pontos do tempo (Figura 3A e Figura 3B). A meia-vida sérica das proteínas de fusão folistatina-Fc recombinantes variou de 45,7 a 194 horas.

[229] Por meio de mutagênese dos motivos básicos BBXB, foi gerada uma série variantes com diferentes afinidades de ligação à heparina *in vitro*. A ligação à heparina é um substituto para a associação com proteoglicanos de sulfato de heparano da superfície celular, que é um processo crucial para internalização e depuração para muitas proteínas *in vivo*. A ligação à heparina modulada na farmacocinética em camundongos foi estudada. Variantes de HBS selecionadas com diferentes afinidades de ligação à heparina foram administradas como doses intravenosas únicas (1 mg/kg) a fêmeas de camundongos CD1. As exposições séricas dessas moléculas foram monitoradas por até 168 horas pós-dosagem. Após uma dose i.v. única de 1,0 mg/kg, o tipo selvagem teve uma taxa de depuração e meia-vida de 30 ml/h/kg e 68 h, respectivamente, e a variante Δ HBS teve uma depuração bem menor e uma meia-vida mais longa de 1,3 ml/h/kg e 92 horas,

respectivamente (**Tabela 12**), consistente com os valores relatados para FS315-mFc e FS315 Δ HBS-mFc. Todas as variantes de ligação à heparina recém projetadas mostraram perfis farmacocinéticos aprimorados, comparadas com o tipo selvagem (Figura 3A, **Tabela 11**). A afinidade de ligação à heparina *in vitro* diminuída se correlacionava com a exposição aumentada medida como a Área Sob a Curva (AUC) e depuração diminuída (variando entre 2-25 vezes), comparada com o tipo selvagem (Figura 3A e 3B; Figura 4A e 4B). A maioria das variantes modificadas geneticamente também mostrou meia-vida estendida (**Tabela 11**). Os dados demonstram claramente o impacto crucial da ligação à heparina sobre As propriedades PK *in vivo*.

[230] Relatos prévios demonstraram que a proteína FS recombinante 315 Δ HBS teve AUC e meia-vida aumentadas aproximadamente 8 vezes e aproximadamente 3 vezes, comparada com recombinante do tipo selvagem em camundongos. A variante K(76,81,82)E, que não mostrou ligação à heparina mensurável, teve AUC aproximadamente 25 vezes aumentada e meia-vida aproximadamente 2 vezes aumentada, comparada com o tipo selvagem (**Tabela 11**). Além disso, K(76,81,82)E também mostrou propriedades de capacidade de desenvolvimento melhores, comparada com a variante Δ HBS em nossos estudos, incluindo expressão de proteína aumentada e agregação reduzida (**Tabela 11**). Com base no perfil farmacocinético aprimorado e nas características de desenvolvimento aqui descritas, a K(76,81,82)E variante fundida com Fc humano ou Fc murídeo foi usada para estudos farmacodinâmicos, e resultaram em massa muscular significativamente aumentada e melhora funcional de uma forma dose-dependente.

Tabela 11. Dados PK *in vivo* exemplares de proteína de fusão folistatina-Fc.

<i>Proteína de fusão</i>	<i>Dose (mg/kg)</i>	<i>T_{1/2} (h)</i>	<i>AUC_{INF} (h*ng/ml)</i>	<i>%AUC_{Extrapolada} (%)</i>	<i>Cl (ml/h/kg)</i>	<i>V_{ss} (ml/kg)</i>
WT (proteína de fusão comparadora)	1,0	3,77	1550	29,3	322	1490
K82E	1,0	93,5	67700	14,1	11,8	807
K82T	1,0	58,9	63,3		16	424
K(81,82)A	1,0	80,1	126		8,0	385
K(76,81,82)E	1,0	154	851		1,2	227
K(76,82)E	1,0	95,4	262000	17,4	2,67	222
K(82,84)E	1,0	64,2	336000	9,97	2,98	167
K(81,82)E	1,0	104	236500	17,6	4,20	418
K(81,82)D	1,0	194	529000	37,7	1,89	371
R78E/K82E	1,0	94,5	760000	25,0	1,32	151
K(76,81,82)A	1,0	60,4	179000	5,95	4,46	205
K(76,81,82)E	1,0	116	646000	28,8	1,86	253
K(76,81,82)D	1,0	85,4	598000	21,7	1,67	168

K(76,82,84)E	1,0	74,7	638000	17,3	1,57	136
K(76,81,82)E/V8 8E	1,0	87,9	993000	26,1	1,01	122
R78E/K(82,84)E	1,0	71,5	453000	18,0	2,21	202
K75N/C77T/K82T	1,0	55,6	566000	12,7	0,886	71,0
G74N/K76T/P85T	1,0	45,7	92100	5,54	10,9	509
C66A/K75N/C77T	1,0	51,6	331000	9,37	3,02	194

Exemplo 4. Proteínas de fusão folistatina-Fc inibem miostatina e activina A

[231] A habilidade de proteínas de fusão folistatina-Fc para inibir a atividade de miostatina e activina A foi testada usando um ensaio de repórter de gene de luciferase. Células de rabdomiossarcoma A204 foram transfectadas estavelmente com o plasmídeo pGL3(CAGA)12-Luc, que contém um elemento de resposta Smad3-seletivo na frente do gene de luciferase de vaga-lume. 1,2 nM de miostatina ou activina A foi usado para estimulação da sinalização de Smad3. Proteínas de fusão foram incubadas com miostatina ou activina A por 30 minutos em temperatura ambiente antes da adição às células, e a seguir, após 24 horas de incubação a 37°C, a atividade de luciferase foi medida. A concentração de miostatina ou activina A usada para os ensaios de sinalização foi de 1,2 nM. Como mostrado na **Tabela 14**, as proteínas de fusão folistatina-Fc inibiram miostatina em um ensaio de estimulação com IC₅₀s variando de menos do que 0,5 nM até cima de 1,5 nM. Como mostrado na **Tabela 12**, as proteínas de fusão folistatina-Fc inibiram activina A em um ensaio de estimulação com IC₅₀s variando de menos do que 0,5 nM até acima de 1,5 nM.

[232] Em contraste com as grandes diferenças observadas para afinidades de ligação à heparina entre variantes FS315-hFc substituídas com aminoácidos carregados negativamente (redução de 4->100 vezes, comparada com o tipo selvagem), as variantes exibiram poucas alterações na afinidade de ligação à miostatina. Os valores da K_D determinados pelo método de SPR estão resumidos nas **Tabelas 8A e 8B**. Diversas das variantes de ligação à heparina tiveram afinidades de ligação

à miostatina moderadamente aumentadas pelo ensaio de SPR (indução de 1,5-5 vezes, comparada com o tipo selvagem). A variante de deleção de HBS del75-86 mostrou uma redução de 3 vezes na afinidades de ligação à miostatina, comparada com o tipo selvagem. Para determinar se as variantes alteram a função biológica de FS, um subconjunto de variantes foi selecionado, e sua inibição da sinalização de Smad2/3 induzida por miostatina e activina A usando um ensaio de repórter de luciferase de SMAD2/3 em células de rabdomiossarcoma A204 foi avaliada. Para todas as variantes de ligação à heparina com uma, duas ou três mutações pontuais, a potência da inibição da sinalização de miostatina e activina foi similar, e comparável com o tipo selvagem (**Tabela 12** e Figura 2A). A variante de deleção de HBS (del75-86) teve redução de aproximadamente 20 vezes na inibição de miostatina e uma redução de aproximadamente 5 vezes na inibição de activina, comparada com o tipo selvagem (**Tabela 12** e Figura 2A) no ensaio baseado em células. No entanto, não houve redução funcional para a variante de substituição de HBS Δ HBS (**Tabela 12**), sugerindo que a deleção dos aminoácidos 75-86 pode alterar a conformação da molécula.

[233] As mutações nos motivos BBXB foram testadas por SPR para avaliar se essas mutações afetam a interação entre a porção Fc das variantes recombinantes e FcRn. Os dados indicam que não houve alterações óbvias da afinidade ao FcRn para nossas variantes de ligação à heparina, comparadas com o tipo selvagem (**Tabelas 8A e 8B**), na medida em que as mutações estão localizadas na região HBS em FSD1, distante da região Fc fundida ao terminal-C. Os pontos isoelétricos (pI) para a maioria das variantes com as substituições de

aminoácidos carregados negativamente, bem como para as variantes Δ HBS e del75-86s, mudaram para a faixa ácida (**Tabela 8B**).

Tabela 12 IC₅₀s para miostatina e activina A pelo ensaio baseado em células para a via de SMAD.

Nome da amostra	Miostatina IC ₅₀ (nM)	Activina A IC ₅₀ (nM)
FS315wt-hFc (proteína comparadora)	0,4	0,7
ActRIIB-Fc	0,5	0,5
FS315 Δ HBS-hFcLALA	0,4	1,4
FS315K(76, 81, 82)A-hFcLALA	0,3	0,7
FS315K82E-hFcLALA	0,4	0,6
FS315K(81, 82)E-hFcLALA	0,6	1,0
FS315K(82, 84)E-hFcLALA	0,7	1,1
FS315K(76, 81, 82)E-hFcLALA	0,5	0,7
K(76, 82, 84)E	0,4	1,0
K(76, 81, 82)A	0,8	1,1
K(76, 81, 82)D	0,7	1,1
FS315K(81, 82, 84)E-hFcLALA	0,4	1,0
FS315K(76, 81, 82)E/V88E-hFcLALA	0,6	0,6
FS315R78E/K82E-hFcLALA	0,5	1,0
FS315R78E/K(82, 84)E-hFcLALA	0,5	0,6
FS315K75N/C77T/K82T-hFcLALA	0,7	1,1
FS315G74N/K76T/P85T-hFcLALA	1,0	1,3
FS315C66S/K75N/C77T-hFcLALA	1,5	2,1
FS315K(76, 81, 82)E-mFc	0,7	0,8
Variantes de hiperglicosilação		
K75N/C77T/K82T	1,8	3,4

C66A/K75N/C77T	1,5	2,1
C66S/K75N/C77T	1,9	4,2
K82T	0,9	1,2
G74N/K76S	0,9	1,3

Exemplo 5. Eficácia *in vivo* da administração sistêmica de proteínas de fusão folistatina-Fc

[234] Esse exemplo demonstra que a administração sistêmica de proteínas de fusão folistatina-Fc (por exemplo, FS315K(76,81,82)E-hFcLALA, FS315K(76,81,82)E-mFc) a camundongos do tipo selvagem e ao modelo em camundongo *mdx* de distrofia muscular de Duchenne resulta em uma tendência de massa muscular aumentada *in vivo* em uma dose de 10 mg/kg administrada por via intravenosa ou por via subcutânea.

[235] Especificamente, em um estudo, machos C57BL/6 (camundongos do tipo selvagem) receberam a administração de veículo (ou seja, PBS) ou FS315K(76,81,82)E-hFcLALA por injeção intravenosa em uma dose de 10 mg/kg, ou injeção subcutânea em uma dose de 20 mg/kg duas vezes por semana por 4 semanas. Em um segundo estudo, machos de camundongos *mdx* receberam a administração de veículo (ou seja, PBS) ou FS315K(76,81,82)E-mFc por injeção subcutânea em uma dose de 10 mg/kg, ou a fusão de Fc quimérico com receptor solúvel de activina tipo IIB de camundongo (ActRIIB-mFc) por injeção subcutânea em uma dose de 3 mg/kg duas vezes por semana por 12 semanas. Vinte e quatro horas após o último tratamento, os camundongos foram sacrificados e os músculos gastrocnêmios e quadríceps foram coletados e pesados. Dados exemplares na **Tabela 13** mostram que houve um aumento significativo no peso dos músculos gastrocnêmios e quadríceps de camundongos *mdx* e C57BL/6, comparados com os músculos

gastrocnêmios ou quadríceps tratados somente com veículo. Dessa forma, há uma indicação nítida de que proteínas de fusão folistatina-Fc recombinantes aumentam a massa muscular quando dosadas sistemicamente em camundongos do tipo selvagem e em um modelo animal de DMD. No estudo *mdx*, a força de preensão do membro torácico foi medida após 11 semanas de dosagem. Dados exemplares na Figura 7 mostram que houve um aumento significativo na força de preensão do membro torácico de camundongos *mdx* tratados com FS315K(76,81,82)E-mFc, comparada com a força de preensão de animais tratados somente com veículo. A magnitude da força de preensão para os animais tratados com FS315K(76,81,82)E-mFc foi maior do que para animais tratados com o controle positivo ActRIIB-mFc e também maior do que animais do tipo selvagem C57BL/10ScSnJ.

Tabela 13. Dados da massa muscular (% de alteração em relação ao veículo) do camundongo C57BL/6 e *mdx*.

	% de alteração em relação ao veículo			
	C57BL/6		<i>mdx</i>	
	Gastrocnê- mio	Quadrí- ceps	Gastrocnê- mio	Quadrí- ceps
FS315K(76,81,82)E-hFcLALA 10 mg/kg (IV 2x semanalmente)	+28%	+33%		
FS315K(76,81,82)E-hFcLALA 20 mg/kg (SC 2x semanalmente)	+32%	+39%		
FS315K(76,81,82)E-mFc 10 mg/kg (SC 2x semanalmente)			31%	36%

ActRIIB-mFc			24%	28%
3 mg/kg (SC 2x semanalmente)				

Exemplo 6. Caracterização de construções de folistatina

[236] Esse exemplo demonstra que a administração sistêmica de proteínas de fusão folistatina-Fc (por exemplo, FS315K(76,81,82)E-hFcLALA, FS315K(76,81,82)E-mFc) aos camundongos do tipo selvagem e ao modelo em camundongo *mdx* de distrofia muscular de Duchenne resulta em uma tendência de massa muscular aumentada *in vivo* em uma dose de 10 mg/kg administrada por via intravenosa ou por via subcutânea.

[237] As alterações no pI também foram avaliadas para proteínas de fusão folistatina-Fc. A **Tabela 14** abaixo mostra uma mudança para um pI mais ácido com mutações E e D no HBS, bem como com variantes de hiperglicosilação. A mudança no pI se correlaciona com ligação à heparina diminuída e exposição *in vivo* aumentada.

[238] O perfil de cIEF (faixa de pI) foi determinado usando um Instrumento NanoPro (ProteinSimple). A concentração de proteína final testada foi de 0,0025 mg/ml, 12 µl carregados no poço. O tampão de diluição usado foi DPBS e Uréia/Chaps (10 M/ 0,6%). Reagentes usados adicionais incluíram pré-mistura G2: 4-9 (ProteinSimple 040-969), padrão de pI 1 (ProteinSimple 040-644), anticorpo primário: pAB anti-FS de coelho (Abcam # ab47941) em diluição de 1:100, anticorpo secundário: conjugado de HRP de anti-IgG de coelho (Promega #4011) na diluição de 1:100, e substrato: Luminol/Peróxido XDR.

Tabela 14. Faixas de pontos isoelétricos (pI) em proteínas de fusão folistatina-Fc.

Proteína de fusão folistatina-Fc	Faixa de pI
FS315WT-hFc	5,51-6,17
FS Δ HBS-hFcLALA	4,82-5,72
FS Δ HBS-GGG-hFcLALA	4,82-5,72
FS315del75-86-hFcLALA	4,83-5,26
FS315K(81,82)A-hFcLALA	5,31-5,96
FS315K(81,82)A-GGG-hFcLALA	5,23-5,93
FS315K(76,81,82)A-hFcLALA	5,24-5,93
FS303K(76,81,82)A-hFcLALA	5,28-5,93
FS315K(76,81,82)A-GGG-hFcLALA	5,23-5,87
FS303K(76,81,82)A-GGG-hFcLALA	5,23-5,93
FS315K82T-hFcLALA	5,29-5,93
FS303K82T-hFcLALA	5,27-6,14
FS315K82T-GGG-hFcLALA	5,48-5,95
FS303K82T-GGG-hFcLALA	5,23-6,15
FS315K82E-hFcLALA	5,48-6,09
FS315K(75,76)E-hFcLALA	5,05-5,26
FS315K(76,82)E-hFcLALA	4,89-5,26
FS315K(81,82)E-hFcLALA	4,83-5,25
FS315K(81,82)D-hFcLALA	4,88-5,59
FS315K(76,81,82)E-hFcLALA	4,87-5,80
FS315K(76,81,82)D-hFcLALA	4,82-5,67
FS315P85T-hFcLALA	5,51-6,09
FS315R86N/V88T-hFcLALA	5,49-6,08
FS315K75N/C77T/K82T-hFcLALA	4,89-5,26
FS315R78N/N80T-hFcLALA	5,47-6,09
FS315C66A/K75N/C77T-hFcLALA	4,81-6,47
FS315C66S/K75N/C77T-hFcLALA	4,82-6,59
FS315K(76,81,82)E-mFc	4,7-5,3

MonoFS315K(76,81,82)E-hFcLALA	4,7-5,3
MonoFS315WT-hFcLALA	4,7-5,67
MonoFS315 Δ HBS-hFcLALA	4,83-5,9

Exemplo 7: Efeito do tratamento em folistatina-Fc recombinante sobre os níveis hormônio folículo-estimulante (FSH) e de miostatina em fêmeas de ratos Sprague-Dawley ooforectomizadas

[239] O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos de uma única injeção intravenosa (bolo) de FS315K(76,81,82)E-hFcLALA, ACE-031 ou FS315WT-hFc a fêmeas ooforectomizadas de ratos Sprague-Dawley sobre os níveis de hormônio folículo-estimulante (FSH) e de miostatina.

[240] Para esses estudos, fêmeas de ratos ooforectomizadas receberam a administração de uma dose única de Veículo 1 (PBS), Veículo 2 (10 mM de citrato, sacarose 8%, Tween® 80 0,02%, pH 6,5), Veículo 3 (20 mM de histidina, 50 mM de arginina, sacarose 6%, polissorbato 20 0,005%, pH 6,8), FS315K(76,81,82)E-hFcLALA em Veículo 2, ou FS315WT-hFc em Veículo 3 - injeção por via intravenosa (IV) (bolo). **Tabela 15** abaixo é um resumo do design do estudo.

Tabela 15: Design do estudo para o efeito do tratamento sobre os níveis de hormônio folículo-estimulante (FSH) e miostatina em fêmeas ooforectomizadas de ratos Sprague-Dawley após uma única injeção intravenosa (bolo).

Número do grupo	Artigo de teste ^a	Nível de dose (mg/kg)	Concentração da dose (mg/ml)	Volume da dose (ml/kg)	Número de fêmeas
1	Veículo 1	0	0	5	12
2	Veículo 2	0	0	5	12
3	Veículo 3	0	0	5	12

4	EEE-FS-hFc *	1	0,2	5	12
5		3	0,6	5	12
6		10	2	5	12
7		30	6	5	12
8	ACE-031	10	2	5	12
9	FS316WT-hFc	10	2	5	12

^a Dose calculada pelo peso corporal

* EEE-FS-hFc é FS315K(76,81,82)E-hFcLALA

[241] Amostras de sangue foram coletadas de 6 fêmeas/grupo/ponto do tempo nos Dias do Estudo -2, -1, antes da dosagem, em 5 minutos pós-dosagem, e em 1, 2, 6, 10, 16, 24, 48, 72, 168, 240 e 336 horas pós-dosagem em tubos com anticoagulante. Os dados de concentração de FSH por esses estudos são mostrados na **Tabela 16** abaixo.

Tabela 16: Concentração média de FSH pós-dosagem.

Ponto do tempo	Concentração média de FSH (ng/ml)								
	Veículo 1	Veículo 2	Veículo 3	1 mg/kg de EEE- FS- hFc *	3 mg/kg de EEE- FS- hFc *	10 mg/kg de EEE- FS- hFc *	30 mg/kg de EEE- FS- hFc *	10 mg/kg de ACE- 031	10 mg/kg de FS315WT- hFc
Pré-dose	21,9	20,3	24,5	29,8	23,6	20,9	25,2	24,3	23,9
5 min PD	25,7	23,9	24,7	23,6	27,1	29,1	23,8	22,3	26,3
1 h PD	30,0	27,9	30,2	28,1	25,6	20,8	26,1	26,0	26,9
2 h PD	24,9	26,5	26,0	24,4	24,9	26,3	22,2	22,0	30,4
6 h PD	27,6	24,0	24,5	21,9	18,4	16,2	18,7	24,5	21,7
10 h PD	30,4	31,2	30,6	17,0	16,1	15,8	9,5	12,2	13,5
16 h PD	30,9	27,9	28,9	22,4	12,3	8,8	10,1	19,4	22,7
24 h PD	29,7	27,4	28,4	17,9	13,6	4,6	2,9	14,7	29,2
48 h PD	27,9	26,4	29,0	26,0	15,4	8,9	7,0	16,1	30,2
72 h PD	32,0	28,1	27,4	23,5	20,0	11,2	2,8	14,3	29,5

168 h PD	28,0	25,6	28,4	26,9	26,8	17,6	13,8	17,1	30,1
240 h PD	31,3	26,8	32,6	25,6	31,9	25,1	19,6	16,3	28,6
336 h PD	30,1	27,7	30,0	30,7	31,0	29,9	29,3	24,8	39,9

PD = pós-dose; h = hora: min = minuto

EEE-FS-hFc é FS315K(76,81,82)E-hFcLALA

[242] Dados bioanalíticos, que mostram concentração média de Artigo de Teste (TA) (ou seja, Veículo 1, Veículo 2, Veículo 3, FS315K(76,81,82)E-hFcLALA ACE-031, ou FS315WT-hFc) estão resumidos na **Tabela 17**, na tabela de PK (exposição ao fármaco) abaixo.

