

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2005.07.25**

(30) Prioridade(s): **2004.07.23 US 590765 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2007.04.11**

(45) Data e BPI da concessão: **2013.06.26**
162/2013

(73) Titular(es):

ACCELERON PHARMA INC.

24 EMILY STREET CAMBRIDGE MA 02139 US

(72) Inventor(es):

JOHN KNOFF

US

JASBIR SEEHRA

US

(74) Mandatário:

ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO
RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **POLIPÉPTIDOS DO RECEPTOR ACTRII, MÉTODOS E COMPOSIÇÕES**

(57) Resumo:

EM DETERMINADOS ASPECTOS, A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA MODULAR (PROMOVER OU INIBIR) O CRESCIMENTO DE UM TECIDO, TAL COMO OSSO, CARTILAGEM, MÚSCULO, GORDURA E/OU NEURÓNIO. A PRESENTE INVENÇÃO TAMBÉM PROPORCIONA MÉTODOS DE SELECÇÃO DE COMPOSTOS QUE MODULAM A ACTIVIDADE DE UMA PROTEÍNA ACTRII E/OU UM LIGANDO DE ACTRII. AS COMPOSIÇÕES E MÉTODOS AQUI PROPORCIONADOS SÃO ÚTEIS NO TRATAMENTO DE DOENÇAS ASSOCIADAS À ACTIVIDADE ANÓMALA DE UMA PROTEÍNA ACTRII E/OU UM LIGANDO DE ACTRII.

RESUMO

"POLIPÉPTIDOS DO RECEPTOR ACTRII, MÉTODOS E COMPOSIÇÕES"

Em determinados aspectos, a presente invenção proporciona composições e métodos para modular (promover ou inibir) o crescimento de um tecido, tal como osso, cartilagem, músculo, gordura e/ou neurónio. A presente invenção também proporciona métodos de selecção de compostos que modulam a actividade de uma proteína ActRII e/ou um ligando de ActRII. As composições e métodos aqui proporcionados são úteis no tratamento de doenças associadas à actividade anómala de uma proteína ActRII e/ou um ligando de ActRII.

DESCRIÇÃO

"POLIPÉPTIDOS DO RECEPTOR ACTRII, MÉTODOS E COMPOSIÇÕES"

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório U.S. com o N° de Série 60/590765, apresentado em 23 de Julho de 2004.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A superfamília do factor de crescimento transformante-beta (TGF-beta) contém uma variedade de factores de crescimento que partilham elementos de sequência e motivos estruturais comuns. Sabe-se que estas proteínas exercem efeitos biológicos numa grande variedade de tipos de células em vertebrados e invertebrados. Os membros da superfamília realizam funções importantes durante o desenvolvimento embrionário na formação de padrão e especificação de tecido e pode influenciar uma variedade de processos de diferenciação, incluindo adipogénese, miogénese, condrogénese, cardiogénese, hematopoiese, neurogénese e diferenciação de células epiteliais. A família está dividida em dois ramos gerais: os ramos de BMP/GDF e de TGF-beta/Activina/BMP10, cujos membros têm efeitos variados, frequentemente complementares. Através da manipulação da actividade de um membro da família de TGF-beta é frequentemente possível originar alterações fisiológicas significativas num organismo. Por exemplo, as raças de gado Piemontês e Belga Azul

têm uma mutação de perda de função no gene de GDF8 (também chamada miostatina) que provoca um aumento acentuado da massa muscular. Grobet *et al.*, Nat Genet. 1997, 17(1):71-4. Além disso, em humanos, os alelos de GDF8 inactivos estão associados ao aumento da massa muscular e, aparentemente, a uma força excepcional. Schuelke *et al.*, N Engl J Med 2004, 350:2682-8.

Podem ser conseguidas alterações no músculo, osso, cartilagem e outros tecidos agonizando ou antagonizando sinalização que é mediada por um membro apropriado da família de TGF-beta. Assim, há uma necessidade de agentes que actuem como reguladores potentes da sinalização de TGF-beta.

O documento WO 2004/039948 A (WYETH) de 13 de Maio de 2004 refere-se a métodos e composições para inibir a actividade de crescimento e diferenciação do factor-8 (GDF-8) *in vitro* e *in vivo*, os quais podem ser utilizados para diagnóstico, prevenção, ou tratamento de distúrbios degenerativos do músculo, osso ou homeostasia da glucose.

Gray PC *et al.*, J Biol Chem. 2000, 275(5):3206-3212 refere-se à identificação de um sítio de ligação no receptor de activina de tipo II para a activina e inibina, e descreve um agregado de três resíduos hidrófobos (Phe(42), Trp(60) e Phe(83)) que, quando mutados individualmente em alanina no contexto do receptor de tamanho total, provocam a ruptura da ligação da activina e inibina ao ActRII.

Thompson TB *et al.*, EMBO J. 2003, 22(7):1555-1566 refere-se a estruturas de um complexo de ActRIIB:activina A que revelam um novo modo de ligação para as interacções ligando de TGF-beta:receptor. O ActRIIB liga-se aos bordos exteriores das

regiões do dedo de activina, com os dois receptores justapostos na proximidade, de um modo que difere da ligação do TGF-beta3 aos receptores de tipo II.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção é como descrita nas reivindicações apensas.

Em determinados aspectos, a presente divulgação proporciona polipéptidos de ActRII. Tais polipéptidos de ActRII podem ser utilizados para o tratamento de uma variedade de distúrbios ou estados, em particular, distúrbios musculares e neuromusculares (e. g., distrofia muscular, esclerose lateral amiotrófica (ALS) e atrofia muscular), crescimento indesejado de osso/cartilagem, distúrbios do tecido adiposo (e. g., obesidade), distúrbios metabólicos (e. g., diabetes tipo 2) e distúrbios neurodegenerativos. Em formas de realização específicas, os polipéptidos de ActRII da invenção (e. g., polipéptidos de ActRII solúveis) podem geralmente antagonizar um receptor ActRII (e. g., ActRIIA ou ActRIIB), em qualquer processo associado à actividade do ActRII. Opcionalmente, os polipéptidos de ActRII da invenção podem ser concebidos para antagonizar, de um modo preferido, um ou mais ligandos dos receptores ActRII, tais como o GDF8 (também chamada miostatina), GDF11, activina, Nodal e BMP7 (também chamado OP-1) e, Consequentemente, podem ser úteis no tratamento de outros distúrbios. Os exemplos de polipéptidos de ActRII incluem os polipéptidos de ActRII de ocorrência natural, bem como as suas variantes funcionais.

Em determinados aspectos, a divulgação proporciona preparações farmacêuticas compreendendo um polipéptido de ActRII solúvel (e. g., ActRIIA ou ActRIIB) que se liga a um ligando de ActRII, tais como GDF8, GDF11, activina, BMP7 ou nodal, e um veículo farmacêuticamente aceitável. Opcionalmente, o polipéptido de ActRII solúvel liga-se a um ligando de ActRII com um Kd inferior a 10 micromolar ou inferior a 1 micromolar, 100, 10 ou 1 nanomolar. Opcionalmente, o polipéptido de ActRII solúvel inibe a sinalização de ActRII, tais como os eventos de transdução de sinal intracelulares desencadeados por um ligando de ActRII. Um polipéptido de ActRII solúvel para utilização numa preparação desse tipo pode ser qualquer um daqueles aqui divulgados, tal como um polipéptido possuindo uma sequência de aminoácidos seleccionada de SEQ ID N°: 1-2 e 9-12, ou possuindo uma sequência de aminoácidos que é, pelo menos, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% ou 99% idêntica a uma sequência de aminoácidos seleccionada de SEQ ID N°: 1-2 e 9-12. Um polipéptido de ActRIIA solúvel pode incluir um fragmento funcional de um polipéptido de ActRII de ocorrência natural, tal como um que compreende pelo menos 10, 20 ou 30 aminoácidos de uma sequência seleccionada de SEQ ID N°: 1-4 e 9-12 ou uma sequência de SEQ ID N°: 1 ou 2, que carecem dos 10 a 15 aminoácidos C-terminais (a "cauda"). Um polipéptido de ActRII solúvel pode incluir uma ou mais alterações na sequência de aminoácidos (e. g., no domínio de ligação a ligando) relativamente a um polipéptido de ActRII de ocorrência natural. Por exemplo, a alteração na sequência de aminoácidos pode, por exemplo, alterar a glicosilação do polipéptido quando produzido num mamífero, insecto ou outra célula eucariótica ou alterar a clivagem proteolítica do polipéptido relativamente ao polipéptido de ActRII de ocorrência natural. Um polipéptido de ActRII solúvel pode ser uma proteína de fusão que tem, como um domínio, um polipéptido de ActRII

(e. g., um domínio de ligação a ligando de um ActRII) e um ou mais domínios adicionais que proporcionam uma propriedade desejável, tal como farmacocinética melhorada, purificação mais fácil, direccionamento para tecidos particulares, etc. Por exemplo, um domínio de uma proteína de fusão pode melhorar uma ou mais de estabilidade *in vivo*, semi-vida *in vivo*, captação/administração, localização ou distribuição no tecido, formação de complexos de proteína, multimerização da proteína de fusão e/ou purificação. Uma proteína de fusão de ActRII solúvel pode incluir um domínio Fc de imunoglobulina (tipo selvagem ou mutante) ou uma albumina sérica. Num exemplo preferido, uma fusão ActRU-Fc compreende uma unidade de ligação relativamente desestruturada localizada entre o domínio Fc e o domínio extracelular de ActRII. Esta unidade de ligação desestruturada pode corresponder grosseiramente a uma região desestruturada de 15 aminoácidos na extremidade C-terminal do domínio extracelular de ActRIIA ou ActRIIB (a "cauda") ou pode ser uma sequência artificial entre 5 e 15, 20, 30, 50 ou mais aminoácidos que estão relativamente livres de estrutura secundária. Uma unidade de ligação pode ser rica em resíduos de glicina e prolina e, por exemplo, pode conter sequências de repetição de treonina/serina e glicinas (e. g., repetições TG₄ ou SG₄). Uma proteína de fusão pode incluir uma subsequência de purificação, tal como um marcador epítopo, um marcador FLAG, uma sequência de polihistidina e uma fusão GST. Opcionalmente, um polipéptido de ActRII solúvel inclui um ou mais resíduos de aminoácido modificados seleccionados de: um aminoácido glicosilado, um aminoácido PEGuilado, um aminoácido farnesilado, um aminoácido acetilado, um aminoácido biotinilado, um aminoácido conjugado com uma porção lipídica e um aminoácido conjugado com um agente de derivatização orgânico. Uma preparação farmacêutica também pode incluir um ou mais compostos adicionais tal como um

composto que é utilizado para tratar um distúrbio associado a ActRII. De um modo preferido, uma preparação farmacêutica é substancialmente apirogénica. Em geral, é preferido que uma proteína ActRII seja expressa numa linha celular de mamíferos que medeie adequadamente a glicosilação natural da proteína ActRII de forma a diminuir a probabilidade de uma resposta imunológica desfavorável num doente. Linhas celulares humanas e de CHO têm sido utilizadas com sucesso e prevê-se que sejam úteis outros vectores de expressão de mamíferos comuns.

Em determinados aspectos, a divulgação proporciona produtos farmacêuticos embalados compreendendo uma preparação farmacêutica aqui descrita e etiquetados para serem utilizados na promoção do crescimento de um tecido ou diminuição ou prevenção de uma perda de um tecido num humano. Os tecidos exemplificativos incluem osso, cartilagem, músculo, gordura e neurónio.

Em determinados aspectos, a divulgação proporciona polipéptidos de ActRII solúveis compreendendo um domínio de ligação a ligando (e. g., ligação a GDF8) alterado de um ActRII. Tais domínios de ligação a ligando alterados de um receptor ActRII compreendem uma ou mais mutações em resíduos de aminoácido, tais como E37, E39, R40, K55, R56, Y60, A64, K74, W78, L79, D80, F82 e F101 do ActRIIB humano. Tais domínios de ligação a ligando alterados de um receptor ActRII compreendem uma ou mais mutações em resíduos de aminoácido, tais como E38, E40, R41, K56, R57, Y61, K65, K75, W79, L80, D81, 183 e F102 do ActRIIA humano. Opcionalmente, o domínio de ligação a ligando alterado pode ter maior selectividade para um ligando, tal como GDF8/GDF11 relativamente a um domínio de ligação a ligando de tipo selvagem de um receptor ActRII. Para ilustrar, é aqui

demonstrado que estas mutações aumentam a selectividade do domínio de ligação a ligando alterado para o GDF11 (e, Consequentemente, presumivelmente GDF8) em relação à activina (apresentado em relação ao ActRIIB): K74Y, K74F, K74I e D80I. As seguintes mutações têm o efeito inverso, aumentando a razão de ligação à activina relativamente ao GDF11: D54A, K55A, L79A e F82A. A actividade de ligação global (GDF11 e activina) pode ser aumentada através da inclusão da região "cauda" ou, presumivelmente, uma região de ligação desestruturada e, também, através da utilização de uma mutação, tal como A64R (a qual ocorre naturalmente) ou K74A. Outras mutações que provocaram uma diminuição global na afinidade de ligação a ligando, incluem: R40A, E37A, R56A, W78A, D80K, D80R, D80A, D80G, D80F, D80M e D80N. As mutações podem ser combinadas para conseguir os efeitos desejados. Por exemplo, muitas das mutações que afectam a razão de ligação GDF11:Activina têm um efeito global negativo na ligação ao ligando e, Consequentemente, estas podem ser combinadas com mutações que geralmente aumentam a ligação ao ligando para produzir uma proteína de ligação melhorada com selectividade para o ligando.

Opcionalmente, o domínio de ligação a ligando alterado tem uma razão de K_d para ligação à activina relativamente ao K_d para ligação ao GDF8 que é, pelo menos, 2, 5, 10 ou até mesmo 100 vezes maior do que a razão para o domínio de ligação a ligando de tipo selvagem. Opcionalmente, o domínio de ligação a ligando alterado tem uma razão da IC_{50} de inibição da activina relativamente à IC_{50} de inibição do GDF8/GDF11 que é, pelo menos, 2, 5, 10 ou até mesmo 100 vezes maior do que a do domínio de ligação a ligando de tipo selvagem. Opcionalmente, o domínio de ligação a ligando alterado inibe o GDF8/GDF11 com uma IC_{50} pelo menos 2, 5, 10 ou até mesmo 100 vezes menor do que a IC_{50} para a

inibição da activina. Estes polipéptidos de ActRII solúveis podem ser proteínas de fusão que incluem um domínio Fc de imunoglobulina (de tipo selvagem ou mutante). Em determinados casos, os polipéptidos de ActRII solúveis em causa são antagonistas (inibidores) de GDF8/GDF11.

Em determinados aspectos, a divulgação proporciona ácidos nucleicos que codificam um polipéptido de ActRII solúvel, os quais não codificam um polipéptido de ActRII completo. Um polinucleótido isolado pode compreender uma sequência de codificação para um polipéptido de ActRII solúvel, tal como descrito acima. Por exemplo, um ácido nucleico isolado pode incluir uma sequência que codifica um domínio extracelular (e. g., domínio de ligação a ligando) de um ActRII e uma sequência que codificaria parte ou a totalidade do domínio transmembranar e/ou do domínio citoplasmático de um ActRII, excepto para um codão de terminação localizado no domínio transmembranar ou no domínio citoplasmático, ou localizado entre o domínio extracelular e o domínio transmembranar ou o domínio citoplasmático. Por exemplo, um polinucleótido isolado pode compreender uma sequência polinucleotídica de ActRII de tamanho total tal como a SEQ ID N°: 7 ou 8, ou uma versão parcialmente truncada, compreendendo ainda o referido polinucleótido isolado um codão de terminação da transcrição, pelo menos, seiscentos nucleótidos antes da extremidade 3' ou localizado de outro modo de forma que a tradução do polinucleótido dá origem a um domínio extracelular opcionalmente fundido com uma porção truncada de um ActRIIA de tamanho total. Os ácidos nucleicos aqui divulgados podem estar operativamente ligados a um promotor de expressão e a divulgação proporciona células transformadas com tais polinucleótidos recombinantes. De um modo preferido a célula é uma célula de mamífero tal como uma célula CHO.

Em determinados aspectos, a divulgação proporciona métodos de preparação de um polipéptido de ActRII solúvel. Um tal método pode incluir a expressão de qualquer um dos ácidos nucleicos (e. g., SEQ ID N°: 5 ou 6) aqui divulgados numa célula adequada, tal como uma célula de ovário de hamster Chinês (CHO). Um tal método pode compreender: a) cultivar uma célula sob condições adequadas para a expressão do polipéptido de ActRII solúvel, em que a referida célula está transformada com uma construção de expressão de ActRII solúvel; e b) recuperar o polipéptido de ActRII solúvel assim expresso. Os polipéptidos de ActRII solúveis podem ser recuperados como fracções em bruto, parcialmente purificadas ou altamente purificadas utilizando quaisquer das técnicas bem conhecidas para obter proteínas a partir de culturas de células.

Em determinados aspectos, um polipéptido de ActRII solúvel aqui divulgado pode ser utilizado num método de tratamento de um indivíduo possuindo um distúrbio associado a perda de músculo ou crescimento insuficiente de músculo. Tais distúrbios incluem atrofia muscular, distrofia muscular, esclerose lateral amiotrófica (ALS) e um distúrbio de perda de massa muscular (e. g., caquexia, anorexia, síndrome de DMD, síndrome de BMD, síndrome de perda de massa associada a SIDA, distrofias musculares, doenças neuromusculares, doenças do neurónio motor, doenças da junção neuromuscular e miopatias inflamatórias). Um método pode compreender administrar uma quantidade eficaz de um polipéptido de ActRII solúvel a um indivíduo necessitado do mesmo.

Em determinados aspectos, um polipéptido de ActRII solúvel aqui divulgado pode ser utilizado num método de tratamento de um

indivíduo que possui um distúrbio associado a neurodegenerescência. Tais distúrbios incluem doença de Alzheimer (AD), doença de Parkinson (PD), Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS), doença de Huntington (HD). Um método pode compreender administrar uma quantidade eficaz de um polipéptido de ActRII solúvel a um indivíduo necessitado do mesmo.

Em determinados aspectos, um polipéptido de ActRII solúvel aqui divulgado pode ser utilizado num método de tratamento de um indivíduo que possui um distúrbio associado a crescimento e diferenciação celular anómala. Tais distúrbios incluem inflamação, alergia, doenças auto-imunes, doenças infecciosas e tumores. Um método pode compreender administrar uma quantidade eficaz de um polipéptido de ActRII solúvel a um indivíduo necessitado do mesmo. Uma proteína ActRII de ligação selectiva à activina pode ser particularmente útil para o tratamento de um cancro dependente de activina, tal como o cancro do ovário.

Em determinados aspectos, um polipéptido de ActRII solúvel aqui divulgado pode ser utilizado num método de diminuição do teor de gordura corporal ou redução da velocidade de aumento do teor de gordura corporal, e para o tratamento de um distúrbio associado a ganho de peso corporal indesejável, tais como obesidade, diabetes mellitus não insulino-dependente (NIDDM), doença cardiovascular, cancro, hipertensão, osteoartrite, acidente vascular cerebral, problemas respiratórios e doença da vesícula biliar. Estes métodos podem compreender administrar uma quantidade eficaz de um polipéptido de ActRII solúvel a um indivíduo necessitado do mesmo.

Em determinados aspectos específicos, um polipéptido de ActRII solúvel aqui divulgado pode ser utilizado num método de

tratamento de um distúrbio associado a actividade anómala de GDFB. Tais distúrbios incluem distúrbios metabólicos, tais como diabetes tipo 2, tolerância reduzida à glucose, síndrome metabólica (e. g., síndrome X) e resistência à insulina induzida por traumatismo (e. g., queimaduras ou desequilíbrio de azoto); distúrbios do tecido adiposo (e. g., obesidade); distrofia muscular (incluindo distrofia muscular de Duchenne); esclerose lateral amiotrófica (ALS); atrofia muscular; atrofia de órgão; fraqueza; síndrome do túnel carpiano; doença pulmonar obstrutiva congestiva; sarcopenia, caquexia e outras síndromes de perda de massa muscular; osteoporose; osteoporose induzida por glucocorticóides; osteopenia; osteoartrite; fracturas relacionadas com osteoporose; massa óssea baixa devido a terapia crónica com glucocorticóides, insuficiência gonadal prematura, supressão de androgénios, deficiência de vitamina D, hiperparatireoidismo secundário, deficiências nutricionais e anorexia nervosa. O método pode compreender administrar uma quantidade eficaz de um polipéptido de ActRII solúvel a um indivíduo necessitado do mesmo.

Em determinados aspectos, a divulgação proporciona um método para identificar um agente que estimula o crescimento de um tecido tais como osso, cartilagem, músculo, gordura e neurónio. O método compreende: a) identificar um agente de ensaio que se liga a um domínio de ligação a ligando de um polipéptido de ActRII de forma competitiva com um polipéptido de ActRII solúvel; e b) avaliar o efeito do agente no crescimento do tecido.

Em determinados aspectos, a divulgação proporciona métodos para antagonizar a actividade de um polipéptido de ActRII ou um ligando de ActRII (e. g., GDF8, GDF11, activina, BMP7 e Nodal)

numa célula. Os métodos compreendem pôr a célula em contacto com um polipéptido de ActRII solúvel. Opcionalmente, a actividade do polipéptido de ActRII ou o ligando de ActRII é monitorizada por uma transdução de sinalização mediada pelo complexo ActRII/ligando de ActRII, por exemplo, monitorizando a proliferação celular. As células dos métodos incluem um osteoblasto, um condrócito, um miócito, um adipócito, uma célula de músculo e uma célula neuronal.

Em determinados aspectos, a divulgação proporciona utilizações de um polipéptido de ActRII solúvel para preparar um medicamento para o tratamento de um distúrbio ou estado como aqui descrito.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 mostra uma sequência de polipéptido (extracelular) solúvel (SEQ ID N°: 1) de ActRIIA humano. A "cauda" C-terminal está sublinhada.

A Figura 2 mostra uma sequência de polipéptido (extracelular) solúvel (SEQ ID N°: 2) de ActRIIB humano. A "cauda" C-terminal está sublinhada.