Tabela 17: Dados bioanalíticos pós-dosagem.

Ponto do tempo	Concentração média de TA (ng/ml) (SD)								
	Veículo 1	Veículo 2	Veículo 3	1 mg/kg de EEE-FS-hFc *	3 mg/kg de EEE-FS-hFc *	10 mg/kg de EEE-FS-hFc *	30 mg/kg de EEE-FS-hFc *	10 mg/kg de ACE-031	10 mg/kg de FS315WT-hFc
Pré-dose	0,0(0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0(0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (00)
5 min PD	0,0(0,0)	0,0(0,0)	0,0(0,0)	17500,0 (2354,0)	66000,0 (8863,8)	217000,0 (25183,8)	774000,0 (90650,3)	225000,0 (37052,5)	36800,0 (9190,2)
1 h PD	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	10200,0 (1308,1)	32900,0 (16645,4)	78500,0 (53774,0)	160000,0 (210793,0)	57600,0 (71006,1)	3920,0 (2022,1)
2 h PD	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	12900,0 (958,6)	35800,0 (79223)	123000,0 (47016,5)	401000,0 (97890,2)	164000,0 (20719,7)	1570,0 (371,0)
6 h PD	0,0(0,0)	0,0(0,0)	0,0(0,0)	7230,0 (3304,1)	24900,0 (8544,6)	66300,0 (30004,0)	161000,0 (88094,8)	73700,0 (49048,4)	620,0 (347,1)
10 h PD	0,0(0,0)	0,0(0,0)	0,0(0,0)	7720,0	22800,0	73200,0	238000,0	151000,0	263,0

				(590,4)	(4591,9)	(13229,1)	(53610,7)	(21990,9)	(94,8)
16 h PD	0,0(0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	5060,0 (1024,4)	17200,0 (5205,6)	43300,0 (11025,3)	134000,0 (30675,8)	85000,0 (38208,8)	458,0 (597,6)
24 h PD	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	6080,0 (182,7)	14900,0 (1793,0)	44800,0 (9838,3)	127000,0 (21903,3)	102000,0 (10660,1)	101,0 (73,2)
48 h PD	0,0(0,0)	0,0(0,0)	0,0(0,0)	2590,0 (390,2)	8330,0 (1776,9)	14100,0 (3557,2)	65500,0 (5433,0)	78800,0 (14341,1)	301,0 (444,4)
72 h PD	0,0(0,0)	0,0(0,0)	0,0(0,0)	1770,0 (324,3)	6360,0 (1205,9)	25400,0 (10170,1)	68700,0 (6478,3)	71300,0 (10509,1)	54,4 (54,2)
168 h PD	0,0(0,0)	0,0(0,0)	0,0(0,0)	1010,0 (265,3)	2730,0 (814,3)	7360,0 (1592,5)	17900,0 (2463,4)	43600,0 (19076,9)	96,7 (154,1)
240 h PD	0,0(0,0)	0,0(0,0)	0,0(0,0)	740,0 (157,9)	1610,0 (185,5)	3930,0 (1314,7)	10500,0 (1462,4)	31700,0 (7431,8)	6,2 (15,1)
3361 h PD	0,0(0,0)	0,0(0,0)	0,0(0,0)	450,0 (83,5)	939,0 (243,4)	3530,0 (1143,5)	6200,0 (1679,6)	17300,0 (13034,0)	24,7 (51,0)

Análise farmacocinética

[243] Todas as fêmeas de ratos foram expostas a FS315K(76,81,82)E-hFcLALA, ACE-031 ou FS315WT-hFc após a injeção IV única em bolo de FS315K(76,81,82)E-hFcLALA, ACE-031 ou FS315WT-hFc, respectivamente, em todos os níveis de dose. No geral, a exposição de FS315K(76,81,82)E-hFcLALA em termos de AUC_{last} e C_{max} aumentou geralmente de forma proporcional à dose quando se compara com a faixa de dose de 1 a 30 mg/kg. Os valores de Cl de FS315K(76,81,82)E-hFcLALA foram baixos e variaram de 0,0246 a 0,0318 ml/min/kg através de todos os níveis de dose. Os valores de V_{ss} de FS315K(76,81,82)E-hFcLALA variaram de 0,177 a 0,212 l/kg através de todos os níveis de dose, o que sugere uma distribuição moderada aos tecidos, quando comparado com o volume de sangue total de um rato (0,054 l/kg). Os valores de $T_{1/2}$ para FS315K(76,81,82)E-hFcLALA variaram de 74,8 a 135 horas através de todos os níveis de dose. O Cl e V_{ss} de ACE-031 foram de 0,00812 ml/min/kg e 0,0891 l/kg, respectivamente. O valor de Cl foi menor com uma distribuição (V_{ss}) pequena em tecidos, quando comparado com o volume de sangue total de um rato. Esses valores resultaram em uma $T_{1/2}$ de 134 horas para ACE-031. O Cl e V_{ss} de SHP619 foram de 2,82 ml/min/kg e 10,1 l/kg (ambos aproximações), respectivamente. O valor de Cl foi baixo com uma distribuição (V_{ss}) alta em tecidos, quando comparado com o volume de sangue total de um rato. Esses valores resultaram em uma $T_{1/2}$ de 60,8 horas (uma aproximação) para FS315WT-hFc.

Exemplo 8: Projeção de dose para proteínas de fusão folistatina-Fc

[244] Com base nos dados apresentados nos Exemplos

acima, foi feito um modelo PK/PD mecanístico para prever uma dose eficaz no ser humano para uma proteína de fusão folistatina-Fc recombinante (FS-Fc) para uso no tratamento de distrofia muscular. O seguinte foi analisado para a construção do modelo PK/PD mecanístico. Em primeiro lugar, a literatura relevante em relação à via de sinalização de miostatina/activina foi analisada para identificar dados que poderiam ser usados para parametrização, calibração e validação do modelo PK/PD. Em segundo lugar, foi desenvolvido um modelo mecanístico de ligação à miostatina/activina A e dos efeitos de terapias relevantes sobre os desfechos PD, incluindo aumento da massa muscular e modulação de FSH. O modelo foi verificado usando dados pré-clínicos e clínicos de exposição, biomarcador e eficácia de uma molécula instrumental e anticorpo para miostatina relatados na literatura. Veja Jacobsen L e cols., "PPMD Connect Conference", 26-29 de junho de 2016, cujo conteúdo é incorporado nesse relatório descritivo por referência em sua totalidade. Por último, o modelo PK/PD mecanístico foi usado para simular relacionamentos dose-resposta em vários desfechos PD, incluindo ocupação de receptor (R0), aumento da massa muscular e tempo até o efeito.

[245] O modelo PK/PD mecanístico construído incluiu três compartimentos, especificamente plasma, hipófise e músculo. Esse modelo foi projetado para descrever os processos biológicos de FS-Fc e suas interações com miostatina e activina A. A biodistribuição de FS-Fc do soro para o músculo e para a hipófise foi estimada usando a metodologia PBPK. A metodologia PBPK é descrita em Shah e Betts A.M., *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* (2012) 39: 67-86, cujo conteúdo

é incorporado nesse relatório descritivo por referência em sua totalidade. Além disso, a inibição de activina A *in vivo* foi verificada usando modulação de FSH em ratos ooforectomizados. Os resultados indicaram que R0 de ActRIIB no músculo por ligação tanto à miostatina quanto à activina A estava ligado ao aumento da massa muscular. Dados clínicos do uso de BMS-986089 para tratamento de distrofia muscular (veja Jacobsen L e cols., "PPMD Connect Conference", 26-29 de junho de 2016) foram usados para estabelecer um limiar de R0 de ActIIB para o aumento da massa muscular em humanos.

[246] Por aplicação do modelo PK/PD mecanístico, que incorporou R0 de ActRIIB para inibição de miostatina e de activina A nos músculos, foi previsto que FS-Fc aumenta significativamente o volume muscular em voluntários humanos saudáveis em uma dose de cerca de 3 mg/kg administrada por via subcutânea uma vez por semana. O modelo também previu que FS-FC aumentaria significativamente o volume muscular em voluntários humanos saudáveis em uma dose de cerca de 10 mg/kg administrada por via intravenosa uma vez por mês.

[247] Em resumo, os exemplos acima demonstram que proteínas de fusão folistatina-Fc recombinantes são altamente eficazes na indução de hipertrofia muscular em um modelo de doença DMD, por exemplo, por administração sistêmica. A hipertrofia muscular no modelo em camundongo *mdx* se traduziu em melhora funcional na força de preensão do membro torácico. Dessa forma, proteínas de fusão folistatina-Fc recombinantes podem ser produtos terapêuticos de proteína eficazes para o tratamento de DMD.

Exemplo 9. Novas seqüências de glicosilação ligada ao N de consenso (NXT/S) introduzidas para hiperglicosilação

[248] Esse exemplo mostra a geração de variantes recombinantes hiperglicosiladas FS315-hFc pela introdução de novas seqüências de glicosilação ligada ao N de consenso na alça de ligação à heparina. A lógica para a criação dos mutantes de hiperglicosilação incluiu a redução do risco de imunogenicidade, modulação do teor de carboidratos para diminuir a depuração, e bloqueio da ligação à heparina por adição de uma estrutura de glicano volumosa, carregada negativamente. Foram projetadas 10 novas variantes que representavam 6 sítios de glicosilação ligada ao N de consenso, NXT/S, em que X pode ser qualquer aminoácido, exceto prolina, nas posições 74, 75, 78, 80, 83 e 86 dentro do região HBS. A detecção inicial da incorporação de porção de carboidrato adicional foi observada pela mudança do peso molecular (MW) em SDS-PAGE (Figura 5A). Comparada com o tipo selvagem e outra variantes, a variante K75N/C77T/K82T mostrou uma mudança nítida para um MW maior, sugerindo incorporação de um glicano. Duas variantes adicionais (C66A/K75N/C77T e C66S/K75N/C77T) mostraram uma mudança menos pronunciada para um MW maior (Figura 5A). Todas as três dessas variantes tinham os sítios mutados comuns K75N/C77T. dados de cIEF mostraram que a variante K75N/C77T/K82T teve uma mudança ácida nítida de pI, comparada com uma variante K82T (Figura 5B), o que indicava a ocupação potencial de uma porção glicano carregada negativamente no sítio K75N que causou a mudança tanto do MW quanto de pI. Para confirmar ainda mais o estado da ocupação de glicano em todos os sítios de glicosilação ligada ao N introduzidos, foi feita a caracterização baseada em LC/MS. Dados de LC/MS confirmaram que, entre os seis sítios estudados na alça de

ligação à heparina, FS hiperglicosilada foi gerada por introdução de um sítio de glicosilação de consenso na posição 75 (**Tabela 18**). As três variantes K75N/C77T/K82T, C66A/K75N/C77T e C66S/K75N/C77T que continham as mesmas mutações K75N/C77T tiveram ocupação de glicano variável (69,7%, 39,6% e 21,5%) com proporções similares de mol de ácido siálico por mol de oligossacarídeo (1,99, 1,88 e 1,96) em N75 (**Tabela 18**). O grau de mudança de mobilidade na eletroforese em gel de poliacrilamida foi consistente com o grau de ocupação de glicano em N75 para três variantes hiperglicosiladas (Figura 5A e **Tabela 18**). O tipo selvagem, variante Δ HBS, e todas as 10 variantes de glicano projetadas tiveram ocupação de glicano e teor de ácido siálico similares em sítios de glicano de FS nativa N112 e N259, mas ocupação bem variável em N95 (**Tabela 18**).

Tabela 18: Caracterização de sítios de glicosilação ligada ao *N* endógenos e hiperglicosilados. Percentual de ocupação de glicano e teor de ácido siálico são mostrados.

Variantes FS315-hFc	Sítio de hiperglicosilação			N95		N112		N259	
	Loca- lização	Ocupação	Teor de siálico ^a	Ocupação	Teor de siálico ^a	Ocupação	Teor de siálico ^a	Ocupação	Teor de siálico ^a
Tipo selvagem				14,7%	2,27	13,6%	0,93	96,0%	1,34
ΔHBS				22,72%	1,83	20,2%	1,68	98,8%	1,74
K82T	N80	n.d.	n.d.	49,7%	1,69	16,2%	0,84	97,1%	1,17
P85T	N83	n.d.	n.d.	9,3%	2,40	18,6%	1,14	97,0%	1,28
R78N/N80T	N78	n.d.	n.d.	31,3%	2,37	17,7%	1,02	97,0%	1,39
R86N/V88T	N86	^b	^b	21,0% ^b	1,05 ^b	15,1%	1,02	96,7%	1,07
G74N/K76T/P85T	N74:	n.d.	n.d.	15,0%	2,21	23,1%	1,29	95,4%	1,28
	N83:	n.d.	n.d.						
K75N/C77T/K82T	N75	69,7%	1,96	47,9%	2,34	16,9%	1,52	97,0%	1,41
	N80	n.d.	n.d.						
C66A/K75N/C77T	N75	39,6%	1,88	32,8%	2,27	17,8%	1,44	94,9%	1,27
C66S/K75N/C77T	N75	21,5%	1,96	32,9%	2,36	19,7%	1,44	95,1%	1,29

^a mol de ácido siálico por mol de oligossacarídeo

^b Resultados não distinguem glicosilação em N86 ou N95

Exemplo 10: Características de ligação *in vitro* e propriedades farmacocinéticas *in vivo* das variantes de hiperglicosilação

[249] A lógica do design de novos sítios de hiperglicosilação dentro do região HBS foi uma tentativa de bloquear a ligação à heparina por introdução de estruturas de glicano carregadas negativamente e volumosas. Para três variantes hiperglicosiladas com ocupação de glicano em N75, a redução da afinidade de ligação à heparina *in vitro* (redução de aproximadamente 15 vezes, comparada com o tipo selvagem) só foi observada com a variante K75N/C77T/K82T, que tinha a maior ocupação de glicano em N75, bem como uma mutação K82T no segundo motivo BBXB (**Tabela 19**), indicando que o efeito de carboidrato em N75 sobre a atividade de ligação à heparina poderia ser moderado. As três variantes hiperglicosiladas mostraram redução da ligação à miostatina ligeira ou moderada, comparada com o tipo selvagem, como medida por SPR (**Tabela 19**). No ensaio repórter baseado em célula A204, as três variantes hiperglicosiladas tiveram uma redução de 2-3 vezes na inibição de miostatina e uma redução de 2-4 vezes na inibição de activina A, comparada com o tipo selvagem e outras variantes não hiperglicosiladas (**Tabela 19** e Figura 2, painel B), indicando uma ligeira inibição de potência pelos carboidratos adicionais. A **Tabela 19** mostra variantes recombinantes FS315-hFc com uma ou duas seqüências de consenso (Asn-X-Thr/Ser) recém projetadas para N-glicosilação. A ligação das variantes à heparina, miostatina ou ao FcRn foi determinada por ressonância de plásmo de superfície (SPR). As afinidades de ligação foram medidas e relatadas pela constante de dissociação em equilíbrio (K_D).

A heterogeneidade de carga das variantes foi determinada por focalização isoelétrica capilar (cIEF), e mostrada como a faixa de ponto isoelétrico (pI).

Tabela 19. Dados analíticos *in vitro* para variantes de hiperglicosilação de FS-315.

Variantes FS315-hFc	Ligação à heparina KD (nM)	Ligação à Miostatina KD (pM)	Ligação ao FcRn KD (nM)	cIEF (pI)
Tipo selvagem	0,2	20,2	28,3	5,07 - 5,89
K82T	1,4	15,0	13,8	5,29 - 5,93
P85T	0,4	12,4	20,1	5,51 - 6,09
R78N/N80T	0,9	13,0	20,1	5,47 - 6,09
R86N/V88T	1,5	12,7	10,8	5,49 - 6,08
G74N/K76S	0,3	11,6	72,8	5,06 - 5,88
G74N/K76T	0,5	11,1	43,0	5,06 - 5,99
G74N/K76T/P85T	0,3	11,6	29,6	4,86–5,87
K75N/C77T/K82T	3,5	40,3	36,2	4,72 - 5,88
C66A/K75N/C77T	0,3	24,4	27,5	4,81 - 6,47
C66S/K75N/C77T	0,4	26,0	82,8	4,86 - 6,47

[250] Para determinar o efeito da hiperglicosilação sobre os perfis farmacocinéticos, realizamos estudos PK em camundongo usando o tipo selvagem, Δ HBS, a variante não hiperglicosilada K82T, e duas variantes hiperglicosiladas, K75N/C77T/K82T e C66A/K75N/C77T. A variante não hiperglicosilada K82T teve características PK ligeiramente aprimoradas, comparada com o tipo selvagem; no entanto, as duas variantes hiperglicosiladas tiveram perfis farmacocinéticos significativamente aprimorados, comparadas com o tipo selvagem (Figura 6 e **Tabela 11**). A variante

C66A/K75N/C77T mostrou exposição aproximadamente 10 vezes maior, e a variante K75N/C77T/K82T mostrou exposição aproximadamente 17 vezes maior, comparada com o tipo selvagem, que foi similar à variante Δ HBS (**Tabela 11**). A variante K75N/C77T/K82T tinha teor de glicano maior e ligação à heparina *in vitro* menor do que C66A/K75N/C77T, indicando que a modulação tanto da atividade de ligação à heparina quanto do teor de glicosilação poderia ser uma abordagem atrativa para o design de moléculas terapêuticas de FS desejáveis.

Exemplo 11: A dosagem de FS-EEE-mFc resulta em aumentos do peso corporal de uma forma dose-dependente

Folistatina modificada geneticamente e liberação sistêmica resultam em hipertrofia muscular em camundongos do tipo selvagem

[251] Duas moléculas de folistatina modificadas geneticamente foram empregadas em estudos com camundongos C57BL/6 do tipo selvagem e um período de dosagem de 4 semanas. Em um estudo, FS-EEE-mFc (K76, K81, K82 para ácido glutâmico) foi dosada por via intravenosa de 1 a 50 mg/kg. Após dosagem de FS-EEE-mFc, os pesos corporais aumentaram de uma forma dose-dependente (**Fig. 9**, painel A), o que estava ligado a aumentos da massa muscular esquelética (**Fig. 9**, painel B). As concentrações séricas de FS-EEE-mFc foram medidas usando um imunoensaio eletro-quimioluminescente e, como mostrado na **Fig. 9**, painel C, os níveis mínimos de FS-EEE-mFc foram proporcionais à dose de 1 mg/kg a 50 mg/kg. A molécula de FS-EEE-hFc foi avaliada após administração subcutânea e intravenosa. FS-EEE-hFc dosada a 10 mg/kg IV ou 20 mg/kg SC resultou em efeitos similares sobre o peso

corporal em um aumento de 20%, e aumentos individuais da massa muscular variaram de 28% a 44%. FS-EEE-hFc dosada a 50 mg/kg IV ou 100 mg/kg SC resultou em efeitos similares sobre o peso corporal em um aumento de 26% e aumentos individuais da massa muscular variaram de 46% a 69% (**Fig. 9**, painel D e **Fig. 9**, painel E). Os pesos do coração foram normalizados para comprimento da tíbia e foi observado um aumento na proporção coração/tíbia nas doses maiores de FS-EEE-hFc. Amostras de tecido do quadríceps foram examinadas quanto a diferenças morfológicas do tratamento com veículo. Com o uso de microscopia de imunofluorescência, foram observados tamanhos maiores das miofibras após dosagem de FS-EEE-hFc (**Fig. 9**, painel F), comparados com animais dosados com veículo. O diâmetro médio da miofibrila estava aumentado, comparado veículo para FS-EEE-hFc em ambos os níveis de dose (**Fig. 9**, painel G).