A Figura 3 mostra a sequência da proteína precursora de ActRIIA humano (SEQ ID N°: 3). O péptido sinal está sublinhado; o domínio extracelular está a negrito (também referido como SEQ ID N°: 1); e os sítios de glicosilação ligados por N potenciais estão incluídos numa caixa.

A Figura 4 mostra a sequência da proteína precursora de ActRIIB humano (SEQ ID N°: 4). O péptido sinal está sublinhado; o domínio extracelular está a negrito (também referido como SEQ ID N°: 2); e os sítios de glicosilação ligados por N potenciais estão incluídos numa caixa.

A Figura 5 mostra uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipéptido (extracelular) solúvel de ActRIIA humano, concebida como SEQ ID N°: 5.

A Figura 6 mostra uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipéptido (extracelular) solúvel ActRIIB humano, concebida como SEQ ID N°: 6.

A Figura 7 mostra uma sequência de ácido nucleico que codifica a proteína precursora de ActRIIA humano, concebida como SEQ ID N°: 7.

A Figura 8 mostra uma sequência de ácido nucleico que codifica a proteína precursora de ActRIIB humano, concebida como SEQ ID N°: 8.

A Figura 9 mostra a expressão dos domínios extracelulares (solúveis) de ActRIIA ou ActRIIB. As construções que expressam os domínios extracelulares humanos de ActRIIA ou ActRIIB foram preparados com todas as três sequências sinal.

A Figura 10 mostra três polipéptidos de ActRIIB solúveis com várias sequências sinal, SEQ ID N°: 9-11.

A Figura 11 mostra um polipéptido de ActRIIA solúvel com a sua sequência sinal nativa, SEQ ID N°: 12.

A Figura 12 mostra a concepção das fusões Fc de polipéptidos de ActRIIA ou ActRIIB. São mostradas a sequência da unidade de ligação flexível e a sequência de Fc (SEQ ID N°: 13). Podem ser feitas mutações em um ou mais resíduos de aminoácido da sequência de Fc. Os exemplos de tais resíduos para mutações estão sublinhados e referidos como Asp-265, lisina-322 e Asn-434.

A Figura 13 mostra a bolsa de ligação a ligando de um polipéptido de ActRIIB. Os exemplos de resíduos de aminoácido na bolsa de ligação a ligando são mostrados como E39, K55, Y60, K74, W78, D80 e F101. Os polipéptidos de ActRIIB da invenção podem compreender mutações em um ou mais destes resíduos de aminoácido.

A Figura 14 mostra um alinhamento dos domínios extracelulares de ActRIIA e ActRIIB, com as posições de mutações que, no ActRIIB, se demonstrou aqui que afectam ligação a ligando. O alinhamento mostra que a posição destas mutações é conservada no ActRIIA.

A Figura 15 mostra um esquema para o Ensaio do Gene Repórter A-204. A figura mostra o vector Repórter: pGL3(CAGA)12 (descrito em Dennler et al, 1998, EMBO 17: 3091-3100.) O motivo CAGA12 está presente em genes sensíveis a TGF-Beta (gene PAI-1), pelo que este vector é de utilização geral para factores que sinalizam através de Smad2 e 3.

A Figura 16 mostra os efeitos de várias mutações em ActRIIB-Fc num Ensaio de Gene Repórter A-204 para GDF-11. A construção A64 de base apresentou o menor efeito na actividade do GDF-11. A mutação A64K (também uma forma de ocorrência natural) provocou um aumento substancial na inibição de GDF-11, e uma combinação da mutação A64K com a adição dos 15 aminoácidos C-terminais do domínio extracelular (a "cauda" de 15 aminoácidos) produziu um inibidor ainda mais potente da actividade do GDF-11.

A Figura 17 mostra os efeitos de várias mutações no ActRIIB-Fc num Ensaio de Gene Repórter A-204 para Activina A. A construção A64 de base apresentou o menor efeito na actividade da Activina A. A mutação K74A provocou um aumento substancial na inibição da Activina A. Uma amostra de controlo que carece de Activina A não apresentou qualquer actividade.

Descrição Detalhada da Invenção

1. Revisão Geral

A presente invenção refere-se a polipéptidos de ActRII. Como aqui utilizado, o termo "ActRII" refere-se a uma família de proteínas do receptor de activina de tipo II (ActRII) e proteínas relacionadas com ActRII, derivados de qualquer espécie. Aqui, a referência a ActRII é entendida como sendo uma referência a qualquer uma das formas actualmente identificadas, incluindo ActRIIA (também conhecido como ActRII) e ActRIIB. Os membros da família ActRII são geralmente todos proteínas

transmembranares, compostas por um domínio extracelular de ligação a ligando com uma região rica em cisteína, um domínio transmembranar e um domínio citoplasmático com especificidade prevista para a serina/treonina-cinase. As sequências de aminoácidos da proteína precursora de ActRIIA humano e da proteína precursora de ActRIIB são ilustradas nas Figura 3 (SEQ ID N°: 3) e Figura 4 (SEQ ID N°: 4), respectivamente.

A expressão "polipéptido de ActRII" é utilizada para referir polipéptidos compreendendo qualquer polipéptido natural de um membro da família de ActRII bem como quaisquer suas variantes (incluindo mutantes, fragmentos, fusões e formas peptidomiméticas) que retêm uma actividade útil. Por exemplo, os polipéptidos de ActRII incluem polipéptidos derivados da sequência de qualquer ActRII conhecido possuindo uma sequência pelo menos cerca de 80% idêntica à sequência de um polipéptido de ActRII e, de um modo preferido, pelo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% de identidade ou mais.

A invenção refere-se a polipéptidos de ActRII solúveis. Como aqui descrito, a expressão "polipéptido de ActRII solúvel" refere-se em geral a polipéptidos compreendendo um domínio extracelular de uma proteína ActRII. A expressão "polipéptido de ActRII solúvel," como aqui utilizado, inclui qualquer domínio extracelular natural de uma proteína ActRII bem como quaisquer suas variantes (incluindo mutantes, fragmentos e formas peptidomiméticas) que retêm uma actividade útil. Por exemplo, o domínio extracelular de uma proteína ActRII liga-se a um ligando e é geralmente solúvel. Os exemplos de polipéptidos de ActRII solúveis incluem os polipéptidos solúveis de ActRIIA e ActRIIB ilustrados nas Figura 1 (SEQ ID N°: 1) e Figura 2 (SEQ ID N°: 2), respectivamente. Outros exemplos de polipéptidos

de ActRII solúveis compreendem uma sequência sinal além do domínio extracelular de uma proteína ActRII, por exemplo, as sequências ilustradas nas Figura 10 (SEQ ID N°: 9-11) e Figura 11 (SEQ ID N°: 12). A sequência sinal pode ser uma sequência sinal nativa de um ActRII ou uma sequência sinal de outra proteína, tal como uma sequência sinal do activador de plasminogénio tecidual (TPA) ou uma sequência sinal melatina de abelha-comum (HBM).

Os sinais de TGF- β são mediados por complexos heteroméricos de receptores de serina/treonina-cinase de tipo I e tipo II, os quais fosforilam e activam a jusante proteínas Smad após estimulação pelo ligando (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178). Estes receptores de tipo I e tipo II são todos proteínas transmembranares, compostas por um domínio extracelular de ligação a ligando com uma região rica em cisteína, um domínio transmembranar e um domínio citoplasmático com especificidade prevista para serina/treonina. Os receptores de tipo I são essenciais para a sinalização; e os receptores de tipo II são necessários para ligar ligandos e para a expressão dos receptores de tipo I. Os receptores de activina de tipo I e II formam um complexo estável após ligação a ligando, resultando na fosforilação dos receptores de tipo I pelos receptores de tipo II.

Foram identificados dois receptores de tipo II relacionados, ActRIIA e ActRIIB, como os receptores de tipo II para activinas (Mathews e Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano *et al.*, 1992, Cell 68: 97-108). Além das activinas, os ActRIIA e ActRIIB podem interagir bioquimicamente com várias outras proteínas da família do TGF- β , incluindo BMP7, Nodal, GDF8 e GDF11 (Yamashita *et al.*, 1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee e

McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311; Yeo e Whitman, 2001, Mol. Cell 7: 949-957; Oh *et al.*, 2002, Genes Dev. 16:2749-54).

Em determinadas formas de realização, a presente invenção refere-se ao antagonismo de um ligando dos receptores ActRII (também referido como um ligando de ActRII) com um polipéptido de ActRII em causa (e. g., um polipéptido de ActRII solúvel) da invenção. Assim, as composições da presente invenção são úteis para o tratamento de distúrbios associados à actividade anómala de um ou mais ligandos dos receptores ActRII. Os ligandos de receptores ActRII exemplificativos incluem alguns membros da família de TGF- β , tais como a activina, Nodal, GDF8, GDF11 e BMP7. Estes ligandos dos receptores ActRII são descritos em mais pormenor abaixo.

As activinas são factores de crescimento polipeptídicos diméricos pertencem à superfamília de TGF-beta. Existem três activinas (A, B e AB) que são homo/heterodímeros de duas subunidades P estreitamente relacionadas ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$ e $\beta_A\beta_B$). Na superfamília TGF-beta, as activinas são factores únicos e multifuncionais que podem estimular a produção de hormonas nas células ovarianas e placentárias, suportar a sobrevivência de células neuroniais, influenciar o progresso do ciclo celular positiva ou negativamente dependendo do tipo de células, e induzir a diferenciação mesodérmica, pelo menos, em embriões anfíbios (DePaolo *et al.*, 1991, Proc SocEp Biol Med. 198:500-512; Dyson *et al.*, 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963). Além disso, foi constatado que o factor de diferenciação eritróide (EDF) isolado a partir de células leucémicas monocíticas humanas estimuladas é idêntico à activina A (Murata *et al.*, 1988, PNAS, 85:2434). Foi sugerido que a activina A actua como um regulador natural da eritropoiese

na medula óssea. Em vários tecidos, a sinalização de activina é antagonizada pelo seu heterodímero relacionado, a inibina. Por exemplo, durante a libertação da hormona estimulante de folículos (FSH) a partir da pituitária, a activina promove a secreção e síntese de FSH, enquanto a inibina impede a secreção e síntese de FSH. Outras proteínas que podem regular a bioactividade da activina e/ou ligar-se à activina incluem a folistatina (FS), proteína relacionada com a folistatina (FSRP), macroglobulina α_2 , Cérbero e endogлина, as quais são descritas abaixo.