O tratamento com folistatina em camundongos mdx resulta em hipertrofia muscular e melhora na função muscular

[252] Para avaliar os efeitos mediante patologia distrófica, foram analisados tecidos tanto do quadríceps quanto do diafragma por análise de lâmina inteira por imunoistoquímica para marcadores de necrose, inflamação e fibrose de tecido. Como um marcador para necrose, um método de IHC para detectar IgG endógena de camundongo com IgG anti-camundongo foi desenvolvido, se beneficiando do acúmulo de IgG na área necrótica, que se liga à glicoproteína rica em histidina (HGP) para formar complexos HGP-IgG que facilitam a depuração da célula necrótica. No músculo *mdx*, como avaliado por detecção de IgG total, IHC de IgG de camundongo marcou com precisão células necróticas, embora áreas de

necrose fossem variáveis em cortes de tecido (**Fig. 10A**) e através de animais (**Fig. 10B**). A fim de considerar melhor a variabilidade, imagens de lâmina inteira foram analisadas para quantificação e números de animais do coorte foram altos para cada grupo (n = 15). Na análise de lâmina inteira do quadríceps, foi obtida uma redução estatisticamente significativa na área de tecido necrótico nas doses de 10 e 30 mg/kg de FS-EEE-mFc, e não para a dose de 3 mg/kg de ActRIIB-mFc. Similar ao achado para áreas de necrose, a coloração para CD68, um marcador para macrófagos pró-inflamatórios tipo M1, revelou áreas espalhadas de coloração positiva (**Fig. 10C**). Em função do baixo nível global de infiltração detectável de macrófagos, quando as imagens de lâmina inteira foram quantificadas para área CD68-positiva, os efeitos do tratamento com o fármaco não atingiram significância (**Fig. 10D**). A detecção de colágeno I foi capaz de identificar 4% de área de coloração positiva no controle de veículo que estava significativamente reduzida tanto na dose de 10 mg/kg quanto na de 30 mg/kg de FS-EEE-mFc e na de 3 mg/kg de ActRIIB (**Fig. 10E e 10F**). O padrão global do tratamento com FS-EEE-mFc no quadríceps *mdx* é consistente com hipertrofia de miofibras em regeneração, preexistentes, centronucleadas. A expansão de células em regeneração resultou em degeneração reduzida, e com tecido necrótico menos danificado, para dirigir a deposição de colágeno na matriz extracelular; FS-EEE-mFc reduziu a fibrose.

[253] Para avaliar os efeitos sobre o músculo distrófico, a molécula de folistatina FS-EEE-mFc foi dosada em camundongos *mdx* de 3 semanas de idade por 12 semanas por administração subcutânea. Foram selecionadas três doses para

FS-EEE-mFc, variando de 3 a 30 mg/kg e comparadas com uma fusão de Fc do receptor de activina recombinante tipo IIB (ActRIIB-mFc) dosado a 3 mg/kg. Os camundongos não foram submetidos a exercício regular e foram avaliados quanto à força de preensão do membro torácico na semana 10 do estudo. Como observado na **Fig. 11A**, os pesos corporais aumentaram para FS-EEEmFc através das doses e variaram de 9% a 25%, comparado com o ActRIIB-mFc em 14%. Os aumentos do músculo esquelético dos membros variaram de 12% a 27% com 3 mg/kg de FS-EEE-mFc até 46% a 59% com 30 mg/kg de FS-EEE-mFc (**Fig. 11B**). Os aumentos nos pesos dos corações e diafragmas foram menores do que os dos músculos dos membros e não foram significativamente diferentes do tratamento com veículo de PBS. Do quadríceps, a área do reto femoral foi quantificada e foram observados aumentos significantes para todos os grupos tratados com fármaco (**Fig. 11C**). Além disso, os tamanhos das miofibras foram quantificadas e o diâmetro médio da miofibrila aumentou mediante tratamento com FS-EEEmFc, comparado com o controle de veículo (**Fig. 11D e Fig. 11E**).

[254] Todas as doses de FS-EEE-mFc restauraram a força de preensão absoluta do membro torácico até um nível maior do que aquele de camundongos C57BL/10 do tipo selvagem, com efeito máximo a 10 mg/kg de FS-EEE-mFc (**Fig. 11F**). Quando normalizado para o peso corporal, tanto 3 mg/kg quanto 10 mg/kg de FS-EEE-mFc aumentaram a força de preensão até um nível maior do que o controle de veículo *mdx* e similar ao nível do tipo selvagem. Os efeitos sobre marcadores circulantes de dano muscular foram medidos. A atividade de creatina-quinase sérica foi altamente variável e a maior dose de FSEEE-mFc resultou na maior redução, comparado com

o tratamento com veículo (**Fig. 11G**). Os níveis de troponina I esquelética estavam reduzidos na maior dose de FS-EEE-mFc, mas os níveis de troponina cardíaca I permaneceram inalterados, em concordância com a maior hipertrofia observada nos músculos dos membros, comparados com o coração.

[255] Para corroborar os resultados de histopatologia, marcadores gênicos para fibrose foram medidos de homogeneizados de tecido do quadríceps. Como observado na **Fig. 10G**, todas as três doses de FS-EEE-mFc reduziram a expressão de genes relacionados à deposição e reticulação de colágeno, *col1A1*, *lox*, *cthrcl* e *acta2*. Os níveis de transcrito não foram reduzidos para *CD68* ou *spp1*, que codifica osteopontina, uma proteína extracelular altamente expressa no músculo distrófico que possui ligação genética com o desenvolvimento de fibrose no modelo *mdx* e severidade da doença DMD. Na análise de mRNA, o grupo de ActRIIB-mFc não exibiu redução e, em alguns casos, aumentaram os níveis de marcadores gênicos para fibrose e inflamação.

[256] No tecido do diafragma, o nível basal de infiltração de macrófagos CD68-positivos foi maior do que no quadríceps, e foram observadas reduções a 10 mg/kg e 30 mg/kg de FS-EEE-mFc e também 3 mg/kg de ActRIIB-mFc (**Fig. 12A e Fig. 12C**). A imunoistoquímica de colágeno I revelou um nível maior de fibrose no diafragma, comparado com quadríceps, a 12% vs. 4% para o controle de veículo em ambos os músculos (**Fig. 12B vs. Fig. 10F**). Diferentemente do quadríceps, no diafragma o teor de colágeno I não foi significativamente alterado mediante tratamento com fármaco. RT-PCR quantitativa de genes envolvidos em fibrose e inflamação mostrou redução na expressão de RNA nas doses de 10 e 30

mg/kg de FS-EEE-mFc (**Figs. 12D**). Similar ao quadríceps, as respostas do transcrito de genes do grupo de ActRIIB-mFc estavam aumentadas para marcadores de fibrose.

Exemplo 12: O tratamento com folistatina de camundongos *mdx* resulta em uma melhora maior na função muscular e patologia do que o tratamento com um antagonista de miostatina

[257] Para comparar os efeitos de folistatina modificada geneticamente com um agente específico para antagonismo de miostatina, foi preparado um anticorpo monoclonal projetado para se ligar especificamente à miostatina. O anticorpo resultante, contendo um Fc de IgG de camundongo, foi comparado com FS-EEE-mFc quanto à habilidade para se ligar aos ligantes miostatina e activina A usando um método de ressonância de plásmon de superfície. Tanto FS-EEE-mFc quanto o anticorpo anti-MST se ligaram miostatina firmemente, com valores de *KD* de 7,5 e 15 pM, respectivamente, enquanto para Activina A, FS-EEE-mFc exibiu uma *KD* de 6,1 pM e o anticorpo anti-MST não exibiu ligação detectável.

[258] A seguir, ambas as moléculas foram comparadas quanto aos efeitos sobre músculo distrófico em camundongos. Nesse estudo, camundongos *mdx* com idade de 5 semanas e submetidos a um regime de exercício regular foram dosados por 12 semanas por administração subcutânea. Duas doses de cada molécula foram selecionadas, 3 e 30 mg/kg, no entanto, com base em uma meia-vida prevista mais longa para o anticorpo, frequência da dosagem de FS-EEE-mFc foi configurada para duas vezes por semana, comparada com uma vez por semana para o anticorpo anti-miostatina.

[259] Foram observados aumentos do peso corporal e da massa muscular com ambas as doses de ambos os agentes (**Fig. 13A e 13B**). A magnitude do aumento do peso corporal e da massa muscular foi maior na dose de 30 mg/kg de FS-EEE-mFc, comparada com 30 mg/kg do anticorpo anti-MST. Na dose de 3 mg/kg, os aumentos do peso corporal e da massa muscular estavam acentuadamente reduzidos, comparada com 30 mg/kg, e a magnitudes dos efeitos para ambos os agentes eram comparáveis. Os pesos do coração, fígado e baço, tanto absolutos quanto normalizados para o peso corporal, não estavam alterados, exceto para um aumento no peso do baço com a dose maior do anticorpo anti-MST (**Fig. 13C**).

[260] Medições funcionais e comportamentais foram registradas após aclimatação do animal à instrumentação, como recomendado para estudos *mdx*. Na força de preensão do membro torácico, ambas as doses de ambos os agentes resultaram em aumentos acima do tratamento com veículo (**Fig. 13D**). A dose de 30 mg/kg de FS-EE-mFc gerou um aumento maior do que 30 mg/kg do anticorpo anti-MST. Após normalização para o peso corporal, os aumentos da força de preensão increases não eram distinguidos do tratamento com veículo. Força tetânica isolada do músculo EDL foi medida ao final do estudo (**Fig. 13E**). Somente as doses de 30 mg/kg de ambos os agentes resultaram em força tetânica aumentada, e o aumento de FS-EEE-mFc foi maior do que o aumento do anticorpo anti-MST. Quando normalizada para área transversal de EDL, a força específica não era distinguível do grupo *mdx* dosado com veículo. A corrida forçada na esteira ergométrica foi examinada e foram observadas reduções na distância de corrida para o grupo de 30 mg/kg de FS-EEE-mFc, bem como para as

ambas as doses do anticorpo anti-MST (**Fig. 13F**). Quando normalizadas para o peso corporal, essas reduções comparadas com veículo foram mantidas.

[261] A análise da CK sérica exibiu um nível maior de variabilidade dentro de grupos que impediu o aparecimento de diferenças significantes entre grupos (**Fig. 13G**). O soro também foi analisado quanto às concentrações de fármaco durante a semana 8 do estudo. Como observado na **Fig. 13H**, proporcionalidade de dose era evidente para ambos os agentes, com as doses de 30 mg/kg resultando em concentrações aproximadamente 10 vezes maiores do que as doses de 3 mg/kg. Embora fosse dosado menos freqüentemente, as concentrações de anticorpo anti-MST foram cerca de 4 vezes maiores do que as de FS-EEE-mFc. Comparando as concentrações séricas com o efeito hipertrófico, na dose de 3 mg/kg, uma concentração sérica 4 vezes menor de FS-EEE-mFc do que o anticorpo anti-MST gerou efeitos similares na massa muscular. Essa tendência foi mais pronunciada na dose de 30 mg/kg, na qual massa muscular maior, aumentos da força de preensão do membro torácico e da força tetânica de EDL foram observados para o FS-EEE-mFc, comparado com o anticorpo anti-MST, apesar de 4 vezes menos do fármaco de FS-EEE-mFc em circulação.

[262] Tecidos do quadríceps e diafragma foram analisados por imunoistoquímica e qPCR quanto a alterações na patologia distrófica. Comparado com o estudo sem exercícios, no estudo com exercícios níveis basais similares de dano muscular do quadríceps e diafragma foram observados nos grupos de controle de veículo. Isso foi surpreendente, considerando os relatos que documentam a piora de necrose muscular de membros e fibrose do diafragma em *mdx* com exercícios vs. sem

exercícios. Uma explicação possível para nossos estudos pode ter sido as diferenças nas idades de início dos animais (3 semanas sem exercícios, 5 semanas com exercícios).

[263] Como observado na **Fig. 14A-C**, comparada com o tratamento com veículo no quadríceps, a dose de 3 mg/kg de ambos os agentes produziu pequenas reduções na necrose e fibrose musculares. A 30 mg/kg, foram observadas reduções maiores na necrose e fibrose para FS-EEE-mFc, comparadas com pequenas reduções para o anticorpo anti-MST. A coloração de macrófagos CD68-positivos não distinguiu grupos de tratamento de controle de veículo, o que pode ter sido limitado pelos níveis baixos de coloração basal desse marcador. A análise de mRNA dos músculos quadríceps contralaterais para marcadores de fibrose e inflamação é mostrada na **Fig. 14D**. Aqui, reduções nos níveis de transcrito não foram observadas para nenhum agente ou dose e, na verdade, vários marcadores exibiram níveis ligeiramente aumentados para o anticorpo anti-MST em dose baixa (*col1A1*, *cthrcl*, CD68) e para a dose alta de FSEEE-mFc (CD68). Para os marcadores de genes de fibrose, uma explicação possível para a diferença entre a IHC de colágeno I e a expressão do gene de *col1A1* é a idade dos animais. Em *mdx*, o período de mionecrose severa nos músculos dos membros, que começa em torno de 3 semanas de idade, se resolve por volta da semana 8 para um estado de dano menos ativo. Os animais tinham mais de 4 meses de idade ao término do estudo, uma idade além da janela de degeneração muscular ativa dos membros que produziria a sinalização pró-inflamatória, pró-fibrótica, necessária para dirigir a deposição de tecido conjuntivo. Como resultado, o efeito antifibrótico de FS-EEE-mFc se

manifestou no nível de proteína, pois as vias dos genes para fibrose que estavam mais ativas na fase inicial do estudo estavam quiescentes ao término do estudo.

[264] No diafragma, comparado com o quadríceps, níveis globais maiores de dano basal do tecido foram observados por IHC (**Fig. 15A-C**, veja também **Fig. 15D**). Ambas as doses do anticorpo anti-MST não mostraram efeitos sobre coloração de CD68 ou colágeno I. Para FS-EEE-mFc, foi observada uma redução qualitativa na infiltração de macrófagos CD68 a 30 mg/kg; no entanto, nenhuma alteração significativa foi observada na coloração de colágeno I. A análise de mRNA revelou níveis menores de transcrito de vários marcadores de inflamação e fibrose para a dose de 30 mg/kg de FS-EEE-mFc, comparada com o tratamento com veículo. A maior redução foi observada para *spp1*, que codifica osteopontina. Foi demonstrado que a redução dos níveis de osteopontina reduz populações de macrófagos pró-inflamatórios em favor de macrófagos pró-regenerativos. Consistente com esse padrão, juntamente com *spp1*, mRNA para CD68 também estava reduzido na dose de 30 mg/kg de FS-EEE-mFc.

EQUIVALENTES E ESCOPO

[265] Aqueles habilitados na técnica reconhecerão, ou serão capazes de verificar usando apenas experimentação de rotina, muitos equivalentes às modalidades específicas da invenção descritas nesse relatório descritivo. O escopo da presente invenção não visa ser limitado à Descrição acima, mas sim é apresentado nas reivindicações seguintes.

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo folistatina recombinante, caracterizado por compreender uma seqüência de aminoácidos pelo menos 80% idêntica ao ID. DE SEQ. Nº 1, ID. DE SEQ. Nº 2, ID. DE SEQ. Nº 3, ID. DE SEQ. Nº 4 ou ID. DE SEQ. Nº 5, em que a proteína folistatina recombinante possui uma seqüência de ligação à heparina (HBS), e em que um ou mais aminoácidos dentro do HBS são substituídos com um aminoácido que possui uma carga menos positiva em comparação com o aminoácido substituído.

2. Polipeptídeo folistatina recombinante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os (um ou mais) aminoácidos dentro do HBS são substituídos com um aminoácido que possui uma carga neutra.

3. Polipeptídeo folistatina recombinante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os (um ou mais) aminoácidos dentro do HBS são substituídos com um aminoácido que possui uma carga negativa.

4. Polipeptídeo folistatina recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que os (um ou mais) aminoácidos compreendem pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 aminoácidos.

5. Polipeptídeo folistatina recombinante, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que os (um ou mais) aminoácidos compreendem 3 aminoácidos.

6. Polipeptídeo folistatina recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo recombinante possui afinidade de ligação à heparina diminuída em comparação com folistatina de ocorrência natural.

7. Polipeptídeo folistatina recombinante, de acordo com

a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o aumento dos números de substituições de aminoácidos dentro do HBS diminui progressivamente a afinidade de ligação à heparina.

8. Polipeptídeo folistatina recombinante, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o número de substituições de aminoácidos dentro do HBS é de 2 aminoácidos.

9. Polipeptídeo folistatina recombinante, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o número de substituições de aminoácidos dentro do HBS é de 3 aminoácidos.

10. Polipeptídeo folistatina recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que as substituições de aminoácidos são feitas no motivo BBXB identificado por resíduos de aminoácidos 81-84 do domínio HBS.

11. Polipeptídeo folistatina recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que as substituições de aminoácidos são feitas no motivo BBXB identificado por resíduos de aminoácidos 75-78 do domínio HBS.

12. Polipeptídeo folistatina recombinante, de acordo com a reivindicação 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que os primeiros dois resíduos de aminoácidos básicos são substituídos com um resíduo de aminoácido que é carregado negativamente ou neutro.

13. Polipeptídeo folistatina recombinante, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que os primeiros dois resíduos de aminoácidos básicos são substituídos com um resíduo de aminoácido que é carregado

negativamente.

14. Polipeptídeo folistatina recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que a proteína folistatina recombinante não se liga à BMP-9 ou BMP-10.

15. Polipeptídeo folistatina recombinante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a proteína folistatina recombinante possui uma seqüência pelo menos 80% idêntica a qualquer um dos IDS. DE SEQ. N^{os} 12-40 ou IDS. DE SEQ. N^{os} 101-106.

16. Polipeptídeo folistatina recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-15, caracterizado por compreender uma seqüência de aminoácidos pelo menos 80% idêntica ao ID. DE SEQ. N^o: 2, ID. DE SEQ. N^o: 4 ou ID. DE SEQ. N^o: 5 e

em que os aminoácidos que correspondem às posições 66 a 88 do ID. DE SEQ. N^o: 2, ID. DE SEQ. N^o: 4 ou ID. DE SEQ. N^o: 5 são idênticos a qualquer um do ID. DE SEQ. N^o: 42-67 ou ID. DE SEQ. N^o: 111-116.

17. Polipeptídeo folistatina recombinante, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a seqüência de aminoácidos que corresponde às posições 66 a 88 do ID. DE SEQ. N^o 2, ID. DE SEQ. N^o 4 ou ID. DE SEQ. N^o 5 são idênticas a qualquer um do ID. DE SEQ. N^o 58-67 ou ID. DE SEQ. N^o 111-113.

18. Polipeptídeo folistatina recombinante, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo folistatina recombinante é um mutante de hiperglicosilação.

19. Polipeptídeo folistatina recombinante,

caracterizado por compreender uma seqüência de aminoácidos pelo menos 80% idêntica ao ID. DE SEQ. N°: 2, ID. DE SEQ. N°: 4 ou ID. DE SEQ. N°: 5 e

que compreende qualquer uma das variações de aminoácidos selecionadas do grupo que consiste em C66S, C66A, G74N, K75E, K75N, K76A, K76D, K76S, K76E, C77S, C77T, R78E, R78N, N80T, K81A, K81D, K82A, K82D, K81E, K82T, K82E, K84E, P85T, R86N, V88E e V88T, ou combinações destas.

20. Polipeptídeo folistatina recombinante, de acordo com a reivindicação 16 ou 19, caracterizado pelo fato de que a seqüência de aminoácidos é pelo menos 90% idêntica ao ID. DE SEQ. N°: 2, ID. DE SEQ. N°: 4 ou ID. DE SEQ. N°: 5.

21. Polipeptídeo folistatina recombinante, de acordo com a reivindicação 16 ou 19, caracterizado pelo fato de que a seqüência de aminoácidos é pelo menos 95% idêntica ao ID. DE SEQ. N°: 2, ID. DE SEQ. N°: 4 ou ID. DE SEQ. N°: 5.

22. Polipeptídeo folistatina recombinante, de acordo com a reivindicação 16 ou 19, caracterizado pelo fato de que a seqüência de aminoácidos é pelo menos 98% idêntica ao ID. DE SEQ. N°: 2, ID. DE SEQ. N°: 4 ou ID. DE SEQ. N°: 5.

23. Polipeptídeo folistatina recombinante, de acordo com a reivindicação 16 ou 19, caracterizado pelo fato de que a seqüência de aminoácidos é 100% idêntica ao ID. DE SEQ. N°: 2, ID. DE SEQ. N°: 4 ou ID. DE SEQ. N°: 5.

24. Polipeptídeo folistatina recombinante, caracterizado por compreender uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste no ID. DE SEQ. N°: 12, ID. DE SEQ. N°: 17-30 e ID. DE SEQ. N°: 32-40.

25. Proteína de fusão de folistatina recombinante, caracterizada por compreender um polipeptídeo folistatina

conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 24 e um domínio Fc de IgG.

26. Proteína de fusão de folistatina recombinante, caracterizada por compreender um polipeptídeo folistatina e um domínio Fc de IgG humana,

em que o polipeptídeo folistatina recombinante compreende uma seqüência de aminoácidos pelo menos 80% idêntica ao ID. DE SEQ. N°: 2, ID. DE SEQ. N°: 4 ou ID. DE SEQ. N°: 5 e

em que os aminoácidos que correspondem às posições 66 a 88 do ID. DE SEQ. N°: 2, ID. DE SEQ. N°: 4 ou ID. DE SEQ. N°: 5 são idênticos ao ID. DE SEQ. N°: 41, 42, 43 ou 58.

27. Proteína de fusão de folistatina recombinante, de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo folistatina recombinante compreende uma seqüência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica ao ID. DE SEQ. N°: 2, ID. DE SEQ. N°: 4 ou ID. DE SEQ. N°: 5.

28. Proteína de fusão de folistatina recombinante, de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo folistatina recombinante compreende uma seqüência de aminoácidos que é pelo menos 95% idêntica ao ID. DE SEQ. N°: 2, ID. DE SEQ. N°: 4 ou ID. DE SEQ. N°: 5.