As proteínas Nodal têm funções na indução e formação de mesoderme e endoderme, bem como na organização subsequente das estruturas axiais, tais como coração e estômago na embriogénese inicial. Foi demonstrado que o tecido dorsal num embrião de vertebrado em desenvolvimento contribui predominantemente para as estruturas axiais da corda dorsal e da placa pré-cordial enquanto recruta células circundantes para formar estruturas embrionárias não axiais. A Nodal parece sinalizar através de ambos os receptores de tipo I e tipo II e de efectores intracelulares conhecidos como proteínas Smad. Estudos recentes apoiam a ideia de que os ActRIIA e ActRIIB servem como receptores de tipo II para a Nodal (Sakuma *et al.*, Genes Cells. 2002, 7:401-12). É sugerido que os ligandos de Nodal interagem com os seus co-factores (e. g., cripto) para activar os receptores de tipo I e tipo II da activina, os quais fosforilam a Smad2. As proteínas Nodal estão implicadas em muitos eventos críticos para o embrião inicial de vertebrados, incluindo a formação de mesoderme, formação do padrão anterior e especificação do eixo esquerdo-direito. A evidência experimental demonstrou que a sinalização Nodal activa o pAR3-Lux, um repórter de luciferase que se demonstrou anteriormente que

responde especificamente à activina e TGF-beta. No entanto, a Nodal não é capaz de induzir o pTlx2-Lux, um repórter que é sensível especificamente às proteínas morfogenéticas do osso. Os resultados recentes proporcionam evidência bioquímica directa que a sinalização Nodal é mediada pelas Smads, Smad2 e Smad3, via activina-TGF-beta. Evidência adicional demonstrou que é necessária a proteína extracelular cripto para a sinalização de Nodal, tornando-a distinta da sinalização de activina ou TGF-beta.

O Factor de Crescimento e Diferenciação-8 (GDF8) também é conhecido como miostatina. O GDF8 é um regulador negativo da massa músculo-esquelética. O GDF8 é altamente expresso no músculo-esquelético em desenvolvimento e adulto. A mutação de anulação do GDF8 em ratinhos transgénicos caracteriza-se por uma hipertrofia e hiperplasia acentuadas do músculo-esquelético (McPherron *et al.*, *Nature*, 1997, 387:83-90). Aumentos semelhantes na massa músculo-esquelética são evidentes em mutações de ocorrência natural de GDF8 em gado bovino (Ashmore *et al.*, 1974, *Growth*, 38:501-507; Swatland e Kieffer, *J. Anim. Sci.*, 1994, 38:752-757; McPherron e Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94:12457-12461; e Kambadur *et al.*, *Genome Res.*, 1997, 7:910-915) e, incontestavelmente, em humanos (Schuelke *et al.*, *N Engl J Med* 2004;350:2682-8). Estudos demonstraram também que a perda de massa muscular associada à infecção pelo HIV em humanos é acompanhada por um aumento na expressão da proteína GDF8 (Gonzalez-Cadavid *et al.*, *PNAS*, 1998, 95:14938-43). Além disso, o GDF8 pode modular a produção de enzimas específicas do músculo (*e. g.*, creatina-cinase) e modular a proliferação celular de mioblastos (documento WO 00/43781). O propéptido de GDF8 pode ligar-se de forma não covalente ao dímero do domínio GDF8 maduro, inactivando a sua actividade biológica (Miyazono *et al.*

(1988) J. Biol. Chem., 263: 6407-6415; Wakefield et al. (1988) J. Biol. Chem., 263: 7646-7654; e Brown et al. (1990) Growth Factors, 3: 35-43). Outras proteínas que se ligam ao GDF8 ou proteínas estruturalmente relacionadas e inibem a sua actividade biológica incluem folistatina e, potencialmente, proteínas relacionadas com a folistatina (Gamer et al. (1999) Dev. Biol., 208: 222-232).

O Factor de Crescimento e Diferenciação-11 (GDF11), também conhecido como BMP11, é uma proteína segregada (McPherron et al., 1999, Nat. Genet. 22: 260-264). O GDF11 é expresso no desenvolvimento da cauda, desenvolvimento dos membros, arcos maxilares e mandibulares, e gânglios da raiz dorsal durante o desenvolvimento do ratinho (Nakashima et al., 1999, Mech. Dev. 80: 185-189). O GDF11 desempenha um papel único na padronização dos tecidos mesodérmico e nervoso (Gamer et al., 1999, Dev Biol., 208:222-32). Foi demonstrado que o GDF11 é um regulador negativo da condrogénese e miogénese em membros de pintainho em desenvolvimento (Gamer et al., 2001, Dev Biol. 229:407-20). A expressão de GDF11 no músculo sugere também o seu papel na regulação do crescimento do músculo de uma maneira semelhante ao GDF8. Além disso, a expressão de GDF11 no cérebro sugere que o GDF11 também pode possuir actividades que se relacionam com a função do sistema nervoso. Curiosamente, foi determinado que o GDF11 inibe a neurogénese no epitélio olfactivo (Wu et al., 2003, Neuron. 37:197-207). Assim, o GDF11 pode ter aplicações *in vitro* e *in vivo* no tratamento de doenças, tais como doenças musculares e doenças neurodegenerativas (e. g., esclerose lateral amiotrófica).

A proteína morfogénica do osso (BMP7), também chamada proteína osteogénica-1 (OP-1), é bem conhecida por induzir a

formação de cartilagem e osso. Além disso, a BMP7 regula uma grande matriz de processos fisiológicos. Por exemplo, a BMP7 pode ser o factor osteoinductivo responsável pelo fenómeno de osteogénese epitelial. Determinou-se também que a BMP7 desempenha um papel na regulação do cálcio e homeostasia óssea. Como a activina, a BMP7 liga-se aos receptores de tipo II, ActRIIA e IIB. No entanto, a BMP7 e activina recrutam receptores de tipo I distintos para os complexos receptores heteroméricos. O receptor de tipo I de BMP7 principal observado foi o ALK2, embora a activina se liga exclusivamente ao ALK4 (ActRIIB). A BMP7 e a activina desencadearam respostas biológicas distintas e activaram vias Smad diferentes (Macias-Silva *et al.*, 1998, J Biol Chem. 273:25628-36).

A presente invenção refere-se à utilização de determinados polipéptidos de ActRII (e. g., polipéptidos de ActRII solúveis) para antagonizar os receptores ActRII em geral, em qualquer processo associado à actividade do ActRII. Opcionalmente, os polipéptidos de ActRII da invenção podem antagonizar um ou mais ligandos dos receptores ActRII, tais como activina, Nodal, GDF8, GDF11 e BMP7 e, Consequentemente, podem ser úteis no tratamento de outros distúrbios.

Consequentemente, a presente invenção considera a utilização de polipéptidos de ActRII no tratamento ou prevenção de doenças ou estados que estão associados à actividade anómala de um ActRII ou um ligando de ActRII. O ActRII ou ligandos de ActRII estão envolvidos na regulação de muitos processos biológicos críticos. Devido às suas funções chave nestes processos, eles podem ser alvos desejáveis para intervenção terapêutica. Por exemplo, os polipéptidos de ActRII (e. g., e. g., polipéptidos de ActRII solúveis) podem ser utilizados

para tratar distúrbios ou estados humanos ou animais. Os exemplos de tais distúrbios ou estados incluem, mas não estão limitados a, distúrbios metabólicos tais como diabetes tipo 2, tolerância reduzida à glucose, síndrome metabólica (e. g., síndrome X) e resistência à insulina induzida por traumatismo (e. g., queimaduras ou desequilíbrio de azoto); distúrbios do tecido adiposo (e. g., obesidade); distúrbios musculares e neuromusculares tal como distrofia muscular (incluindo distrofia muscular de Duchenne); esclerose lateral amiotrófica (ALS); atrofia muscular; atrofia de órgão, fraqueza; síndrome do túnel carpiano; doença pulmonar obstrutiva congestiva; e sarcopenia, caquexia e outras síndromes de perda de massa muscular. Outros exemplos incluem osteoporose, especialmente nos idosos e/ou mulheres pós-menopáusicas; osteoporose induzida por glucocorticóides; osteopenia; osteoartrite; e fracturas relacionadas com osteoporose. Ainda outros exemplos incluem massa óssea baixa devido a terapia crónica com glucocorticóides, insuficiência gonadal prematura, supressão de androgénios, deficiência de vitamina D, hiperparatireoidismo secundário, deficiências nutricionais e anorexia nervosa. Estes distúrbios e estados são discutidos abaixo em "Utilizações Terapêuticas Exemplificativas."

Os termos utilizados nesta descrição têm geralmente os seus significados correntes na técnica, dentro do contexto desta invenção e no contexto específico em que cada termo é utilizado. Determinados termos são discutidos abaixo ou em qualquer outra parte da descrição para proporcionar orientação adicional ao profissional ao descrever as composições e métodos da invenção e o modo de as preparar e utilizar. O âmbito ou significado de qualquer utilização de um termo será evidente a partir do contexto específico no qual o termo é utilizado.

"Cerca" e "aproximadamente" significará, em geral, um grau aceitável de erro para a quantidade medida dada a natureza ou precisão das medições. Tipicamente, os graus de erro exemplificativos estão dentro de 20 por cento (%), de um modo preferido dentro de 10% e, de um modo mais preferido, dentro de 5% de um dado valor ou gama de valores.

Alternativamente, e particularmente em sistemas biológicos, os termos "cerca" e "aproximadamente" podem significar valores que estão dentro de uma ordem de grandeza, de um modo preferido dentro de 5 vezes e, de um modo mais preferido, dentro de 2 vezes de um dado valor. As quantidades numéricas aqui indicadas são aproximadas salvo indicação em contrário, o que significa que o termo "cerca" ou "aproximadamente" pode ser inferido quando não expressamente especificado.

Os métodos da invenção podem incluir passos de comparação de sequências umas com as outras, incluindo da sequência de tipo selvagem com um ou mais mutantes (variantes de sequência). Tais comparações compreendem tipicamente alinhamentos de sequências poliméricas, e. g., utilizando programas de alinhamento de sequências e/ou algoritmos que são bem conhecidos na técnica (por exemplo, BLAST, FASTA e MEGALIGN, para nomear apenas alguns). O especialista pode compreender facilmente que, em tais alinhamentos, quando uma mutação contém uma inserção ou supressão de resíduo, o alinhamento das sequências introduzirá uma "lacuna" (tipicamente representada por um travessão ou "A") na sequência polimérica que não contém o resíduo inserido ou suprimido.

"Homólogo," em todas as suas formas gramaticais e variações de ortografia, refere-se à relação entre duas proteínas que possuem uma "origem evolutiva comum," incluindo proteínas de superfamílias na mesma espécie de organismo, bem como proteínas homólogas de diferentes espécies de organismo. Tais proteínas (e os seus ácidos nucleicos de codificação) têm homologia de sequência, como reflectida pela sua semelhança de sequência, quer em termos de percentagem de identidade ou pela presença de resíduos ou motivos específicos e posições conservadas.

A expressão "semelhança de sequência," em todas as suas formas gramaticais, refere-se ao grau de identidade ou correspondência entre sequências de ácidos nucleicos ou aminoácidos que podem, não, partilhar de uma origem evolutiva comum.

No entanto, na utilização comum e no presente pedido, o termo "homólogo," quando modificado com um advérbio, tal como "altamente," pode referir-se à semelhança das sequências e pode, ou não, referir-se a uma origem evolutiva comum.

2. Polipéptidos de ActRII

A invenção refere-se a polipéptidos de ActRII (e. g., polipéptidos de ActRII solúveis). De um modo preferido, os fragmentos, variantes funcionais e formas modificadas têm actividades biológicas iguais ou semelhantes aos seus polipéptidos de ActRII de tipo selvagem correspondentes. Por exemplo, um polipéptido de ActRII da invenção pode ligar-se e inibir a função de uma proteína ActRII e/ou uma proteína de ligando de ActRII (e. g., activina, Nodal, GDF8, GDF11 ou BMP7).