29. Proteína de fusão de folistatina recombinante, de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo folistatina recombinante compreende uma seqüência de aminoácidos que é pelo menos 98% idêntica ao ID. DE SEQ. N°: 2, ID. DE SEQ. N°: 4 ou ID. DE SEQ. N°: 5.

30. Proteína de fusão de folistatina recombinante, de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo folistatina recombinante compreende uma

seqüência de aminoácidos que é 100% idêntica ao ID. DE SEQ. N°: 2, ID. DE SEQ. N°: 4 ou ID. DE SEQ. N°: 5.

31. Proteína de fusão de folistatina recombinante, caracterizada por compreender um polipeptídeo folistatina e um domínio Fc de IgG,

em que o polipeptídeo folistatina compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada de qualquer um do grupo que consiste no ID. DE SEQ. N°: 12, ID. DE SEQ. N°: 13, e ID. DE SEQ. N°: 15 ao ID. DE SEQ. N°: 40.

32. Proteína de fusão de folistatina recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25-31, caracterizada pelo fato de que o domínio Fc de IgG compreende uma substituição de aminoácido; e

em que a substituição de aminoácido é selecionada do grupo que consiste em L234A, L235A, H433K, N434F, e combinações destas, de acordo com a numeração de EU.

33. Proteína de fusão de folistatina recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 a 31, caracterizada pelo fato de que o domínio Fc de IgG compreende uma seqüência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°6 e

em que a seqüência de aminoácidos compreende uma substituição de aminoácido selecionada do grupo que consiste em L234A, L235A, H433K, N434F, e combinações destas, de acordo com a numeração de EU.

34. Proteína de fusão de folistatina recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 a 31, caracterizada pelo fato de que o domínio Fc de IgG compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste no ID. DE SEQ. N°7 ao ID. DE SEQ. N°: 11.

35. Proteína de fusão de folistatina recombinante, de

acordo com qualquer uma das reivindicações 25 a 31, caracterizada pelo fato de que o domínio Fc de IgG é um domínio Fc de IgG humana.

36. Proteína de fusão de folistatina recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 a 31, caracterizada pelo fato de que o domínio Fc de IgG é um domínio Fc de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4.

37. Proteína de fusão de folistatina recombinante, caracterizada por compreender uma seqüência de aminoácidos de qualquer um do ID. DE SEQ. N°73 ao ID. DE SEQ. N°: 100, ID. DE SEQ. N° 117 ou ID. DE SEQ. N° 118.

38. Proteína de fusão de folistatina recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 a 37, caracterizada pelo fato de que a proteína se liga à miostatina com uma constante de dissociação de afinidade (K_D) de 1 a 100 pM.

39. Proteína de fusão de folistatina recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 a 37, caracterizada pelo fato de que a proteína se liga à activina A com uma constante de dissociação de afinidade (K_D) de 1 a 100 pM.

40. Proteína de fusão de folistatina recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 a 37, caracterizada pelo fato de que a proteína não se liga à proteína morfogênica óssea-9 (BMP-9) e/ou proteína morfogênica óssea-10 (BMP-10) na faixa de 0,2 nM a 25 nM.

41. Proteína de fusão de folistatina recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 a 37, caracterizada pelo fato de que a proteína se liga à heparina com uma constante de dissociação de afinidade (K_D) de 0,1 a

>25 nM.

42. Proteína de fusão de folistatina recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 a 37, caracterizada pelo fato de que a proteína se liga ao receptor FcRn com uma constante de dissociação de afinidade (K_D) de 25 a 400 nM.

43. Proteína de fusão de folistatina recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 a 37, caracterizada pelo fato de que a proteína inibe miostatina em uma IC_{50} de 0,1 a 10 nM.

44. Proteína de fusão de folistatina recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 a 37, caracterizada pelo fato de que a proteína inibe activina A em uma IC_{50} de 0,1 a 10 nM.

45. Proteína de fusão de folistatina recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 a 37, caracterizada pelo fato de que a proteína de fusão de proteína folistatina recombinante possui meia-vida aumentada em comparação com folistatina do tipo selvagem.

46. Composição farmacêutica, caracterizada por compreender a proteína de fusão de folistatina recombinante conforme definida em qualquer uma das reivindicações 25-45 e um carreador farmacêuticamente aceitável.

47. Polinucleotídeo, caracterizado por compreender uma sequência de nucleotídeos que codifica o polipeptídeo folistatina recombinante conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1-24.

48. Polinucleotídeo, caracterizado por compreender uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína de fusão de folistatina recombinante conforme definida em qualquer

uma das reivindicações 25-37.

49. Vetor de expressão, caracterizado por compreender o polinucleotídeo conforme definido na reivindicação 47 ou 48.

50. Célula hospedeira, caracterizada por compreender um polinucleotídeo conforme definido na reivindicação 47 ou 48 ou um vetor de expressão conforme definido na reivindicação 30.

51. Método de produção de uma proteína de fusão de folistatina recombinante que se liga especificamente à miostatina, caracterizado por compreender o cultivo da célula hospedeira conforme definido na reivindicação 50.

52. Célula de hibridoma, caracterizada por produzir um polipeptídeo folistatina recombinante conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1-17 ou uma proteína de fusão de folistatina recombinante conforme definido em qualquer uma das reivindicações 25-37.

53. Método de tratamento de Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), o método caracterizado por compreender:

a administração a um indivíduo que sofre ou suscetível à DMD de uma quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante conforme definido em qualquer uma das reivindicações 25-37 ou da composição farmacêutica conforme definida na reivindicação 38, de modo que pelo menos um sintoma ou característica de DMD seja reduzido em intensidade, severidade ou frequência, ou tenha o surgimento retardado.

54. Método, de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que o método ainda compreende a administração de indivíduo de um ou mais agentes terapêuticos

adicionais.

55. Método, de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo fato de que os (um ou mais) agentes terapêuticos adicionais são selecionados do grupo que consiste em um anticorpo anti-Flt-1 ou fragmento deste, edasalonexent, pamrevlumab, prednisona, deflazacort, produtos terapêuticos de modulação de RNA, produtos terapêuticos para uso alternativo de éxon e terapia gênica.

56. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 55, caracterizado pelo fato de que uma quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é administrada parenteralmente.

57. Método, de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que a administração parenteral é selecionada do grupo que consiste em administração intravenosa, intradérmica, intratecal, por inalação, transdérmica (tópica), intra-ocular, intramuscular, subcutânea, transmucosa, ou combinações destas.

58. Método, de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que a administração parenteral é administração intravenosa.

59. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 58, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é entre cerca de 1 mg/kg e 50 mg/kg administrada por via intravenosa.

60. Método, de acordo com a reivindicação 59, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é entre cerca de 8 mg/kg e 15 mg/kg administrada por via intravenosa.

61. Método, de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é pelo menos cerca de 8 mg/kg.

62. Método, de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é pelo menos cerca de 10 mg/kg.

63. Método, de acordo com a reivindicação 59, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é pelo menos cerca de 50 mg/kg.

64. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 58 a 63, caracterizado pelo fato de que a administração intravenosa ocorre uma vez por mês.

65. Método, de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que a administração parenteral é administração subcutânea.

66. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 58, ou 65, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é entre cerca de 2 mg/kg e 100 mg/kg administrada por via subcutânea.

67. Método, de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é entre cerca de 3 mg/kg e 30 mg/kg administrada por via subcutânea.

68. Método, de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é entre cerca

de 2 mg/kg e 5 mg/kg administrada por via subcutânea.

69. Método, de acordo com a reivindicação 68, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é pelo menos cerca de 2 mg/kg.

70. Método, de acordo com a reivindicação 69, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é pelo menos cerca de 3 mg/kg.

71. Método, de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz de proteína de fusão de folistatina recombinante é pelo menos cerca de 30 mg/kg.

72. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 66 a 71, caracterizado pelo fato de que a administração subcutânea ocorre uma vez por semana.

73. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57 a 72, caracterizado pelo fato de que a administração de proteína de fusão de folistatina recombinante é proporcional à dose.

74. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57 a 72, caracterizado pelo fato de que a administração de proteína de fusão de folistatina recombinante é dose linear.

75. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 74, caracterizado pelo fato de que a proteína de fusão de folistatina recombinante é liberada a um ou mais músculos esqueléticos selecionados da Tabela 1.

76. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 75, caracterizado pelo fato de que a

administração da proteína de fusão de folistatina recombinante resulta em um aumento na massa de um músculo em relação a um controle.

77. Método, de acordo com a reivindicação 76, caracterizado pelo fato de que o músculo é um ou mais músculos esqueléticos selecionados da Tabela 1.

78. Método, de acordo com a reivindicação 77, caracterizado pelo fato de que o músculo é selecionado do grupo que consiste em diafragma, tríceps, solear, tibial anterior, gastrocnêmio, extensor digital longo, reto abdominal, quadríceps, e combinações destes.

79. Método, de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de que o músculo é o músculo gastrocnêmio.

80. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 76 a 79, caracterizado pelo fato de que o aumento na massa do músculo é um aumento de pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200% ou 500% em relação a um controle.

81. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 80, caracterizado pelo fato de que a administração da proteína de fusão de folistatina recombinante resulta em regeneração muscular, força muscular aumentada, flexibilidade aumentada, amplitude de movimento aumentada, energia aumentada, fadigabilidade reduzida, fluxo sanguíneo aumentado, cognição aprimorada, função pulmonar melhorada, inibição da inflamação, fibrose muscular reduzida, necrose muscular reduzida e/ou peso corporal aumentado.

82. Método, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 53 a 80, caracterizado pelo fato de que o (pelo menos um) sintoma ou característica de DMD é selecionado do grupo que consiste em perda muscular, fraqueza muscular, fragilidade muscular, necrose muscular, fibrose muscular, contratura articular, deformação esquelética, cardiomiopatia, dificuldade na deglutição, função alterada do intestino e da bexiga, isquemia muscular, déficit cognitivo, disfunção comportamental, dificuldade na socialização, escoliose e alteração da função respiratória.

83. Método para inibição de miostatina e/ou activina em um indivíduo, o método caracterizado por compreender:

a administração um indivíduo de uma composição que compreende uma quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante conforme definida em qualquer uma das reivindicações 25-37.

84. Método, de acordo com a reivindicação 83, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é entre cerca de 1 mg/kg e 50 mg/kg administrada por via intravenosa.

85. Método, de acordo com a reivindicação 84, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é entre cerca de 8 mg/kg e 15 mg/kg administrada por via intravenosa.

86. Método, de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é pelo menos cerca de 8 mg/kg.

87. Método, de acordo com a reivindicação 86, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é pelo menos

cerca de 10 mg/kg.

88. Método, de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é pelo menos cerca de 50 mg/kg.

89. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 84 a 88, caracterizado pelo fato de que a administração intravenosa ocorre uma vez por mês.

90. Método, de acordo com a reivindicação 83, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é entre cerca de 2 mg/kg e 100 mg/kg administrada por via subcutânea.

91. Método, de acordo com a reivindicação 90, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é entre cerca de 3 mg/kg e 30 mg/kg administrada por via subcutânea.

92. Método, de acordo com a reivindicação 90, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é entre cerca de 2 mg/kg e 5 mg/kg administrada por via subcutânea.

93. Método, de acordo com a reivindicação 92, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é pelo menos cerca de 2 mg/kg.

94. Método, de acordo com a reivindicação 93, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz da proteína de fusão de folistatina recombinante é pelo menos cerca de 3 mg/kg.

95. Método, de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que a quantidade eficaz da

proteína de fusão de folistatina recombinante é pelo menos cerca de 30 mg/kg administrada por via subcutânea.

96. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 90 a 95, caracterizado pelo fato de que a administração subcutânea ocorre uma vez por semana.