Opcionalmente, um polipéptido de ActRII modula o crescimento de tecidos, tais como osso, cartilagem, músculo, gordura e/ou neurónio. Os exemplos de polipéptidos de ActRII incluem o polipéptido precursor de ActRIIA humano (SEQ ID N°: 3), polipéptido precursor de ActRIIB humano (SEQ ID N°: 4), polipéptidos de ActRIIA humano solúveis (e. g., SEQ ID N°: 1 e 12), polipéptidos de ActRIIB humano solúveis (e. g., SEQ ID N°: 2 e 9-11).

Em determinadas formas de realização podem ser obtidos fragmentos isolados dos polipéptidos de ActRII rastreando os polipéptidos produzidos de forma recombinante a partir do fragmento de ácido nucleico correspondente que codifica um polipéptido de ActRII (e. g., um de SEQ ID N°: 1-2 e 9-12). Além disso, os fragmentos podem ser quimicamente sintetizados utilizando técnicas conhecidas na matéria, tal como a química de f-Moc ou t-Boc em fase sólida de Merrifield convencional. Os fragmentos podem ser produzidos (de forma recombinante ou por síntese química) e testados para identificar aqueles fragmentos de peptidilo que podem actuar, por exemplo, como antagonistas (inibidores) ou agonistas (activadores) de uma proteína ActRII ou um ligando de ActRII.

Em determinados casos, uma variante funcional dos polipéptidos de ActRII tem uma sequência de aminoácidos que é, pelo menos, 75% idêntica a uma sequência de aminoácidos seleccionada de SEQ ID N°: 1-2 e 9-12. Em determinados casos, a variante funcional tem uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácidos seleccionada das SEQ ID N°: 1-2 e 9-12.

Em determinadas formas de realização, a presente invenção contempla a preparação de variantes funcionais modificando a estrutura de um polipéptido de ActRII para fins tais como melhorar a eficácia terapêutica ou estabilidade (e. g., duração de conservação *ex vivo* e resistência à degradação proteolítica *in vivo*). Tais polipéptidos de ActRII modificados quando concebidos para reter pelo menos uma actividade da forma natural dos polipéptidos de ActRII são considerados equivalentes funcionais dos polipéptidos de ActRII de ocorrência natural. Os polipéptidos de ActRII modificados também podem ser produzidos, por exemplo, por substituição, supressão ou adição de aminoácido. Por exemplo, é razoável esperar que uma substituição isolada de uma leucina por uma isoleucina ou valina, um aspartato por um glutamato, uma treonina por uma serina, ou uma substituição semelhante de um aminoácido por um aminoácido estruturalmente relacionado (e. g., mutações conservadoras) não tenha um efeito importante na actividade biológica da molécula resultante. As substituições conservadoras são aquelas que ocorrem dentro de uma família de aminoácidos que estão relacionados nas suas cadeias laterais. Se uma alteração na sequência de aminoácidos de um polipéptido de ActRII resulta num homólogo funcional pode ser facilmente determinada avaliando a aptidão do polipéptido de ActRII variante para produzir uma resposta nas células de um modo semelhante ao polipéptido de ActRII tipo selvagem.

Em determinadas formas de realização específicas, a presente invenção contempla a realização de mutações no domínio extracelular (também referido como domínio de ligação a ligando) de um polipéptido de ActRII de tal forma que o polipéptido de ActRII variante (ou mutante) tem actividades de ligação a ligando alteradas (e. g., afinidade de ligação ou especificidade

de ligação). Em determinados casos, tais polipéptidos de ActRII variantes têm afinidade de ligação alterada (elevada ou reduzida) para um ligando específico. Noutros casos, os polipéptidos de ActRII variantes têm especificidade de ligação alterada para os seus ligandos.

Por exemplo, de um modo preferido, o polipéptido de ActRII variante liga-se a um ligando específico (e. g., GDF8). Por exemplo, resíduos de aminoácido da proteína ActRIIB, tais como E39, K55, Y60, K74, W78, D80 e F101 (mostrados na Figura 13), encontram-se na bolsa de ligação a ligando e medeiam a ligação aos seus ligandos, tais como activina e GDF8. Assim, a presente invenção proporciona um domínio de ligação a ligando alterado (e. g., domínio de ligação a GDF8) de um receptor ActRII, o qual compreende uma ou mais mutações naqueles resíduos de aminoácido. Opcionalmente, o domínio de ligação a ligando alterado pode ter selectividade aumentada para um ligando, tal como GDF8 relativamente a um domínio de ligação a ligando de tipo selvagem de um receptor ActRII. Para ilustrar, estas mutações aumentam a selectividade do domínio de ligação a ligando alterado para o GDF8, em relação à activina. Opcionalmente, o domínio de ligação a ligando alterado tem uma razão da K_d para ligação à activina relativamente à K_d para ligação ao GDF8 que é, pelo menos, 2, 5, 10 ou até mesmo 100 vezes maior relativamente à razão para o domínio de ligação a ligando de tipo selvagem. Opcionalmente, o domínio de ligação a ligando alterado tem uma razão da IC_{50} para inibir a activina relativamente à IC_{50} para inibir o GDF8 que é, pelo menos, 2, 5, 10 ou até mesmo 100 vezes maior relativamente ao domínio de ligação a ligando de tipo selvagem. Opcionalmente, o domínio de ligação a ligando alterado inibe o GDF8 com uma IC_{50} pelo menos 2, 5, 10 ou até mesmo 100 vezes menor que a IC_{50} para inibir a activina.

Como um exemplo específico, o resíduo de aminoácido carregado positivamente Asp (D80) do domínio de ligação a ligando de ActRIIB pode ser mutado para um resíduo de aminoácido diferente de tal forma que o polipéptido de ActRII variante se liga, de um modo preferido, ao GDF8, mas não à activina. De um modo preferido, o resíduo D60 é mudado para um resíduo de aminoácido seleccionado do grupo consistindo de: um resíduo de aminoácido não carregado, um resíduo de aminoácido negativo e um resíduo de aminoácido hidrófobo. Como será reconhecido por um especialista na técnica, a maioria das mutações, variantes ou modificações descritas podem ser feitas no nível do ácido nucleico ou, ou em alguns casos, por modificação pós-tradução ou síntese química. Tais técnicas são bem conhecidas na técnica.

Em determinadas formas de realização, a presente invenção contempla mutações específicas dos polipéptidos de ActRII de forma a alterar a glicosilação do polipéptido. Os sítios de glicosilação exemplificativos nos polipéptidos de ActRIIA e ActRIIB são ilustrados nas Figuras 3 e 4 respectivamente. Tais mutações podem ser seleccionadas de forma a introduzir ou eliminar um ou mais sítios de glicosilação, tais como sítios de glicosilação ligados a O ou ligados a N. Os sítios de reconhecimento de glicosilação ligados a asparagina compreendem geralmente uma sequência tripeptídica, asparagina-X-treonina (em que "X" é qualquer aminoácido) que é especificamente reconhecida por enzimas de glicosilação celular apropriadas. A alteração também pode ser feita pela adição ou substituição de um ou mais resíduos de serina ou treonina à sequência do polipéptido de ActRII de tipo selvagem (para sítios de glicosilação ligados a O). Uma variedade de substituições ou supressões de aminoácidos em uma ou ambas as posições do primeiro ou terceiro aminoácido

de um sítio de reconhecimento de glicosilação (e/ou supressão de aminoácido na segunda posição) resulta em não-glicosilação da sequência tripeptídica modificada. Outro meio de aumentar o número de porções de hidrato de carbono num polipéptido de ActRII é por acoplamento químico ou enzimático de glicósidos ao polipéptido de ActRII. Dependendo do modo de acoplamento utilizado, o(s) açúcar(es) pode(m) ser ligado(s) a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo livres; (c) grupos sulfidrilo livres tais como os de cisteína; (d) grupos hidroxilo livres tais como os de serina, treonina ou hidroxiprolina; (e) resíduos aromáticos tais como os de fenilalanina, tirosina ou triptofano; ou (f) um grupo amida de glutamina. Estes métodos são descritos no documento WO 87/05330 publicado em 11 de Set de 1987 e em Aplin e Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., p. 259-306. A remoção de uma ou mais porções de hidrato de carbono presentes num polipéptido de ActRII pode ser conseguida quimicamente e/ou enzimaticamente. A desglicosilação química pode envolver, por exemplo, exposição do polipéptido de ActRII ao composto ácido trifluorometanossulfónico ou um composto equivalente. Este tratamento resulta na clivagem da maioria ou todos os açúcares excepto o açúcar de ligação (N-acetilglucosamina ou N-acetilgalactosamina), enquanto deixa a sequência de aminoácidos intacta. A desglicosilação química é ainda descrita por Haldmuddin *et al.* (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 e por Edge *et al.* (1981) Anal. Biochem. 118:131. A clivagem enzimática de porções de hidrato de carbono nos polipéptidos de ActRII pode ser conseguida pela utilização de uma variedade de endo- e exo-glicosidases como descrito por Thotakura *et al.* (1987) Meth. Enzymol. 138:350. A sequência de um polipéptido de ActRII pode ser ajustada, consoante apropriado, dependendo do tipo de sistema de expressão utilizado, já que as células de mamífero, levedura, insectos e vegetais podem todas introduzir

padrões de glicosilação diferentes que podem ser afectados pela sequência de aminoácidos do péptido. Em geral, as proteínas ActRII a serem utilizadas em humanos serão expressadas numa linha celular de mamíferos que proporciona glicosilação apropriada, tais como linhas celulares HEK293 ou CHO, embora se preveja que também sejam úteis outras linhas celulares de expressão de mamífero.

Esta divulgação contempla ainda um método de geração de mutantes, em particular conjuntos de mutantes combinatórios de um polipéptido de ActRII, bem como mutantes de truncamento; as misturas de mutantes combinatórios são especialmente úteis para identificar sequências variantes funcionais. O objectivo de rastrear tais bibliotecas combinatórias pode ser, por exemplo, para gerar variantes do polipéptido de ActRII que possam actuar como agonistas ou antagonista, ou, alternativamente, que possuam novas actividades no seu conjunto. Uma variedade de ensaios de rastreio são proporcionados abaixo e tais ensaios podem ser utilizados para avaliar as variantes. Por exemplo, uma variante do polipéptido de ActRII pode ser pesquisada quanto à aptidão para se ligar a um polipéptido de ActRII, para impedir a ligação de um ligando de ActRII a um polipéptido de ActRII.

A actividade de um polipéptido de ActRII ou suas variantes também pode ser testada num ensaio baseado em células ou *in vivo*. Por exemplo, pode avaliar-se o efeito de uma variante do polipéptido de ActRII na expressão dos genes envolvidos na produção de osso num osteoblasto ou precursor. Consoante necessário, isto pode ser realizado na presença de uma ou mais proteínas de ligando de ActRII recombinantes (e. g., BMP7) e podem ser células transfectadas de forma a produzir um polipéptido de ActRII e/ou as suas variantes e, opcionalmente,

um ligando de ActRII. Do mesmo modo, um polipéptido de ActRII pode ser administrado a um ratinho ou outro animal, e podem ser avaliadas uma ou mais propriedades dos ossos, tais como densidade ou volume. Pode ser também avaliada a velocidade de cicatrização das fracturas ósseas. Analogamente, a actividade de um polipéptido de ActRII ou suas variantes pode ser testada em células do músculo, adipócitos e células de neurónio para qualquer efeito sobre o crescimento destas células, por exemplo, pelos ensaios descritos abaixo. Tais ensaios são bem conhecidos e rotina na técnica.

Podem ser produzidas variantes obtidas de forma combinatória que têm uma potência selectiva relativamente a um polipéptido de ActRII de ocorrência natural. Tais proteínas variantes, quando expressadas a partir de construções de ADN recombinante, podem ser utilizadas em protocolos de terapia génica. Do mesmo modo, a mutagénese pode dar origem a variantes que têm semi-vidas intracelulares dramaticamente diferentes daquelas correspondentes a um polipéptido de ActRII de tipo selvagem. Por exemplo, a proteína alterada pode ser tornada mais estável ou menos estável à degradação proteolítica ou outros processos celulares que resultam na destruição ou inactivação de outro modo de um polipéptido de ActRII nativo. Tais variantes, e os genes que as codificam, podem ser utilizadas para alterar os níveis de polipéptido de ActRII através da modulação da semi-vida dos polipéptidos de ActRII. Por exemplo, uma semi-vida curta pode dar origem a efeitos biológicos mais transitórios e, quando parte de um sistema de expressão indutível, pode permitir um controlo mais apertado dos níveis de polipéptido de ActRII recombinante dentro da célula.

Num caso preferido, a biblioteca combinatória é produzida por meio de uma biblioteca degenerada de genes que codificam uma biblioteca de polipéptidos em que cada um inclui, pelo menos, uma porção de sequências potenciais do polipéptido de ActRII. Por exemplo, uma mistura de oligonucleótidos sintéticos pode ser enzimaticamente ligada em sequências genéticas de tal forma que o conjunto degenerado de sequências potenciais de nucleótidos do polipéptido de ActRII pode ser expresso como polipéptidos individuais, ou alternativamente, como um conjunto de proteínas de fusão maiores (e. g., para apresentação em fago).

Existem muitas maneiras através das quais a biblioteca de homólogos potenciais pode ser produzida a partir de uma sequência oligonucleotídica degenerada. A síntese química de uma sequência genética degenerada pode ser realizada num sintetizador automático de ADN e os genes sintéticos serem depois ligados num vector for expressão apropriado. A síntese de oligonucleótidos degenerados é bem conhecida na técnica (ver, por exemplo, Narang, SA (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al., (1981) Recombinante ADN, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura et al., (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al., (1983) Nucleic Acid Res. 11:477). Tais técnicas têm sido utilizadas na evolução directa de outras proteínas (ver, por exemplo, Scott et al., (1990) Science 249:386-390; Roberts et al., (1992) PNAS USA 89:2429-2433; Devlin et al., (1990) Science 249: 404-406; Cwirla et al., (1990) PNAS USA 87: 6378-6382; bem como as Patentes U.S. N°: 5223409, 5198346 e 5096815).

Alternativamente, podem ser utilizadas outras formas de mutagenese para gerar uma biblioteca combinatória. Por exemplo,

as variantes do polipéptido de ActRII (formas agonista e antagonista) podem ser produzidas e isoladas a partir de uma biblioteca por rastreio utilizando, por exemplo, mutagénese de varrimento de alanina e semelhantes (Ruf *et al.*, (1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang *et al.*, (1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balint *et al.*, (1993) *Gene* 137:109-118; Grodberg *et al.*, (1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashima *et al.*, (1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892; Lowman *et al.*, (1991) *Biochemistry* 30:10832-10838; e Cunningham *et al.*, (1989) *Science* 244:1081-1085), por mutagénese de varrimento de unidade de ligação (Gustin *et al.*, (1993) *Virology* 193:653-660; Brown *et al.*, (1992) *Mol. Cell Biol.* 12:2644-2652; McKnight *et al.*, (1982) *Science* 232:316); por mutagénese de saturação (Meyers *et al.*, (1986) *Science* 232:613); por mutagénese de PCR (Leung *et al.*, (1989) *Método Cell Mol Biol* 1:11-19); ou por mutagénese aleatória, incluindo mutagénese química, etc. (Miller *et al.*, (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; e Greener *et al.*, (1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34). A mutagénese de varrimento de unidade de ligação, particularmente numa montagem combinatória, é um método atractivo para identificar formas truncadas (bioactivas) dos polipéptidos de ActRII. Numa forma de realização específica podem ser utilizados métodos semelhantes para preparar formas solúveis dos polipéptidos de ActRII, as quais podem actuar como agonistas ou antagonistas de funções do ActRII.

Na técnica é conhecida uma grande gama de técnicas para rastrear produtos génicos de bibliotecas combinatórias produzidas por mutações pontuais e truncamentos, e, quanto a isso, para rastrear bibliotecas de ADNc para produtos génicos que têm uma certa propriedade. Tais técnicas serão geralmente adaptáveis para rastreio rápido das bibliotecas de genes

produzidas pela mutagénese combinatória de polipéptidos de ActRII. As técnicas mais comuns utilizadas para rastrear grandes bibliotecas de genes compreendem tipicamente a clonagem da biblioteca de genes em vectores de expressão replicáveis, transformação das células apropriadas com a biblioteca de vectores resultante e a expressão dos genes combinatórios sob condições em que a detecção de uma actividade desejada facilita o isolamento relativamente fácil do vector que codifica o gene cujo produto foi detectado. Cada um dos ensaios exemplificativos descritos abaixo é adequado para análise e alto débito como necessário para rastrear um grande número de sequências degeneradas criadas pelas técnicas de mutagénese combinatória.

Em determinadas formas de realização, os polipéptidos de ActRII da presente invenção incluem peptidomiméticos. Como aqui utilizado, o termo "peptidomimético" inclui péptidos quimicamente modificados e moléculas semelhantes a péptidos que contêm aminoácidos de ocorrência não natural, peptóides e semelhantes. Os peptidomiméticos proporcionam várias vantagens em relação a um péptido, incluindo estabilidade melhorada quando administrados a um indivíduo. Os métodos para identificar um peptidomimético são bem conhecidos na técnica e incluem o rastreio de bases de dados que contêm bibliotecas de potenciais peptidomiméticos. Por exemplo, o Cambridge Structural Database contém uma colecção de mais de 300000 compostos que têm estruturas cristalinas conhecidas (Allen *et al.*, *Acta Crystallogr. Section B*, 35:2331 (1979)). Nos casos em que não estiver disponível qualquer estrutura cristalina de uma molécula alvo, pode ser produzida uma estrutura utilizando, por exemplo, o programa CONCORD (Rusinko *et al.*, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 29:251 (1989)). Outra base de dados, o Available Chemicals Directory (Molecular Design Limited, Informations Systems; San

Leandro Calif.), contém cerca de 100000 compostos que estão comercialmente disponíveis e também pode ser pesquisada para identificar potenciais peptidomiméticos dos polipéptidos de ActRII.

Para ilustrar, ao utilizar mutagênese de varrimento para mapear os resíduos de aminoácido de um polipéptido de ActRII que estão envolvidos na ligação a outra proteína, podem ser produzidos compostos peptidomiméticos que mimetizam os resíduos envolvidos na ligação. Por exemplo, podem ser produzidos análogos peptídicos não hidrolisáveis de tais resíduos utilizando benzodiazepina (e. g., ver Freidinger *et al.*, in *Peptides: Chemistry and Biology*, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Holanda, 1988), azepina (e. g., ver Huffman *et al.*, in *Peptides: Chemistry and Biology*, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Holanda, 1988), anéis de gama-lactama substituídos (Garvey *et al.*, in *Peptides: Chemistry and Biology*, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Holanda, 1988), pseudopéptidos de ceto-metileno (Ewenson *et al.*, (1986) *J. Med. Chem.* 29:295; e Ewenson *et al.*, in *Peptides: Structure and Function* (Proceedings do 9th American Peptide Symposium) Pierce Chemical Co. Rockland, IL, 1985), núcleos de dipéptido de volta b (Nagai *et al.*, (1985) *Tetrahedron Lett* 26:647; e Sato *et al.*, (1986) *J Chem Soc Perkin Trans 1*:1231), e b-aminoálcoois (Gordon *et al.*, (1985) *Biochem Biophys Res Commun* 126:419; e Dann *et al.*, (1986) *Biochem Biophys Res Commun* 134:71).

Em determinadas formas de realização, os polipéptidos de ActRII da invenção podem compreender ainda modificações pós-tradução além de qualquer uma que esteja naturalmente presente nos polipéptidos de ActRII. Tais modificações incluem, mas não estão limitados a, acetilação, carboxilação, glicosilação,

fosforilação, lipidação e acilação. Como uma consequência, os polipéptidos de ActRII modificados podem conter elementos de tipo não-aminoácido, tais como polietilenoglicóis, lípidos, poli- ou mono-sacáridos e fosfatos. Os efeitos de tais elementos de tipo não-aminoácido na funcionalidade de um polipéptido de ActRII podem ser testados como aqui descrito para outras variantes do polipéptido de ActRII. Quando um polipéptido de ActRII é produzido nas células clivando uma forma nascente do polipéptido de ActRII, o processamento pós-tradução também pode ser importante para dobragem e/ou funcionamento correctos da proteína. As diferentes células (tais como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 ou HEK293) têm maquinaria celular específica e mecanismos característicos para essas actividades de pós-tradução e podem ser escolhidas para garantir a modificação e processamento correctos dos polipéptidos de ActRII.

Em determinados aspectos, as variantes funcionais ou formas modificadas dos polipéptidos de ActRII incluem proteínas de fusão possuindo, pelo menos, uma porção dos polipéptidos de ActRII e um ou mais domínios de fusão. Os exemplos bem conhecidos desses domínios de fusão incluem, mas não estão limitados a, poli-histidina, Glu-Glu, glutathione-S-transferase (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G, uma região constante da cadeia pesada de imunoglobulina (Fc), proteína de ligação a maltose (MBP) ou albumina sérica humano. Pode ser seleccionado um domínio de fusão de forma a conferir uma propriedade desejada. Por exemplo, alguns domínios de fusão são particularmente úteis para isolamento das proteínas de fusão por cromatografia de afinidade. Para a finalidade de purificação por afinidade, são utilizadas matrizes relevantes para cromatografia de afinidade, tais como resinas conjugadas com glutathione, amilase, e níquel ou cobalto. Muitas destas matrizes estão

disponíveis na forma de "kit", tal como o sistema de purificação de GST da Pharmacia e o sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil com parceiros de fusão de (HIS₆). Como outro exemplo, um domínio de fusão pode ser seleccionado de forma a facilitar a detecção dos polipéptidos de ActRII. Os exemplos de tais domínios de detecção incluem as várias proteínas fluorescentes (e. g., GFP) bem como "marcadores de epítopo," as quais são geralmente sequências peptídicas curtas para as quais está disponível um anticorpo específico. Os marcadores de epítopo bem conhecidos para os quais estão prontamente disponíveis anticorpos monoclonais específicos incluem FLAG, hemaglutinina do vírus da gripe (HA) e marcadores c-myc. Em alguns casos, os domínios de fusão têm um sítio de clivagem por protease, tal como para o Factor Xa ou Trombina, o qual permite que a protease relevante digira parcialmente as proteínas de fusão e liberte, desse modo, as proteínas recombinantes a partir daquelas. As proteínas libertadas podem ser depois isoladas do domínio de fusão por separação cromatográfica posterior. Em determinadas formas de realização preferidas, um polipéptido de ActRII é fundido com um domínio que estabiliza o polipéptido de ActRII *in vivo* (um domínio "estabilizante"). Por "estabilizante" refere-se qualquer coisa que aumente a semi-vida no soro, independentemente de isso ser por causa de menor destruição, menor eliminação pelo rim ou outro efeito farmacocinético. Sabe-se que as fusões com a porção Fc de uma imunoglobulina conferem propriedades farmacocinéticas desejáveis a uma vasta gama de proteínas. Do mesmo modo, as fusões com albumina sérica humano podem conferir propriedades desejáveis. Outros tipos de domínios de fusão que podem ser seleccionados incluem domínios de multimerização (e. g., dimerização, tetramerização) e domínios funcionais (que conferem uma função biológica adicional, tal como estimulação adicional de crescimento de músculo).