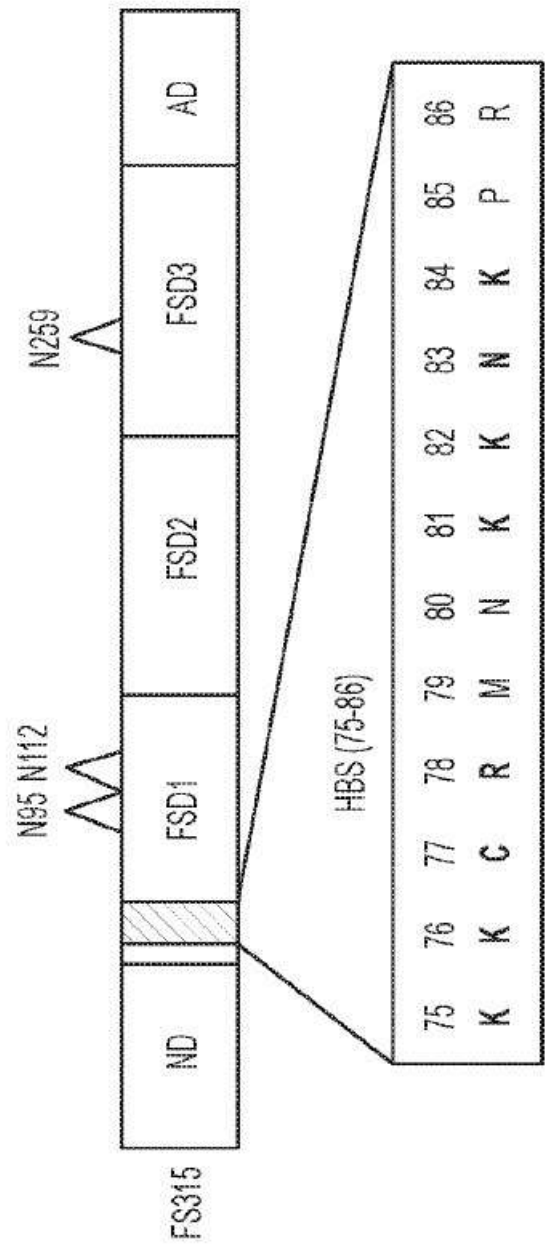


FIGURA 1

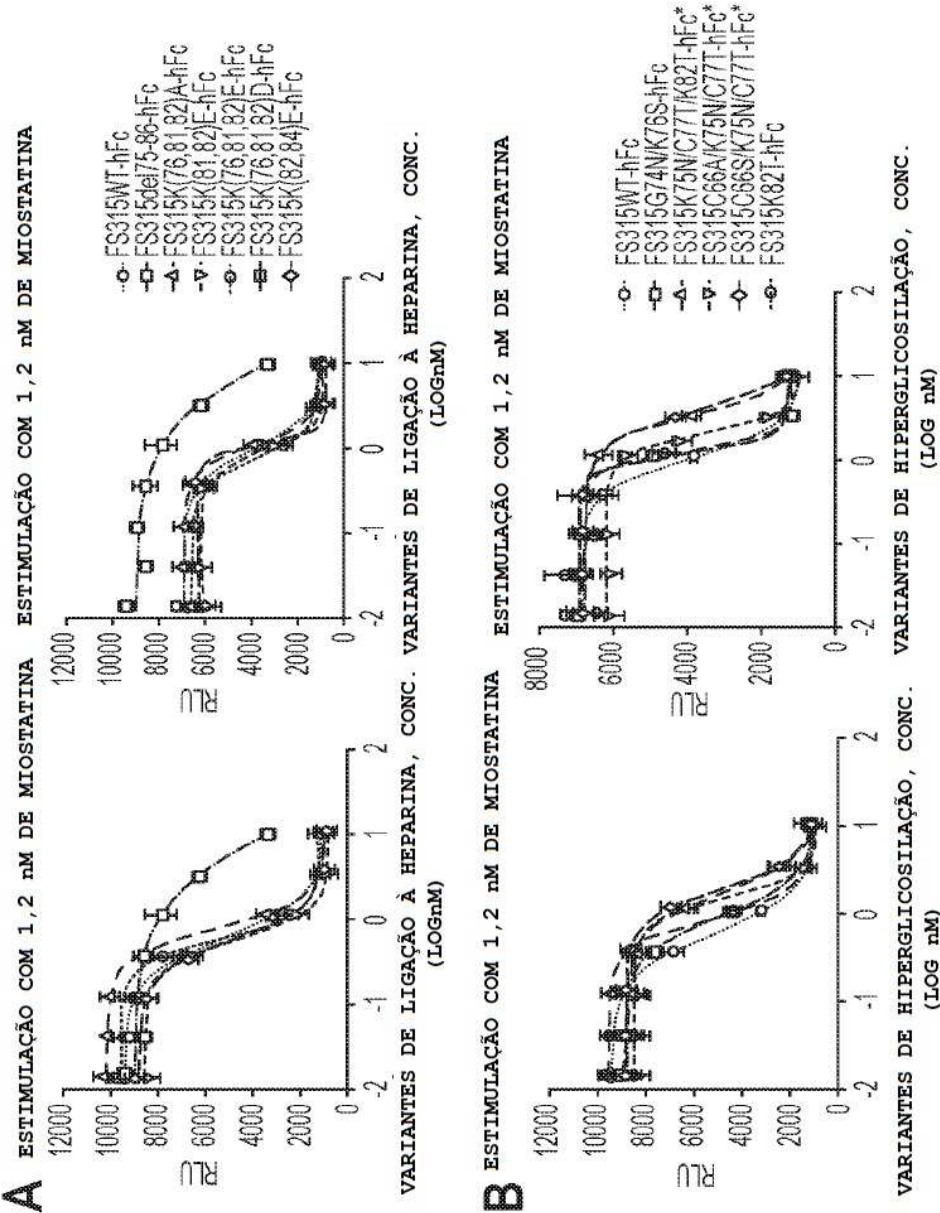


FIGURA 2

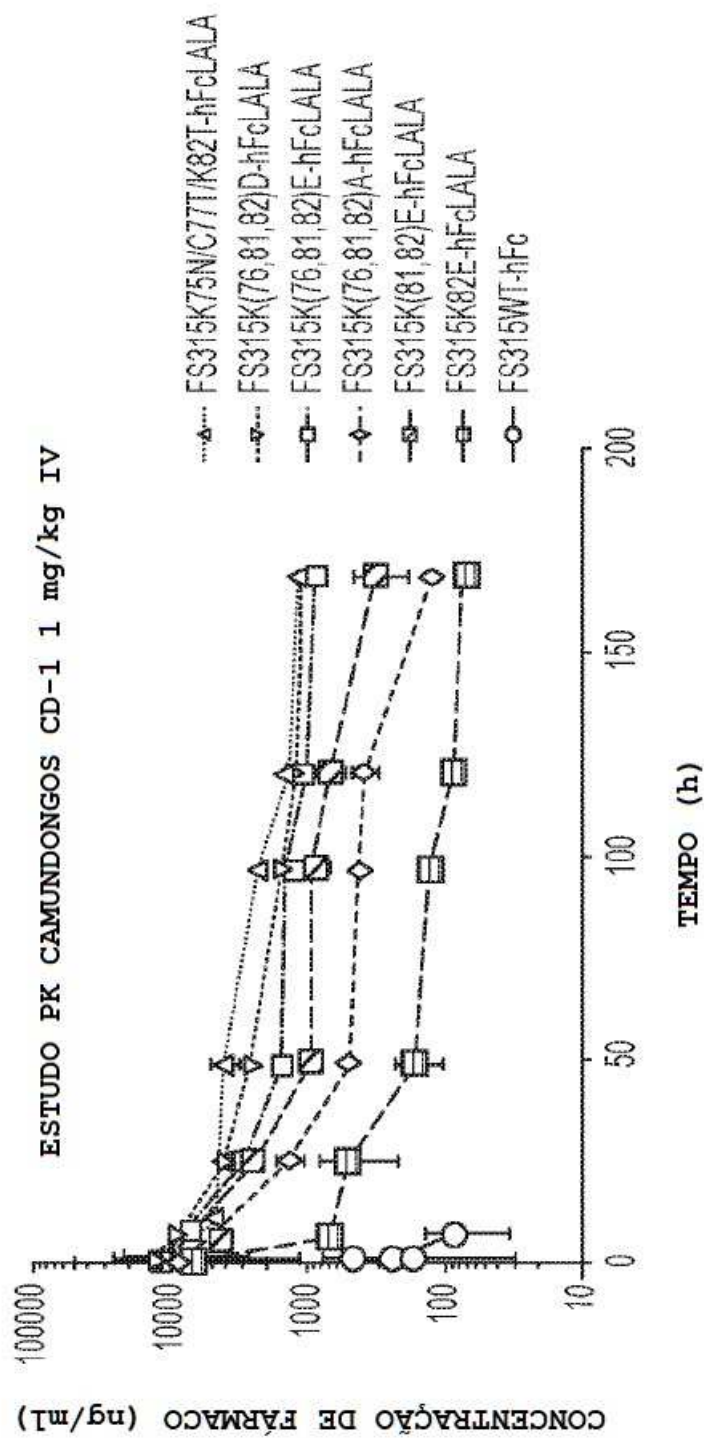


FIGURA 3A

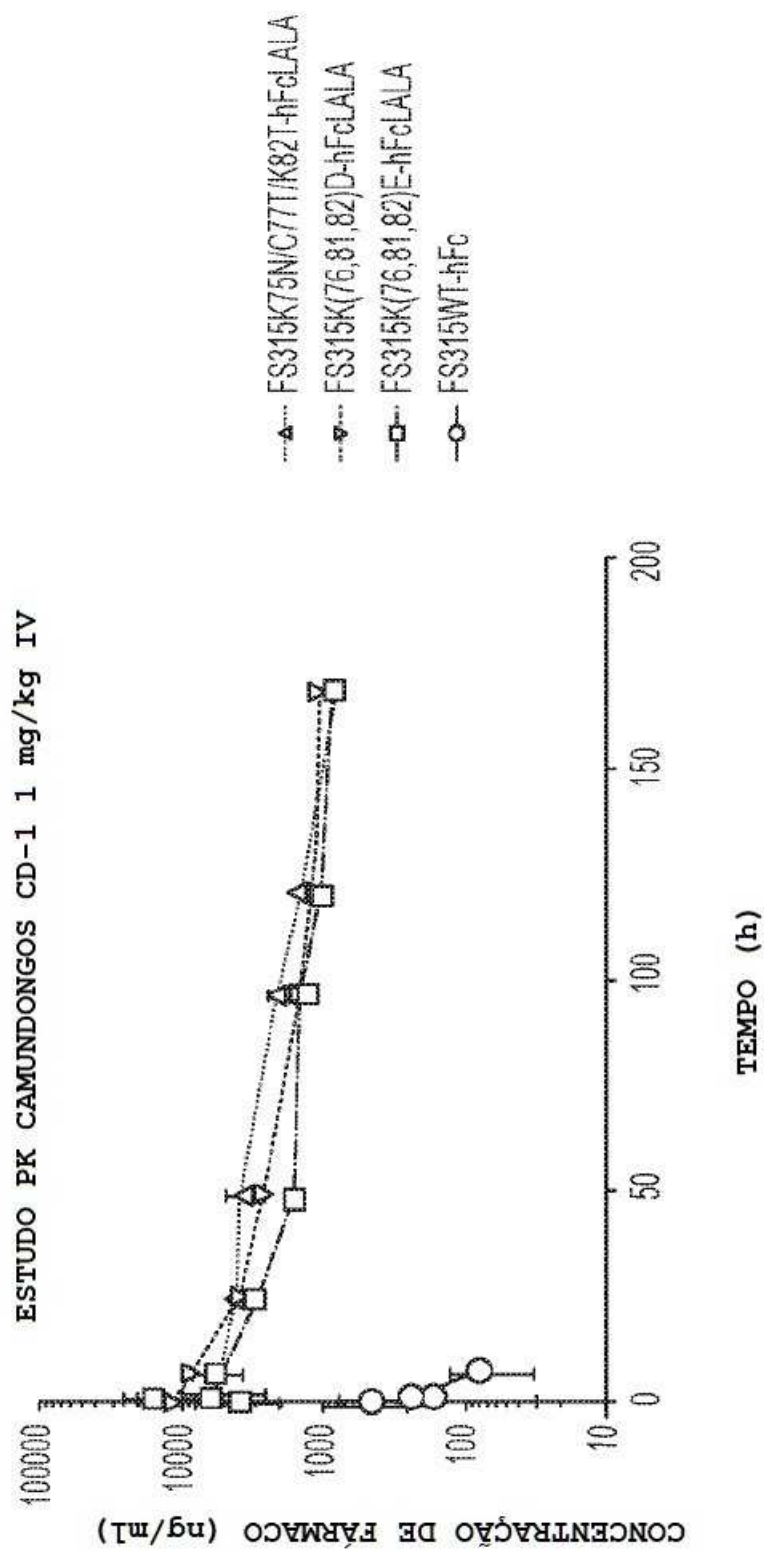
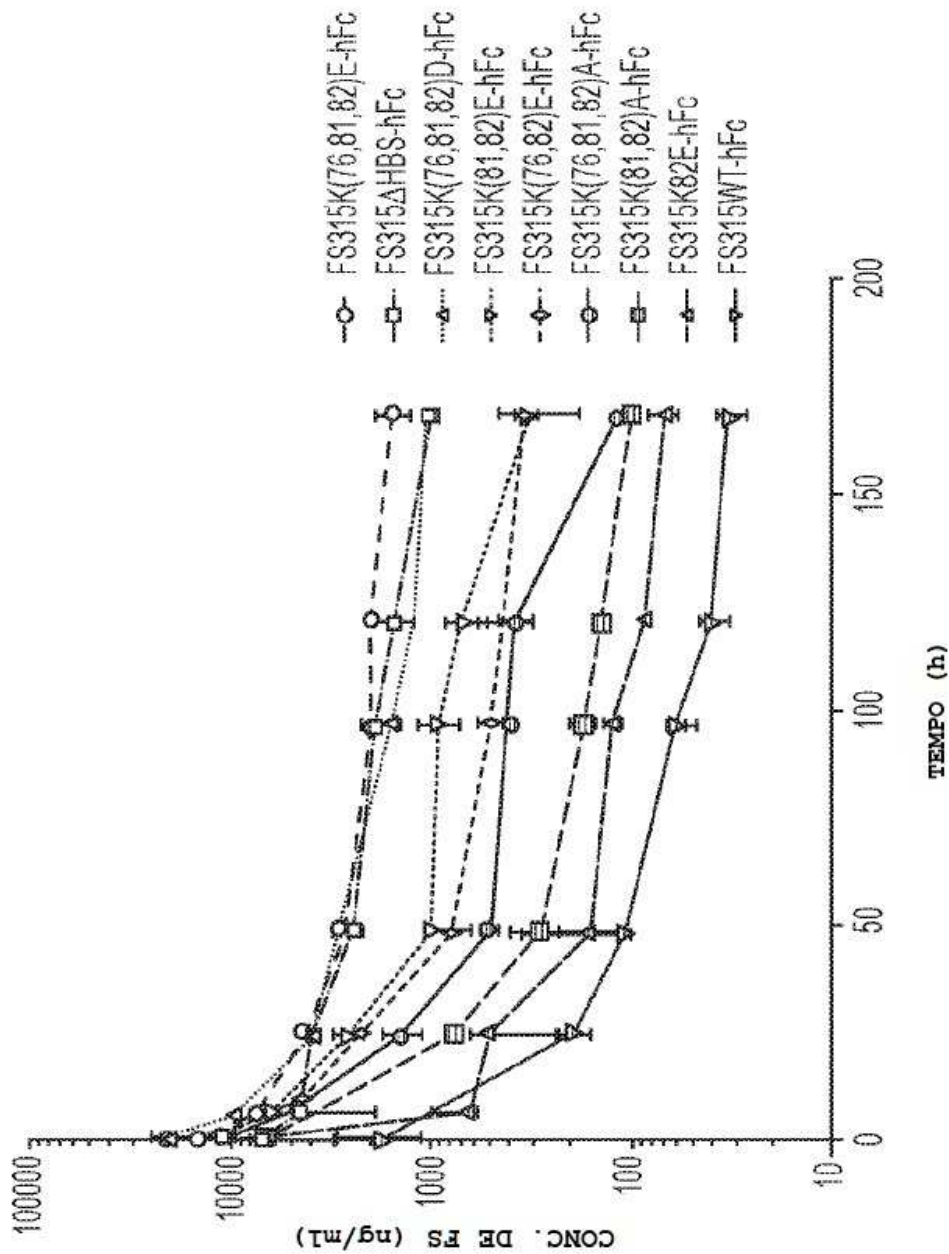


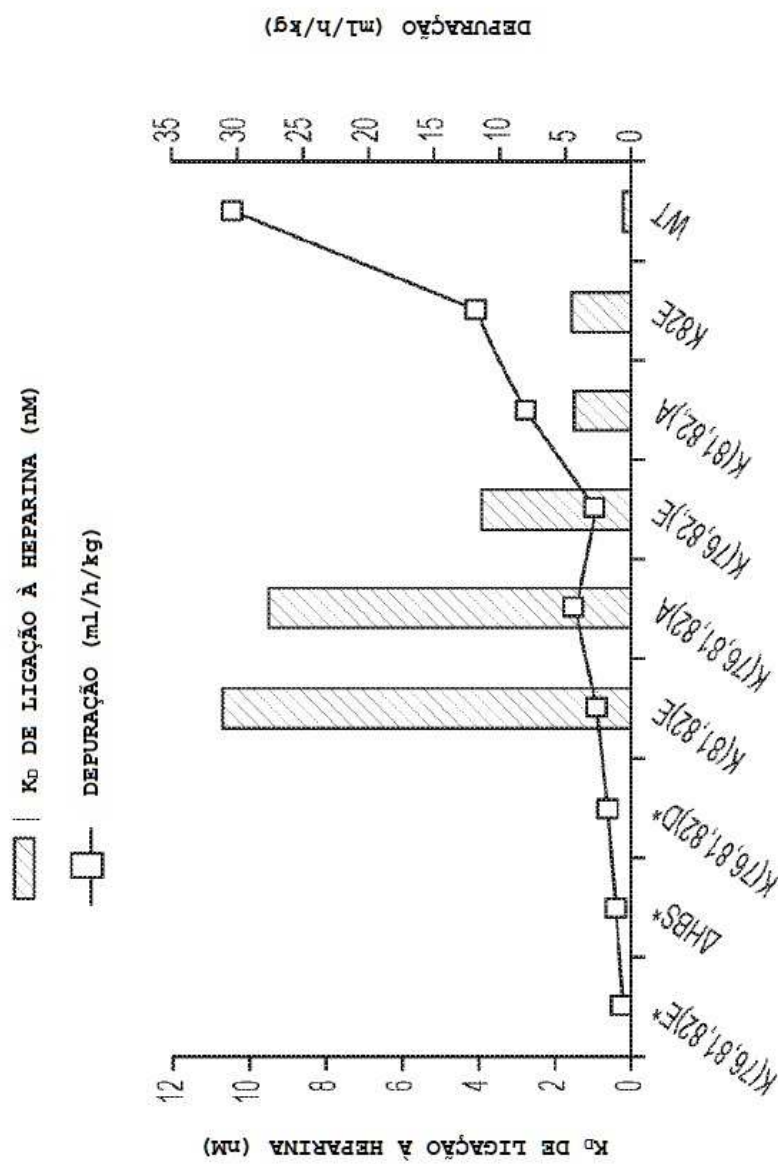
FIGURA 3B



KD DE LIGAÇÃO À HEPARINA (nM)	
ND*	FRACA
ND*	
ND*	
10.7	MÉDIA
3.9	
9.4	
1.5	FORTE
1.5	
0.2	

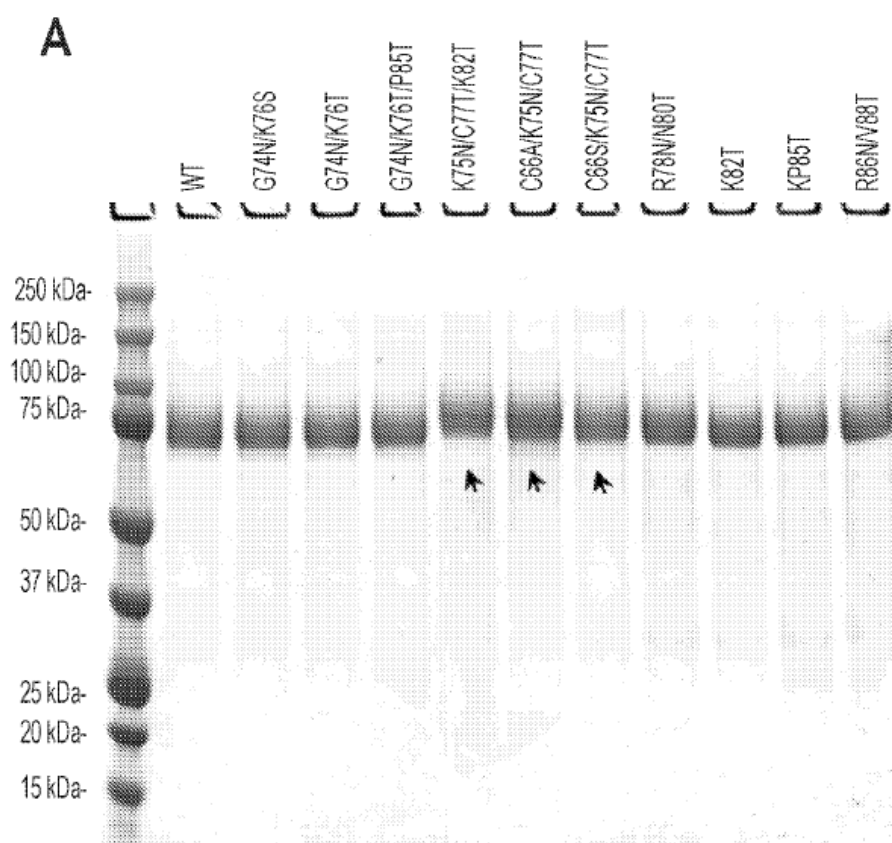
* SEM LIGAÇÃO DETECTÁVEL
NA FAIXA TESTADA