Como um exemplo específico, a presente invenção proporciona uma proteína de fusão como um antagonista de GDF8 que compreende um domínio extracelular (e. g., ligação a GDF8) fundido com um domínio Fc (e. g., SEQ ID N°: 13).

```

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD(A) VSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A) VSNKALPVPPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
PFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHN(A) HYTQKSLSLSPGK*

```

De um modo preferido, o domínio Fc tem uma ou mais mutações em resíduos, tais como Asp-265, lisina 322 e Asn-434 (ver Figura 12). Em determinados casos, o domínio Fc mutante possuindo uma ou mais destas mutações (e. g., mutação Asp-265) tem aptidão reduzida para se ligar ao receptor Fcγ comparativamente a um domínio Fc de tipo selvagem. Noutro casos, o domínio Fc mutante possuindo uma ou mais destas mutações (e. g., mutação Asn-434) tem maior aptidão para se ligar ao receptor de Fc relacionado com a MHC de classe I (FcRN) em relação a um domínio Fc de tipo selvagem.

Entende-se que os vários elementos das proteínas de fusão podem estar organizados de qualquer maneira que seja coerente com a funcionalidade desejada. Por exemplo, um polipéptido de ActRII pode ser colocado em posição C-terminal relativamente a um domínio heterólogo ou, alternativamente, um domínio heterólogo pode ser colocado em posição C-terminal relativamente a um polipéptido de ActRII. O domínio do polipéptido de ActRII e o domínio heterólogo não têm de estar adjacentes numa proteína de fusão, e podem ser incluídos domínios ou sequências de

aminoácidos adicionais em posição C- ou N-terminal a qualquer um dos domínios ou entre os domínios.

Em determinadas formas de realização, os polipéptidos de ActRII da presente invenção contêm uma ou mais modificações que são capazes de estabilizar os polipéptidos de ActRII. Por exemplo, tais modificações melhoram a semi-vida *in vitro* dos polipéptidos de ActRII, melhoram a semi-vida circulatória dos polipéptidos de ActRII ou reduzem a degradação proteolítica dos polipéptidos de ActRII. Tais modificações estabilizadoras incluem, mas não estão limitadas a, proteínas de fusão (incluindo, por exemplo, proteínas de fusão compreendendo um polipéptido de ActRII e um domínio estabilizador), modificações de um sítio de glicosilação (incluindo, por exemplo, adição de um sítio de glicosilação a um polipéptido de ActRII) e modificações da porção de hidrato de carbono (incluindo, por exemplo, remoção de porções de hidrato de carbono de um polipéptido de ActRII). No caso de proteínas de fusão, um polipéptido de ActRII é fundido com um domínio estabilizador tal como uma molécula de IgG (e. g., um domínio Fc). Como aqui utilizado, a expressão "domínio estabilizador" refere-se não só a um domínio de fusão (e. g., Fc) como no caso das proteínas de fusão, mas inclui também modificações não proteicas tal como uma porção de hidrato de carbono, ou polímero não proteico, tal como polietilenoglicol.

Em determinadas formas de realização, a presente invenção torna disponível formas isoladas e/ou purificadas dos polipéptidos de ActRII, as quais estão isoladas ou, de outro modo, substancialmente isentas de outras proteínas.

Em determinadas formas de realização, os polipéptidos de ActRII (não modificados ou modificados) da invenção podem ser produzidos por uma variedade de técnicas conhecidas na matéria. Por exemplo, esses polipéptidos de ActRII podem ser sintetizados utilizando técnicas de química de proteínas padrão, tais como aquelas descritas em Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlim (1993) e Grant G. A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman e Company, Nova Iorque (1992). Além disso, encontram-se comercialmente disponíveis sintetizadores de péptidos automatizados (e. g., Advanced ChemTech Modelo 396; Milligen/Biosearch 9600). Alternativamente, os polipéptidos de ActRII, fragmentos ou as suas variantes podem ser produzidos de forma recombinante utilizando vários sistemas de expressão (e. g., *E. coli*, células de Ovário de Hamster Chinês, células COS, baculovírus) como é bem conhecido na técnica (ver também abaixo). Numa outra forma de realização, os polipéptidos de ActRII modificados ou não modificados podem ser produzidos por digestão de polipéptidos de ActRII de tamanho total naturais ou produzidos de forma recombinante utilizando, por exemplo, uma protease, e. g., tripsina, termolisina, quimiotripsina, pepsina ou enzima de conversão de aminoácidos básicos emparelhados (PACE). A análise computacional (utilizando um software comercialmente disponível, e. g., MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) pode ser utilizada para identificar sítios de clivagem proteolítica. Alternativamente, esses polipéptidos de ActRII podem ser produzidos a partir de polipéptidos de ActRII de tamanho total de ocorrência natural ou produzidos de forma recombinante tal como por técnicas correntes conhecidas na matéria, tal como por clivagem química (e. g., brometo de cianogénio, hidroxilamina).

3. Ácidos Nucleicos que Codificam Polipéptidos de ActRII

Em determinados aspectos, a invenção proporciona ácidos nucleicos isolados e/ou recombinantes que codificam quaisquer dos polipéptidos de ActRII da invenção (e. g., polipéptidos de ActRII solúveis), incluindo fragmentos, variantes funcionais e proteínas de fusão aqui divulgados. Por exemplo, as SEQ ID N°: 7-8 codificam polipéptidos precursores de ActRII de ocorrência natural, enquanto as SEQ ID N°: 5-6 codificam polipéptidos de ActRII solúveis. Os ácidos nucleicos em causa podem ser de cadeia simples ou de cadeia dupla. Tais ácidos nucleicos podem ser moléculas de ADN ou ARN. Estes ácidos nucleicos podem ser utilizados, por exemplo, em métodos de preparação de polipéptidos de ActRII ou como agentes terapêuticos directos (e. g., numa abordagem de terapia génica).

Em determinados aspectos, entende-se ainda que os ácidos nucleicos em causa que codificam os polipéptidos de ActRII incluem ácidos nucleicos que são variantes da SEQ ID N°: 7 ou 8. As sequências de nucleótidos variantes incluem sequências que diferem por uma ou mais substituições, adições ou supressões de nucleótidos, tais como as variantes alélicas; e, Consequentemente, incluirão sequências de codificação que diferem da sequência de nucleótidos da sequência de codificação designada na SEQ ID N°: 7 ou 8.

Em determinados casos, a divulgação proporciona sequências de ácido nucleico isoladas ou recombinantes que são, pelo menos, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 100% idênticas à SEQ ID N°: 5 ou 6. Um técnico médio na matéria aperceber-se-á que as sequências de ácido nucleico complementares à SEQ ID N°: 6 e as

variantes da SEQ ID N°: 6 também estão no âmbito desta invenção. Noutras formas de realização, as sequências de ácido nucleico da invenção podem ser isoladas, recombinantes e/ou fundidas com uma sequência de nucleótidos heteróloga ou numa biblioteca de ADN.

Noutros casos, os ácidos nucleicos da divulgação também incluem sequências de nucleótidos que hibridam em condições extremamente restritivas com a sequência de nucleótidos designada na SEQ ID N°: 5 ou 6, a sequência complemento da SEQ ID N°: 5 ou 6, ou fragmentos da mesma. Como discutido acima, um técnico médio na matéria compreenderá imediatamente que as condições de restrição apropriada que promovem a hibridação do ADN podem ser modificadas. Um técnico médio na matéria compreenderá imediatamente que as condições de restrição apropriada que promovem a hibridação do ADN podem ser modificadas. Por exemplo, poderia realizar-se a hibridação a 6,0 x cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) a cerca de 45 °C, seguida de uma lavagem com 2,0 x SSC a 50 °C. Por exemplo, a concentração de sal no passo de lavagem pode ser seleccionada de uma baixa restrição de cerca de 2,0 x SSC a 50°C a um alta restrição de cerca de 0,2 x SSC a 50 °C. Além disso, a temperatura no passo de lavagem pode ser aumentada de condições de baixa restrição à temperatura ambiente, cerca de 22 °C, para condições de alta restrição a cerca de 65 °C. A temperatura e o sal podem ser modificados, ou a temperatura ou concentração de sal pode ser mantida constante enquanto a outra variável é modificada. Num caso, a divulgação proporciona ácidos nucleicos que hibridam em condições de baixa restrição de 6 x SSC à temperatura ambiente seguida de uma lavagem a 2 x SSC à temperatura ambiente.

Os ácidos nucleicos isolados que diferem dos ácidos nucleicos como definidos na SEQ ID N°: 6 devido a degeneração no código genético também estão no âmbito da invenção. Por exemplo, um número de aminoácidos é designado por mais do que um triplete. Os codões que especificam o mesmo aminoácido, ou sinónimos (por exemplo, CAU e CAC são sinónimos para histidina) podem resultar em mutações "silenciosas" que não afectam a sequência de aminoácidos da proteína. No entanto, prevê-se que existirão polimorfismos da sequência de ADN que conduzem a alterações nas sequências de aminoácidos das proteínas em causa entre as células de mamífero. Um especialista na técnica aperceber-se-á que podem existir estas variações em um ou mais nucleótidos (até cerca de 3-5% dos nucleótidos) dos ácidos nucleicos que codificam uma proteína particular entre indivíduos de uma dada espécie devido a variação alélica natural. Todas e quaisquer variações de nucleótidos e polimorfismos de aminoácido resultantes estão no âmbito desta invenção.

Em determinadas formas de realização, os ácidos nucleicos recombinantes da invenção podem estar operativamente ligados a uma ou mais sequências de nucleótidos reguladoras numa construção de expressão. As sequências de nucleótidos reguladoras serão geralmente apropriadas à célula hospedeira utilizada para expressão. Numerosos tipos de vectores de expressão apropriados e sequências reguladoras adequadas são conhecidos na técnica para uma variedade de células hospedeiras. Tipicamente, as referidas uma ou mais sequências de nucleótidos reguladoras podem incluir, mas não estão limitadas a, sequências promotoras, sequências líder ou sinal, sítios de ligação ribossómicos, sequências de início e terminação da transcrição, sequências de início e terminação da tradução, e sequências intensificadoras ou activadoras. Os promotores constitutivos ou

indutíveis como conhecidos na técnica são contemplados pela invenção. Os promotores podem ser promotores de ocorrência natural ou promotores híbridos que combinam elementos de mais do que um promotor. Uma construção de expressão pode estar presente numa célula num epissoma, tal como um plasmídeo, ou a construção de expressão pode ser inserida num cromossoma. Numa forma de realização preferida, o vector de expressão contém um gene marcador seleccionável para permitir a selecção de células hospedeiras transformadas. Os genes marcadores seleccionáveis são bem conhecidos na técnica e variarão com a célula hospedeira utilizada.