FIGURA 4A



*: SEM LIGAÇÃO À HEPARINA DETECTÁVEL NA FAIXA TESTADA
(0,019 nM-25 nM) PARA VARIANTES DE FS

FIGURA 4B

**FIGURA 5A**

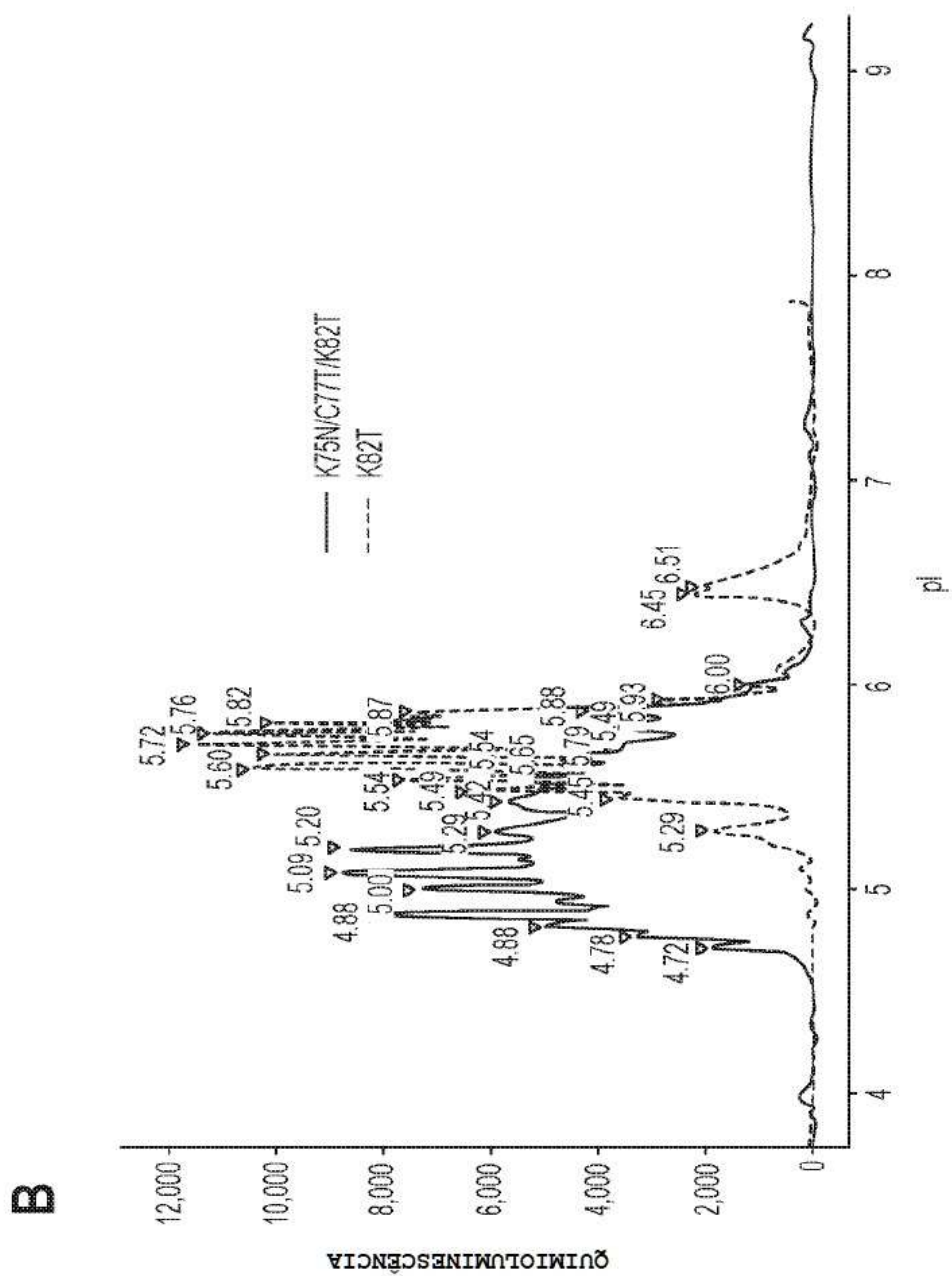


FIGURA 5B

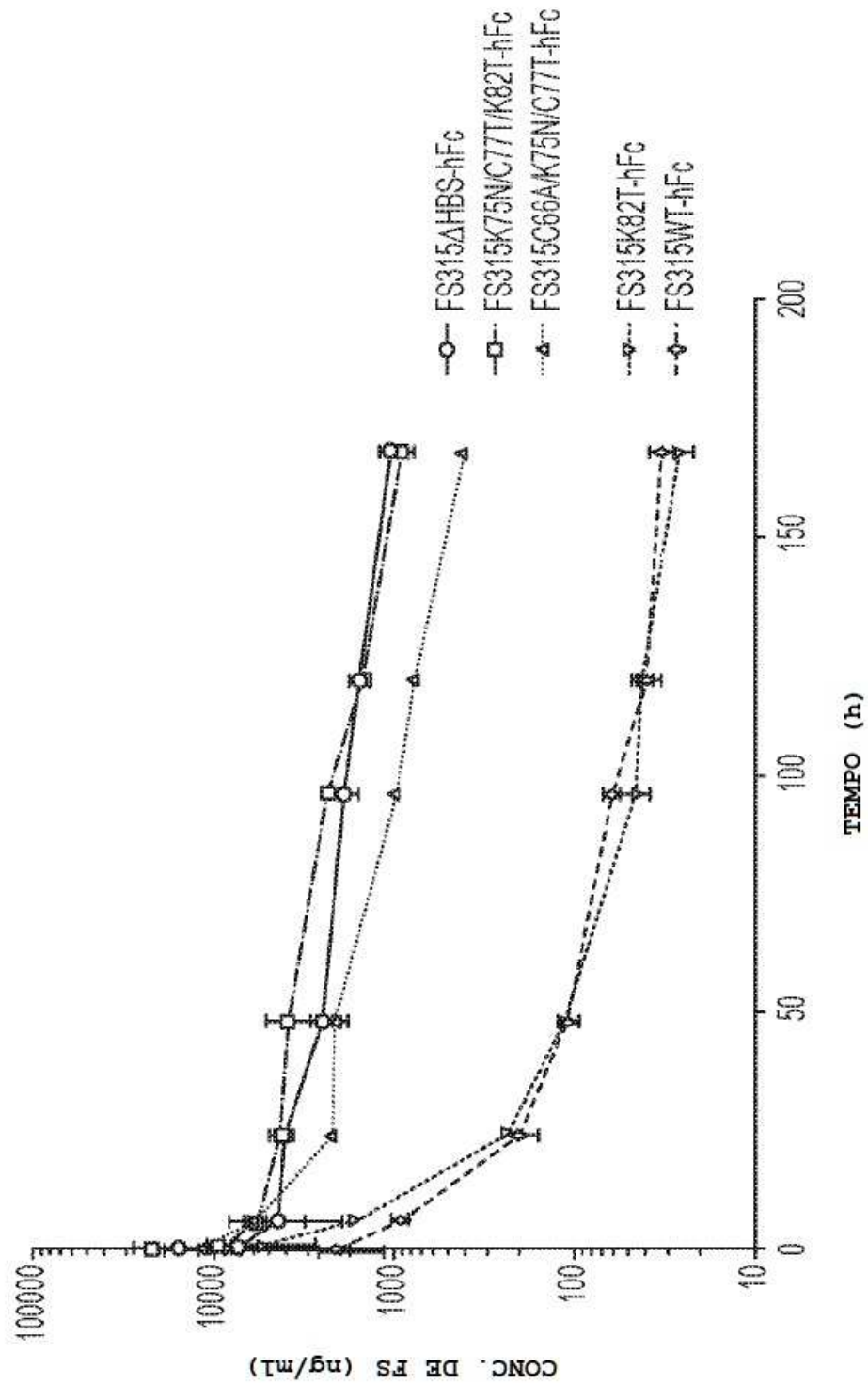


FIGURA 6

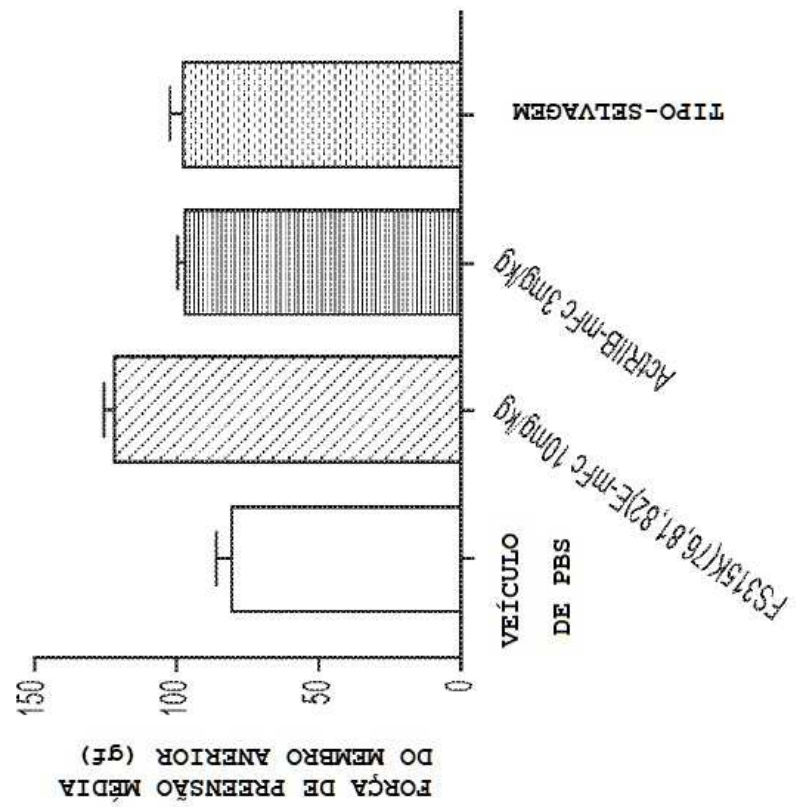


FIGURA 7

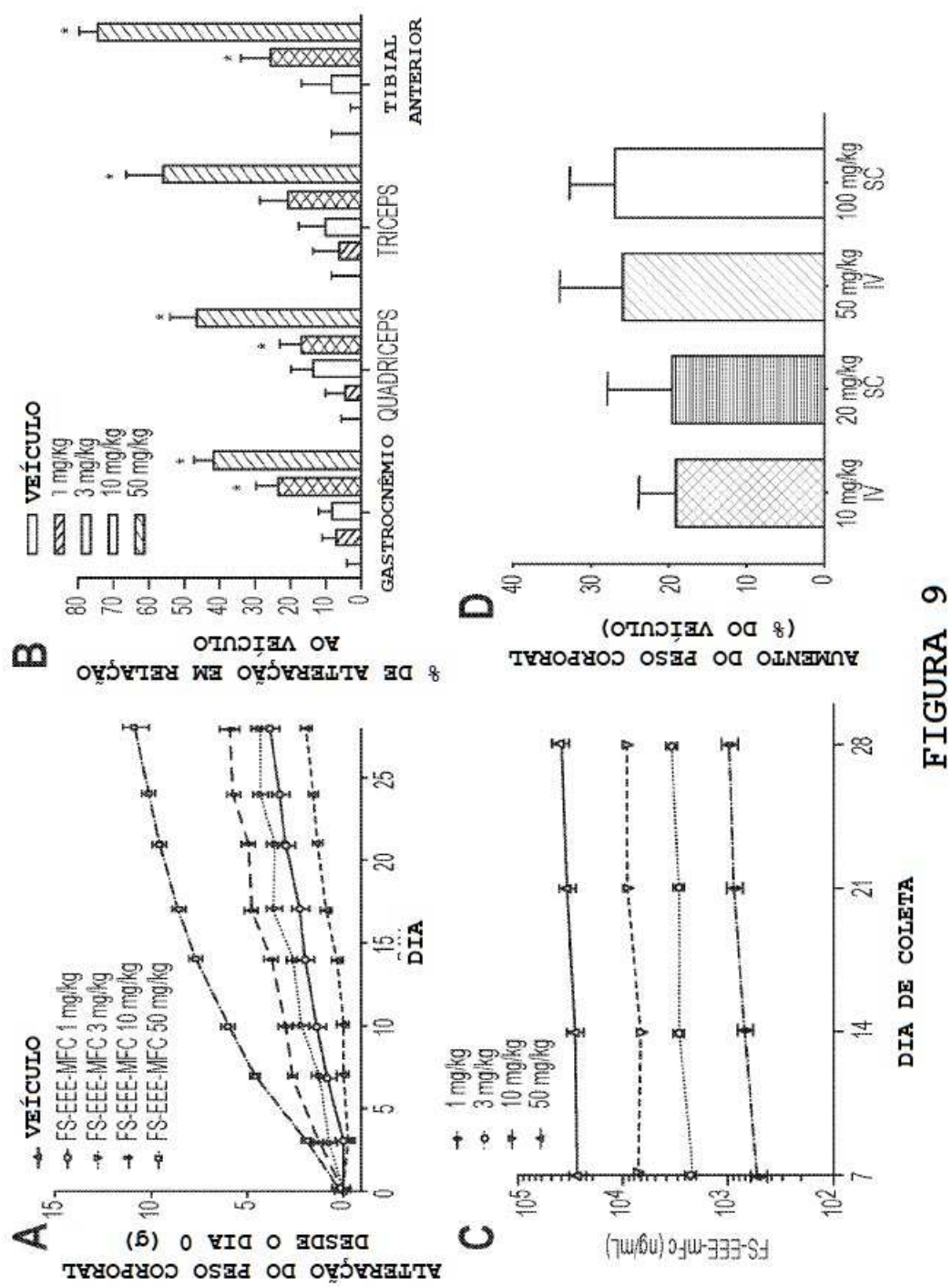
VARIANTE FS315-HFC		73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
TIPO SELVAGEM																	
ΔHBS		P	G	K	K	T	C	V	M	N	K	N	K	P	R	C	V
del75-86		P	G	S	T	C	V	V	V	D				A	Y	C	V
K82E		P	G	K	K	C	R	R	M	N	E	N	K	P	R	C	V
K84E		P	G	K	K	C	R	R	M	N	K	N	E	P	R	C	V
K(75,76)E		P	G	E	E	C	R	R	M	N	K	N	K	P	R	C	V
K(76,82)E		P	G	K	E	C	R	R	M	N	E	N	K	P	R	C	V
K(76,84)E		P	G	K	E	C	R	R	M	N	K	N	E	P	R	C	V
R78E/K82E		P	G	K	K	C	E	E	M	N	K	N	E	P	R	C	V
R78E/K84E		P	G	K	K	C	E	E	M	N	K	N	E	P	R	C	V
K(81,82)A		P	G	K	K	C	R	R	M	N	A	N	K	P	R	C	V
K(81,82)E		P	G	K	K	C	R	R	M	N	E	N	K	P	R	C	V
K(81,82)D		P	G	K	K	C	R	R	M	N	D	N	K	P	R	C	V
K(82,84)E		P	P	K	K	C	R	R	M	N	K	N	E	P	R	C	V
K(76,82,84)E		P	G	K	E	C	R	R	M	N	K	N	E	P	R	C	V
K(76,81,82)A		P	G	K	A	C	R	R	M	N	A	N	K	P	R	C	V
K(76,81,82)E		P	G	K	E	C	R	R	M	N	E	N	K	P	R	C	V
K(76,81,82)D		P	G	K	D	C	R	R	M	N	D	N	K	P	R	C	V

FIGURA 8A

*: RESÍDUOS DE ASPARAGINA PARA HIPERGLICOSILAÇÃO

VARIANTE FS315-HFC	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
TIPO SELVAGEM	C	E	N	V	D	C	G	P	G	K	K	C	R	M	N	K	K	N	K	P	R	C	V
K82T	C	E	N	V	D	C	G	P	G	K	K	C	R	M	N	K	I	N	K	P	R	C	V
P85T	C	E	N	V	D	C	G	P	G	K	K	C	R	M	N	K	K	N	K	I	R	C	V
R78N/N80T	C	E	N	V	D	C	G	P	G	K	K	C	R	M	N	K	K	N	K	P	R	C	V
R86N/N88T	C	E	N	V	D	C	G	P	G	K	K	C	R	M	N	K	K	N	K	P	R	C	V
G74N/K76S	C	E	N	V	D	C	G	P	N*	K	S	C	R	M	N	K	K	N	K	P	R	C	V
G74N/K76T	C	E	N	V	D	C	G	P	N*	K	I	C	R	M	N	K	K	N	K	P	R	C	V
G74N/K76T/P85T	C	E	N	V	D	C	G	P	N*	K	I	C	R	M	N	K	K	N	K	I	R	C	V
K75N/C77/K82T	C	E	N	V	D	C	G	P	G	N*	K	I	R	M	N	K	I	N	K	P	R	C	V
C66A/K75N/C77T	A	E	N	V	D	C	G	P	G	N*	K	I	R	M	N	K	K	N	K	P	R	C	V
C66S/K75N/C77T	S	E	N	V	D	C	G	P	G	N*	K	I	R	M	N	K	K	N	K	P	R	C	V

FIGURA 8B



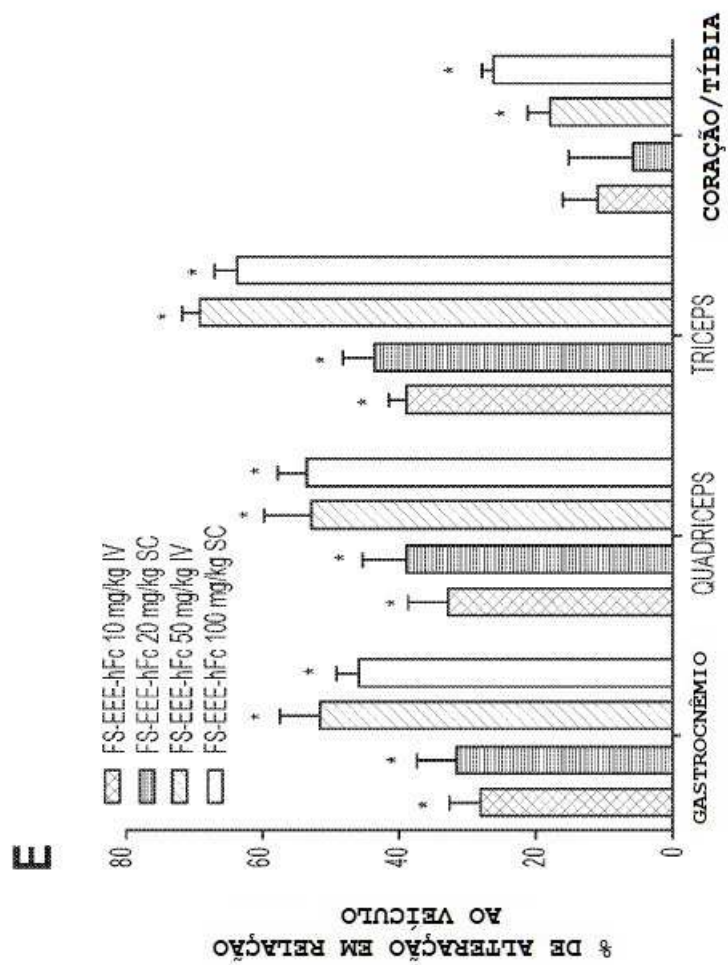


FIGURA 9 (CONTINUAÇÃO)

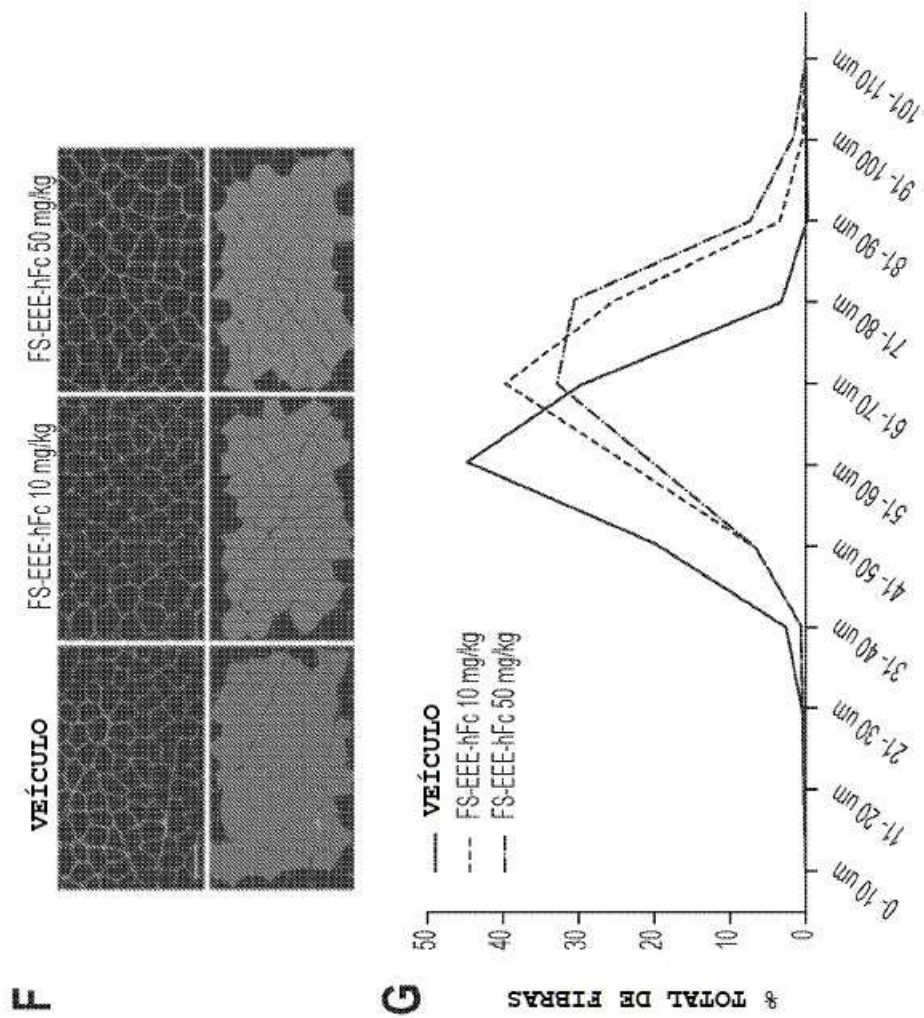


FIGURA 9 (CONTINUAÇÃO)

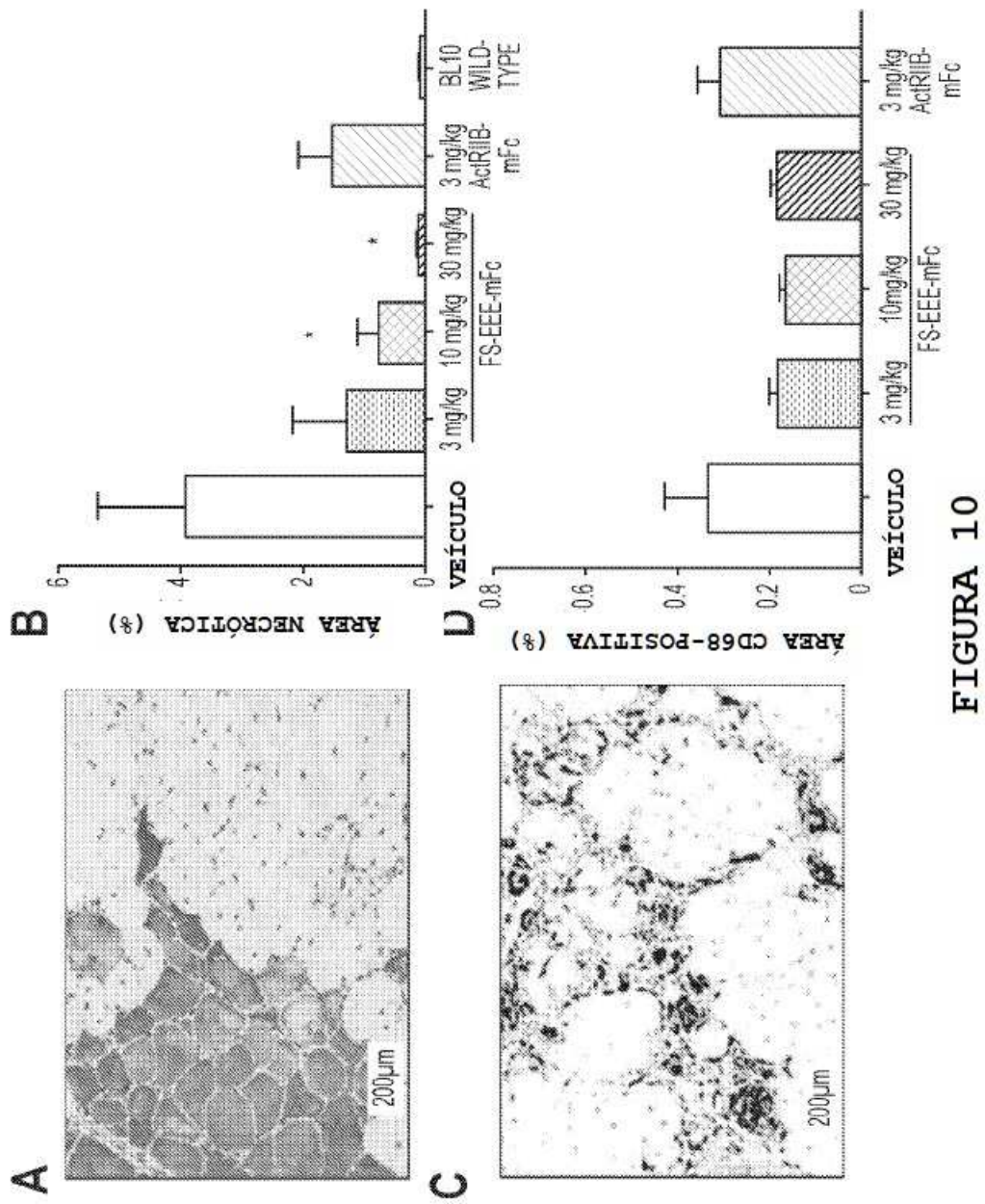


FIGURA 10

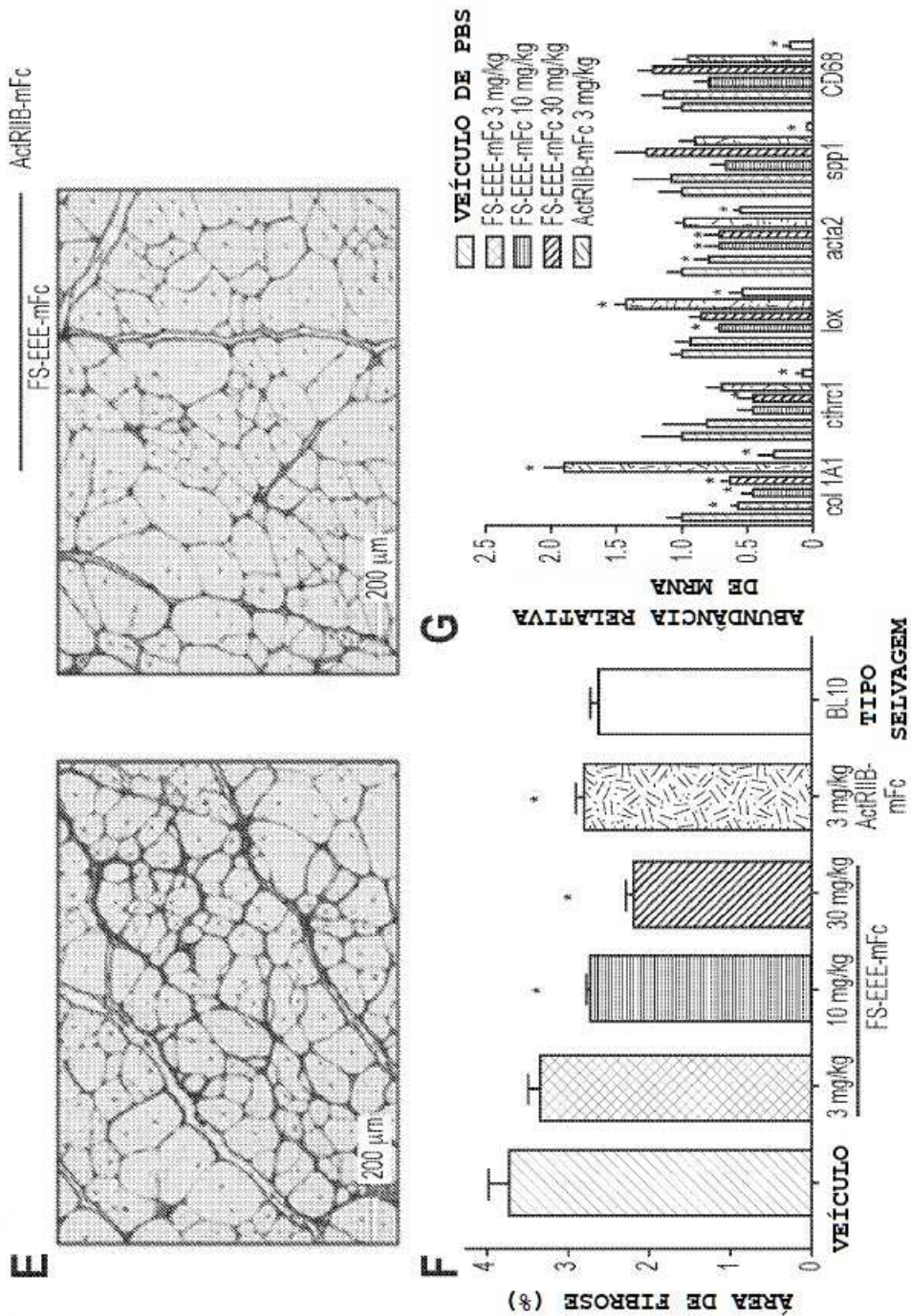
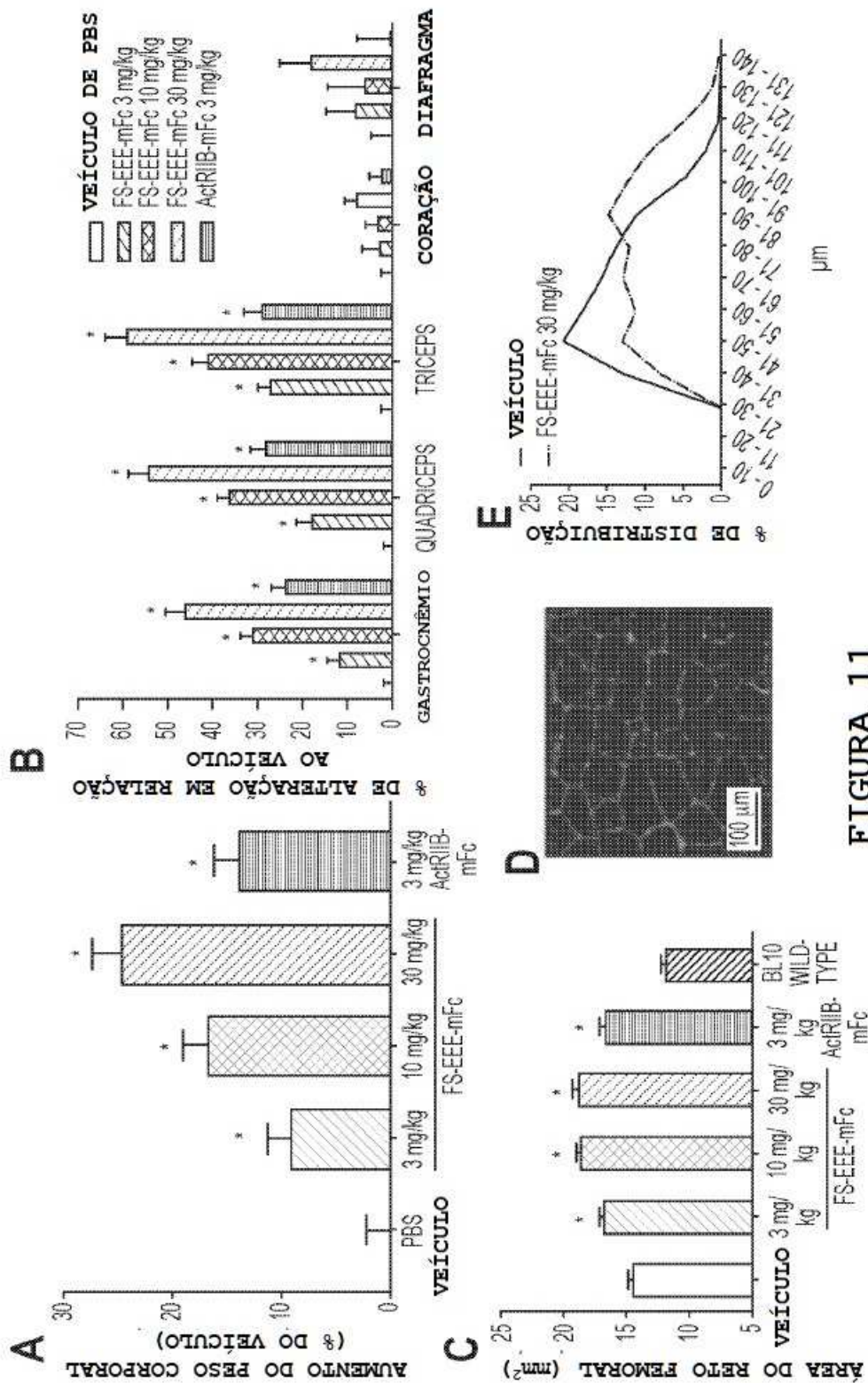


FIGURA 10 (CONTINUAÇÃO)



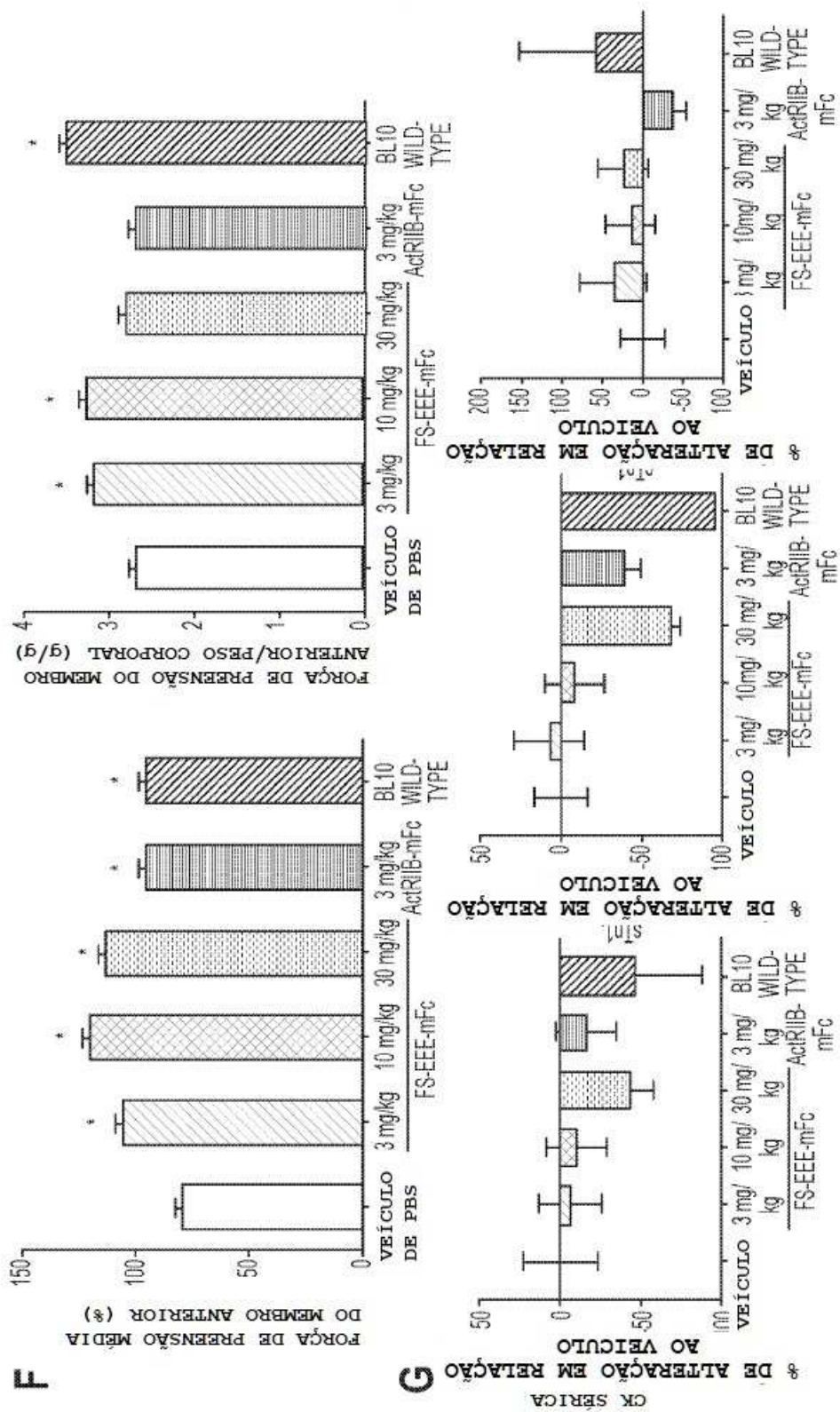


FIGURA 11 (CONTINUAÇÃO)

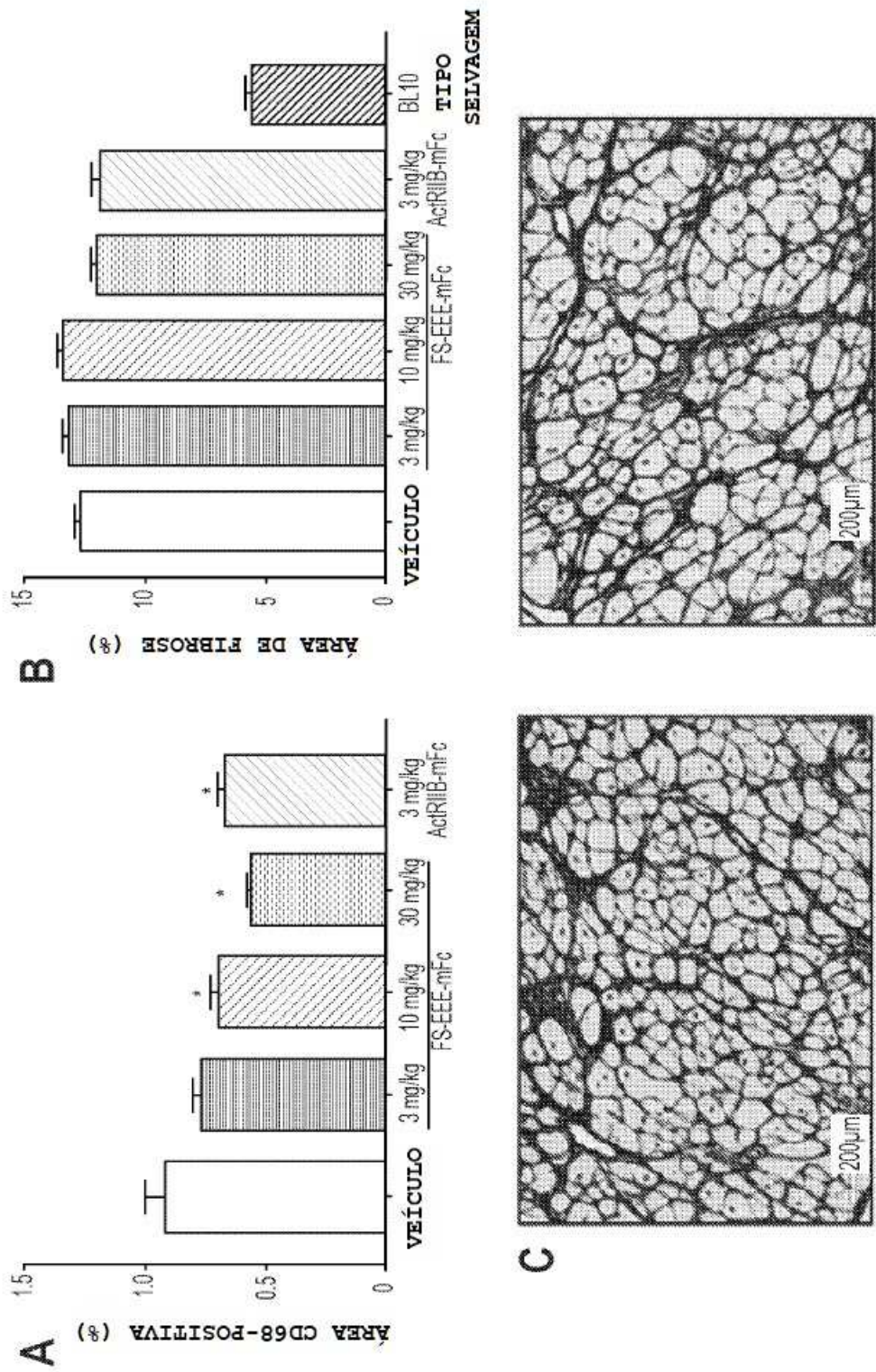


FIGURA 12

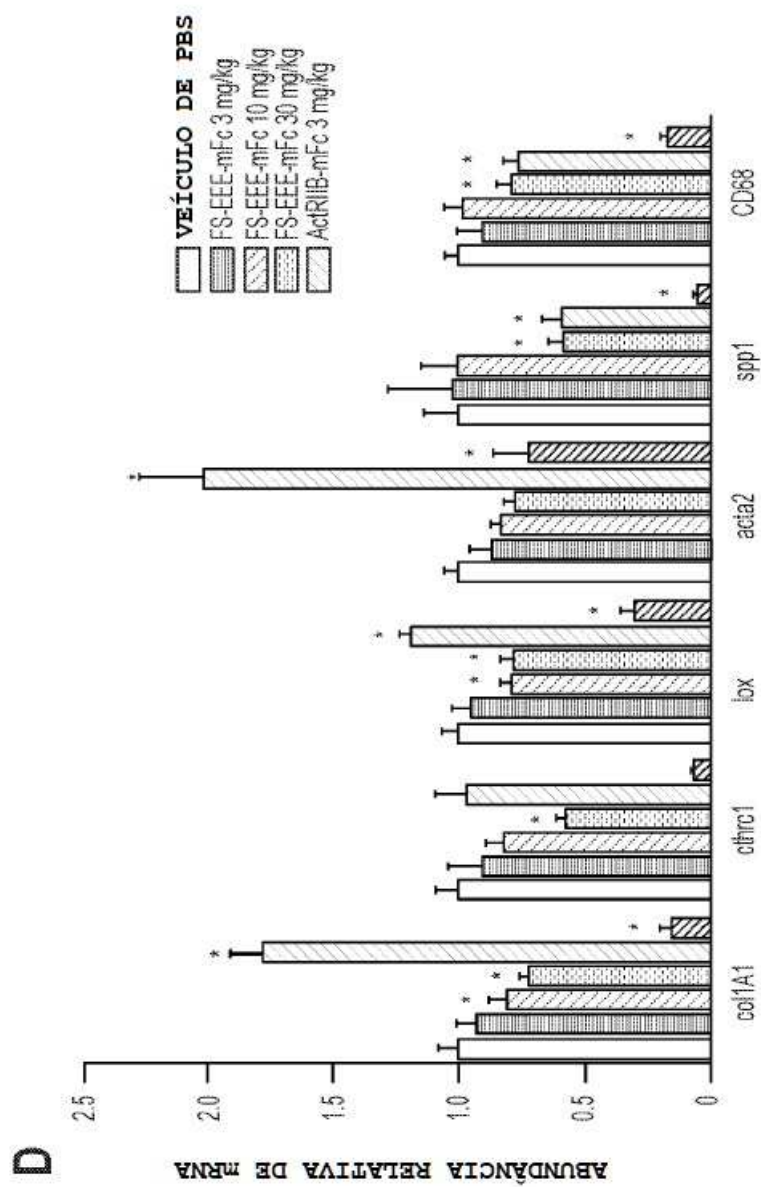


FIGURA 12 (CONTINUAÇÃO)

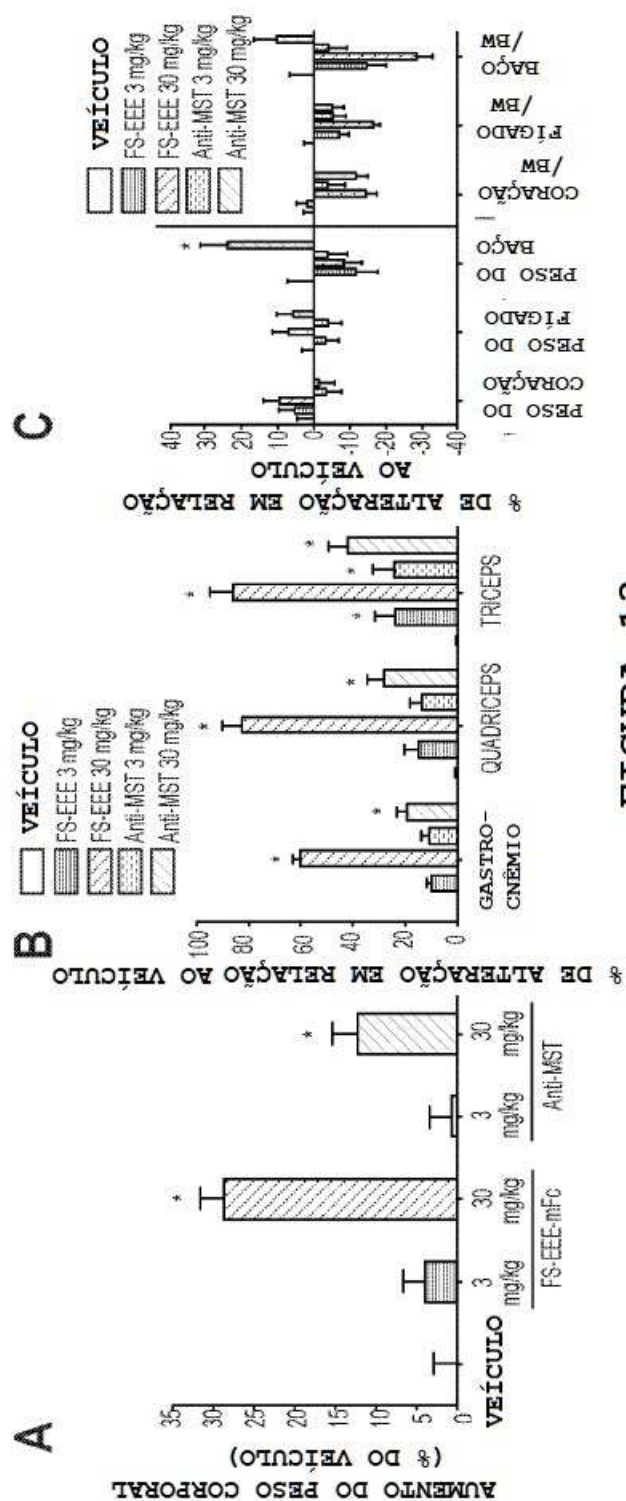


FIGURA 13

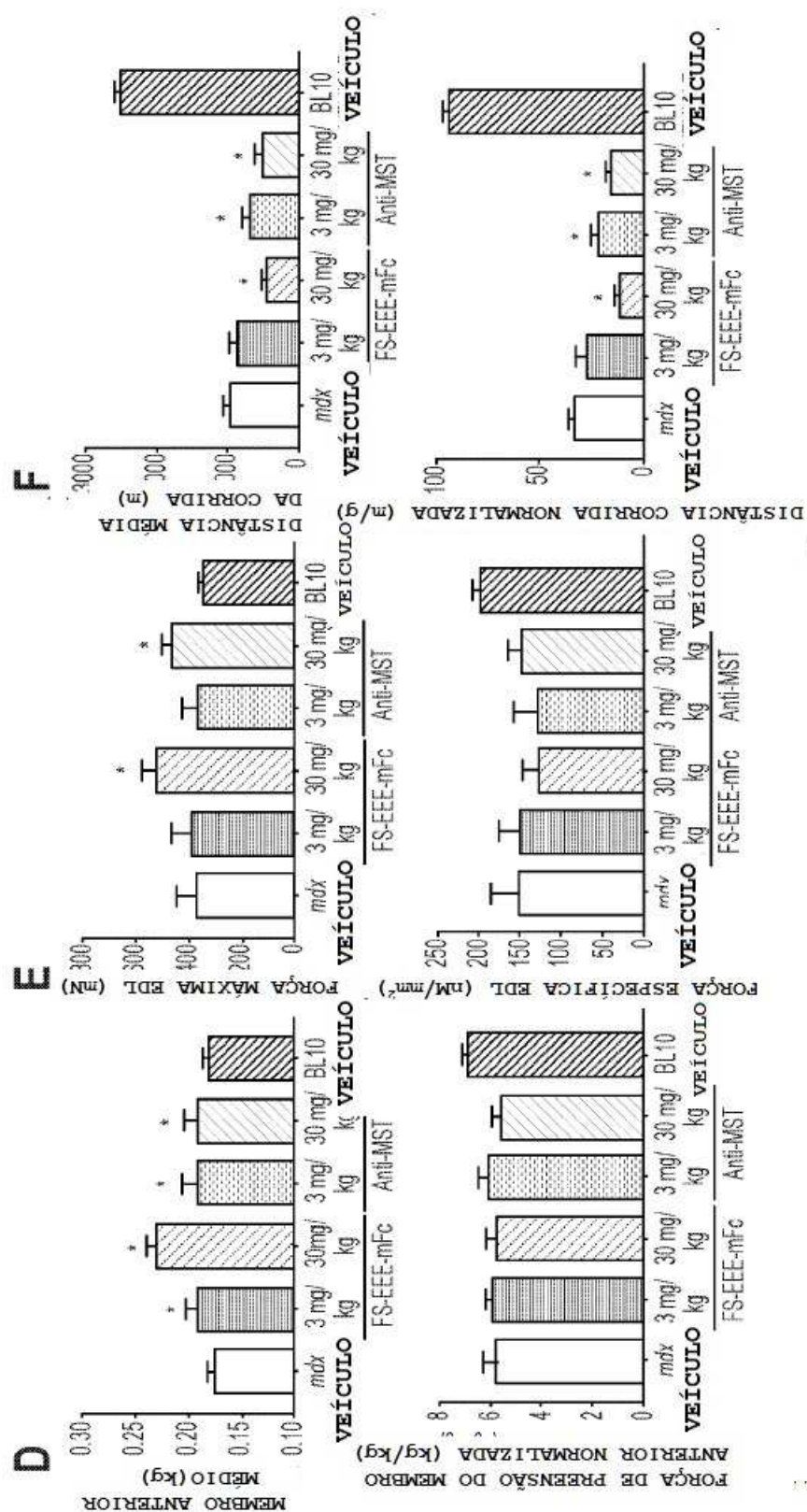


FIGURA 13 (CONTINUAÇÃO)

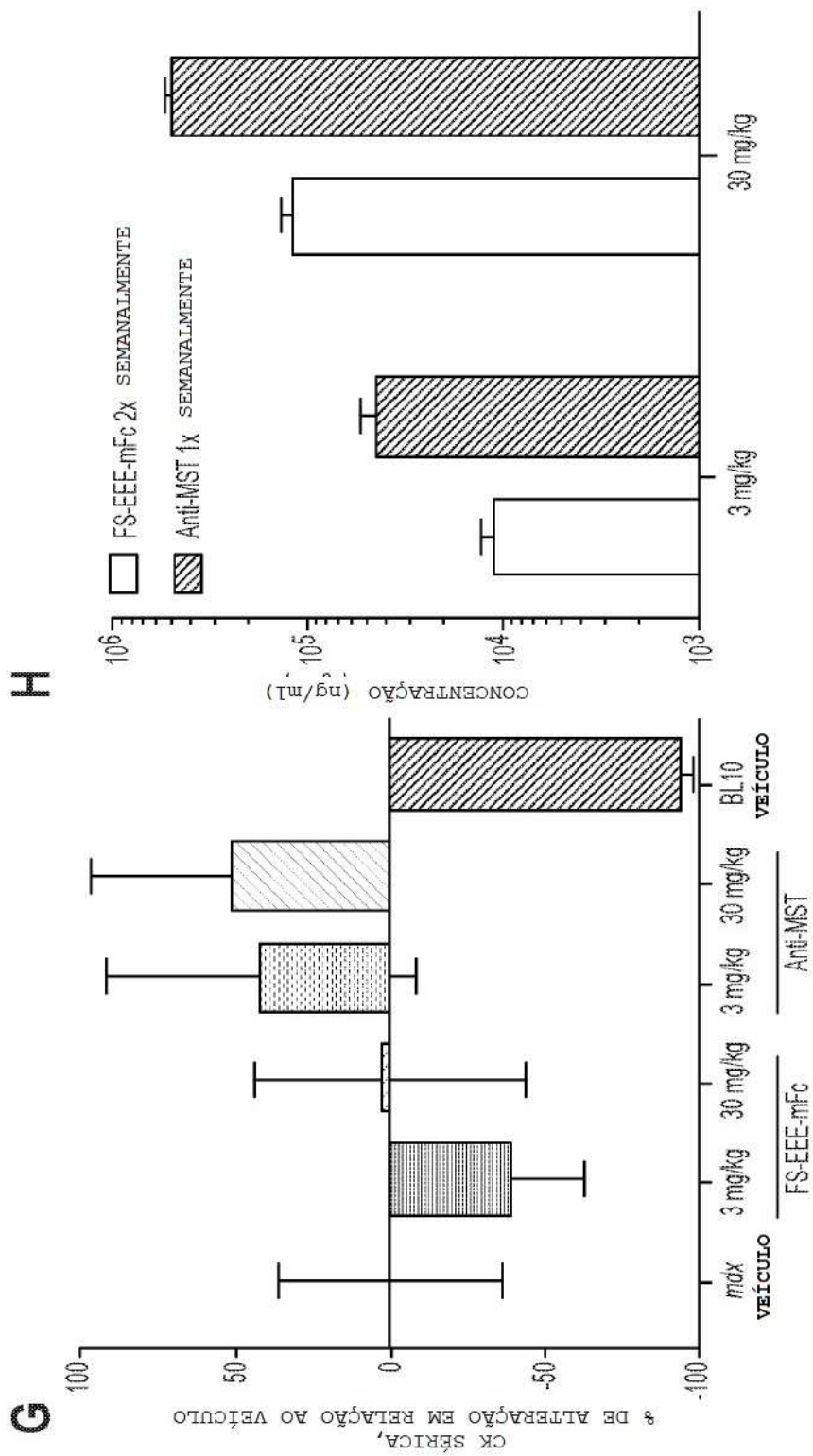


FIGURA 13 (CONTINUAÇÃO)

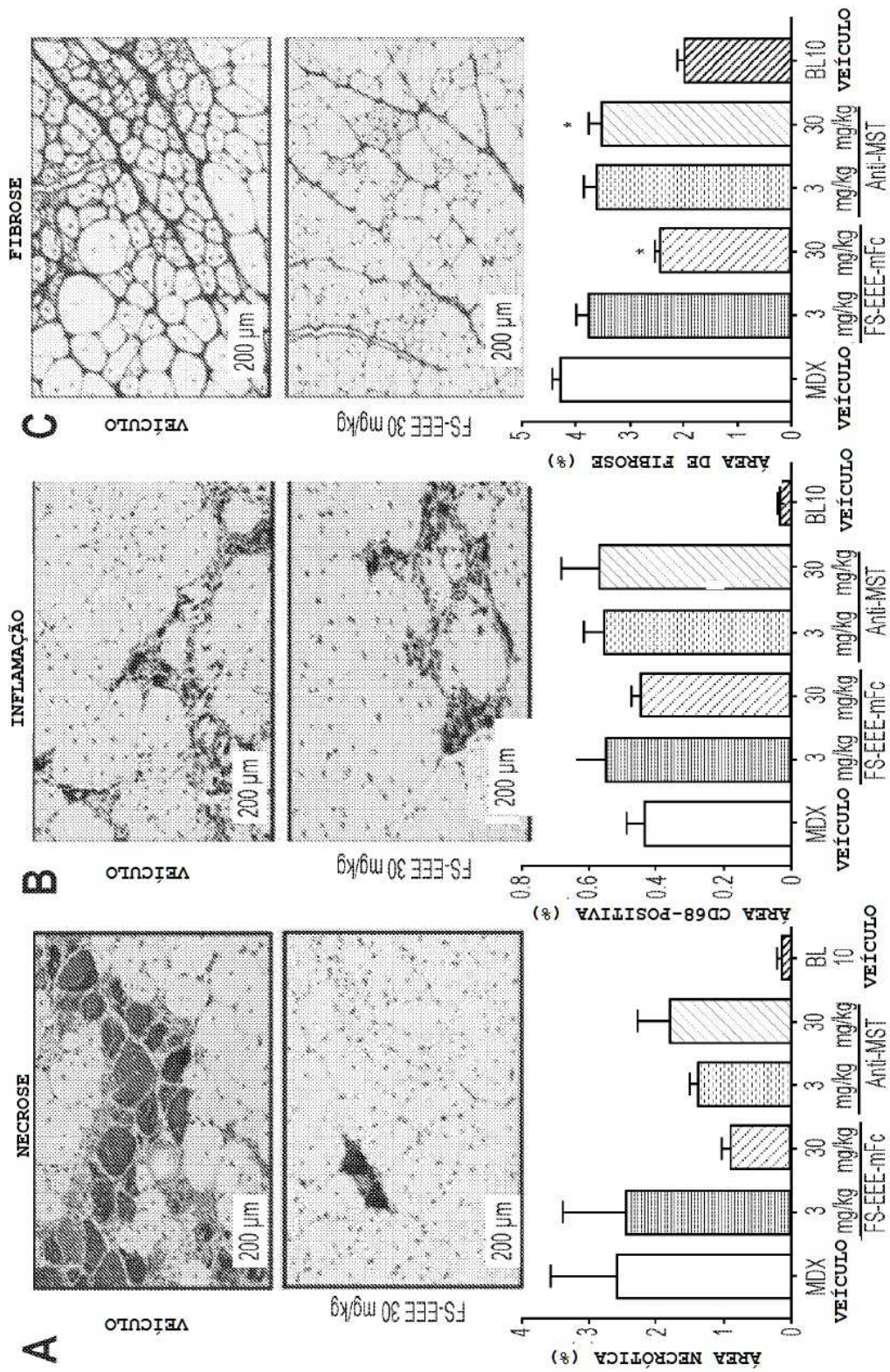


FIGURA 14

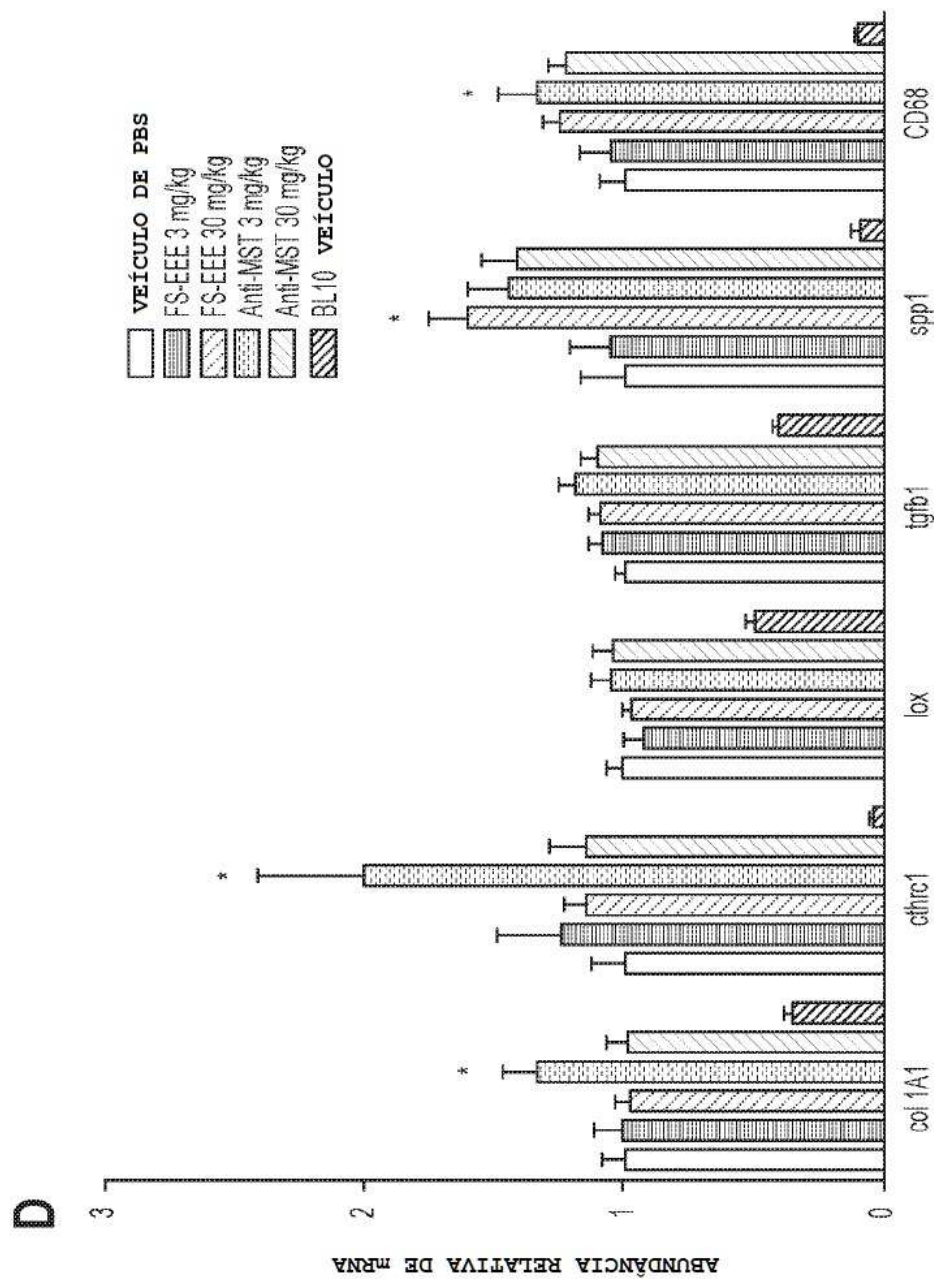


FIGURA 14 (CONTINUAÇÃO)

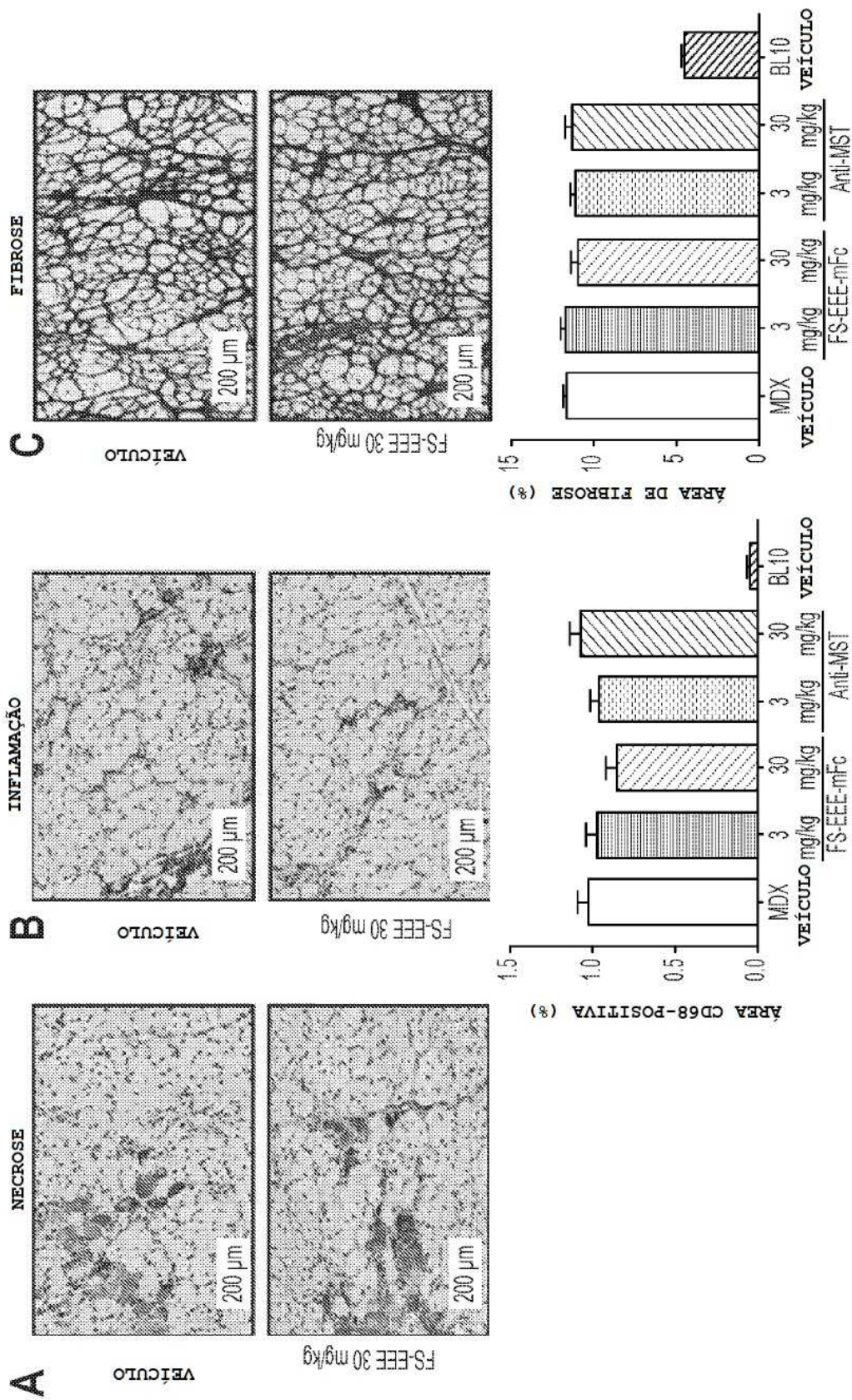


FIGURA 15

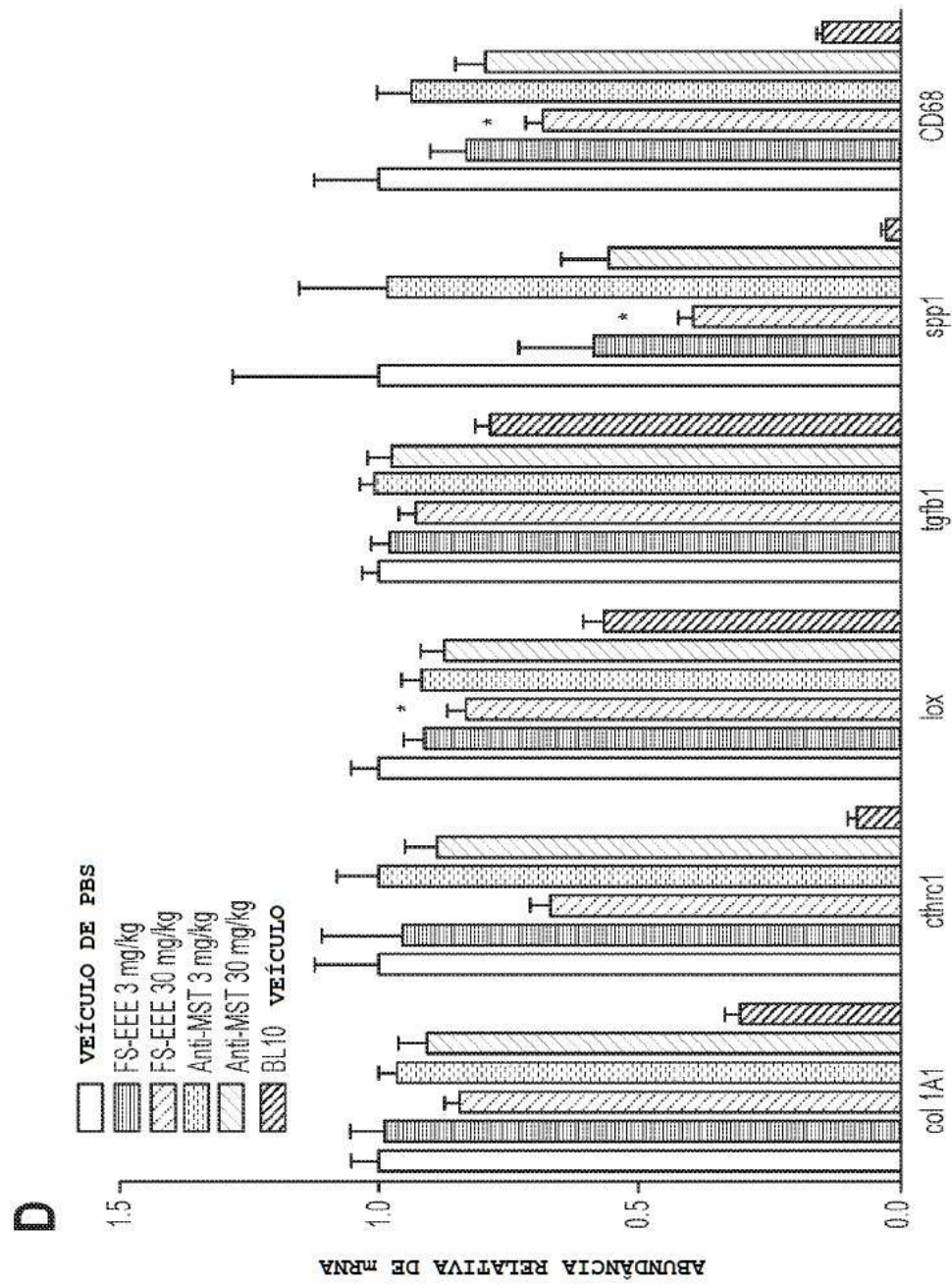


FIGURA 15 (CONTINUAÇÃO)

RESUMO**PROTEÍNAS DE FUSÃO FOLISTATINA RECOMBINANTE-FC E USO NO
TRATAMENTO DE DISTROFIA DE DUCHENNE**

A presente invenção fornece, entre outras coisas, métodos e composições para o tratamento de distrofia muscular, em particular, distrofia muscular de Duchenne (DMD). Em algumas modalidades, um método de acordo com a presente invenção inclui a administração a um indivíduo que sofre de ou suscetível à DMD de uma quantidade eficaz de uma proteína de fusão de folistatina recombinante, de modo que pelo menos um sintoma ou característica de DMD seja reduzido em intensidade, severidade ou frequência, ou tenha o surgimento retardado.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: SHR-2002WO-Sequence Listing.txt
- Data de Geração do Código: 31/07/2020
- Hora de Geração do Código: 13:53:47
- Código de Controle:
 - Campo 1: 26F98B13B2F015C9
 - Campo 2: 3BD774A2FD4B9213