Em determinados aspectos da invenção, o ácido nucleico em causa é proporcionado num vector de expressão compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido de ActRII e operativamente ligado a pelo menos uma sequência reguladora. As sequências reguladoras são reconhecidas na técnica e são seleccionadas para dirigir a expressão do polipéptido de ActRII. Consequentemente, o termo sequência reguladora inclui promotores, intensificadores, e outros elementos de controlo da expressão. Sequências reguladoras exemplificativas são descritas em Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por exemplo, nestes vectores pode ser utilizada qualquer uma de uma grande variedade de sequências de controlo de expressão que controlam a expressão de uma sequência de ADN quando operativamente ligada à mesma, para expressar sequências de ADN que codifica um polipéptido de ActRII. Tais sequências de controlo da expressão úteis, incluem, por exemplo, os promotores precoce e tardio de SV40, promotor tet, promotor precoce imediato de adenovírus ou citomegalovírus, promotores RSV, o sistema lac, o sistema trp, o sistema TAC ou TRC, promotor T7 cuja expressão é dirigida pela polimerase de

ARN T7, as regiões operadoras e promotoras principais do fago lambda, as regiões de controlo para a proteína do revestimento fd, o promotor para a 3-fosfoglicerato cinase ou outras enzimas glicolíticas, os promotores da fosfatase ácida, e. g., Pho5, os promotores dos factores de emparelhamento α da levedura, o promotor poliedro do sistema de baculovírus e outras sequências conhecidas por controlar a expressão de genes de células procarióticas ou eucarióticas ou seus vírus, e as suas várias associações. Deve ser entendido que a concepção do vector de expressão pode depender de factores tais como a escolha da célula hospedeira a ser transformada e/ou do tipo de proteína desejada a ser expressada. Além disso, deveriam ser também considerados o número de cópias do vector, a aptidão para controlar esse número de cópias e a expressão de qualquer outra proteína codificada pelo vector, tal como marcadores antibióticos.

Um ácido nucleico recombinante da invenção pode ser produzido ligando o gene clonado, ou uma sua porção, num vector adequado para expressão em células procarióticas, células eucarióticas (levedura, aviária, insecto ou mamífero) ou ambas. Os veículos de expressão para a produção de um polipéptido de ActRII recombinante incluem plasmídeos e outros vectores. Por exemplo, os vectores adequados incluem plasmídeos dos tipos: plasmídeos derivados de pBR322, plasmídeos derivados de pEMBL, plasmídeos derivados de pEX, plasmídeos derivados de pBTac e plasmídeos derivados de pUC para expressão em células procarióticas, tal como *E. coli*.

Alguns vectores de expressão de mamífero contêm sequências procarióticas para facilitar a propagação do vector em bactérias e uma ou mais unidades de transcrição eucarióticas que são

expressas em células eucarióticas. Os vectores derivados de pcDNAI/amp, pcDNAI/neo, pRcICMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo e pHyg são exemplos de vectores de expressão de mamífero adequados para a transfecção de células eucarióticas. Alguns destes vectores são modificados com sequências de plasmídeos bacterianos, tal como pBR322, para facilitar a replicação e a selecção por resistência a fármaco em células procarióticas e eucarióticas. Alternativamente, os derivados de vírus tal como o vírus do papiloma bovino (BPV-1), ou vírus Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP e p205) podem ser utilizados para expressão transitória de proteínas em células eucarióticas. Exemplos de outros sistemas de expressão virais (incluindo retrovirais) podem ser encontrados abaixo na descrição dos sistemas de administração de terapia génica. Os vários métodos utilizados na preparação dos plasmídeos e na transformação de organismos hospedeiros são bem conhecidos na técnica. Para outros sistemas de expressão adequados para células procarióticas e eucarióticas, bem como procedimentos recombinantes gerais, ver Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª Ed., ed. por Sambrook, Fritsch e Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) Capítulos 16 e 17. Em alguns casos, pode ser desejável expressar os polipéptidos recombinantes pela utilização de um sistema de expressão de baculovírus. Os exemplos de tais sistemas de expressão de baculovírus incluem vectores derivados de pVL (tais como pVL1392, pVL1393 e pVL941), vectores derivados de pAcUW (tal como pAcUW1) e vectores derivados de pBlueBac (tal como o pBlueBac III contendo β -gal).

Numa forma de realização preferida, será concebido um vector para a produção dos polipéptidos de ActRII em causa em células CHO, tal como um vector Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vectores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) e

vectores pCI-neo (Promega, Madison, Wisc.). Como será evidente, as construções de gene em causa podem ser utilizadas para provocar a expressão dos polipéptidos de ActRII em causa em células propagadas em cultura, e. g., para produzir proteínas, incluindo proteínas de fusão ou proteínas variantes, para purificação.

Esta invenção refere-se também a um célula hospedeira transfectada com um gene recombinante incluindo uma sequência de codificação (e. g., SEQ ID N°: 8) para um ou mais dos polipéptidos de ActRII em causa. A célula hospedeira pode ser qualquer célula procariótica ou eucariótica. Por exemplo, um polipéptido de ActRII da invenção pode ser expresso em células bacterianas, tais como *E. coli*, células de insecto (e. g., utilizando um sistema de expressão de baculovírus), levedura ou células de mamífero. Outras células hospedeiras adequadas são conhecidas dos especialistas na técnica.

Consequentemente, a presente invenção refere-se ainda a métodos de produção dos polipéptidos de ActRII em causa. Por exemplo, uma célula hospedeira transfectada com um vector de expressão que codifica um polipéptido de ActRII pode ser cultivada em condições apropriadas para permitir que ocorra a expressão do polipéptido de ActRII. O polipéptido de ActRII pode ser segregado e isolado a partir de uma mistura de células e meio contendo o polipéptido de ActRII. Alternativamente, o polipéptido de ActRII pode ser retido citoplasmicamente ou numa fracção da membrana e as células recolhidas, lisadas e a proteína isolada. Uma cultura celular inclui células hospedeiras, meios e outros produtos secundários. Os meios adequados para cultura celular são bem conhecidos na técnica. Os polipéptidos de ActRII em causa podem ser isolados a partir do meio de cultura celular, células hospedeiras ou ambos,

utilizando técnicas conhecidas na técnica para purificar proteínas, incluindo cromatografia de troca iónica, cromatografia de filtração em gel, ultrafiltração, electroforese e purificação por imunoafinidade com anticorpos específicos para epítomos particulares dos polipéptidos de ActRII. Numa forma de realização preferida, o polipéptido de ActRII é uma proteína de fusão contendo um domínio que facilita a sua purificação.

Noutra forma de realização, um gene de fusão que codifica uma sequência líder para purificação, tal como uma poli-(His)/sequência de sítio de clivagem pela enterocinase na extremidade N-terminal da porção desejada do polipéptido de ActRII recombinante, pode permitir a purificação da proteína de fusão expressa por cromatografia de afinidade utilizando uma resina de metal Ni^{2+} . A sequência líder para purificação pode ser então subsequentemente removida por tratamento com enterocinase para proporcionar o polipéptido de ActRII purificado (e. g., ver Hochuli *et al.*, (1987) *J. Chromatography* 411:177; e Janknecht *et al.*, *PNAS USA* 88:8972).

As técnicas para preparar genes de fusão são bem conhecidas. Essencialmente, é efectuada a junção de vários fragmentos de ADN que codificam sequências polipeptídicas diferentes de acordo com técnicas convencionais, utilizando terminais de extremidade romba ou extremidade escalonada para ligação, digestão com enzima de restrição para proporcionar os terminais apropriados, introdução de extremidades coesivas consoante apropriado, tratamento com fosfatase alcalina para impedir junção indesejável e ligação enzimática. Noutra forma de realização, o gene de fusão pode ser sintetizado por técnicas convencionais incluindo sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, a amplificação por PCR de fragmentos de

génicos pode ser realizada utilizando iniciadores âncora que originam saliências complementares entre dois fragmentos de génicos consecutivos que podem ser subsequentemente emparelhados para gerar uma sequência de gene quimérica (ver, por exemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

4. Anticorpos

Outro aspecto da divulgação refere-se a anticorpos. Um anticorpo que é especificamente reactivo com um polipéptido de ActRII (e. g., um polipéptido de ActRII solúvel) e que se liga de forma competitiva com o polipéptido de ActRII pode ser utilizado como um antagonista das actividades do polipéptido de ActRII. Por exemplo, utilizando imunogénios derivados de um polipéptido de ActRII podem ser preparados anti-soros anti-proteína/anti-péptido ou anticorpos monoclonais por protocolos correntes (ver, por exemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. por Harlow e Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Um mamífero, tal como um ratinho, um hamster ou coelho pode ser imunizado com uma forma imunogénica do polipéptido de ActRII, um fragmento antigénico que é capaz de desencadear uma resposta de anticorpos ou uma proteína de fusão. As técnicas para conferir imunogenicidade a uma proteína ou péptido incluem a conjugação com veículos ou outras técnicas bem conhecidas no campo técnico. Uma porção imunogénica de um polipéptido de ActRII pode ser administrada na presença de adjuvante. O progresso da imunização pode ser monitorizado pela detecção dos títulos de anticorpo no plasma ou soro. Podem ser utilizados ELISA corrente ou outros imunoensaios com o imunogénio como antigénio para avaliar os níveis de anticorpos.

Após imunização de um animal com uma preparação antigénica de um polipéptido de ActRII podem ser obtidos anti-soros e, se desejado, podem ser isolados anticorpos policlonais a partir do soro. Para produzir anticorpos monoclonais, as células produtoras de anticorpos (linfócitos) podem ser recolhidas de um animal imunizado e fundidas por procedimentos correntes de fusão de células somáticas com células imortalizadas, tais como células de mieloma para produzir células de hibridoma. Tais técnicas são bem conhecidas no campo técnico, e incluem, por exemplo, a técnica de hibridoma (originariamente desenvolvida por Kohler e Milstein, (1975) *Nature*, 256: 495-497), a técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbar *et al.*, (1983) *Immunology Today*, 4: 72) e a técnica EBV-hibridoma para produzir anticorpos monoclonais humanos (Cole *et al.*, (1985) *Monoclonal Antibodies and Câncer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. p. 77-96). As células de hibridoma podem ser rastreadas imunoquimicamente quanto à produção de anticorpos especificamente reactivos com um polipéptido de ActRII e anticorpos monoclonais isolados a partir de uma cultura compreendendo essas células de hibridoma.

O termo "anticorpo" como aqui utilizado pretende incluir os seus fragmentos que são também especificamente reactivos com um polipéptido de ActRII em causa. Os anticorpos podem ser fragmentados utilizando técnicas convencionais e os fragmentos rastreados quanto à utilidade da mesma maneira que a descrita acima para os anticorpos de tamanho totais. Por exemplo, os fragmentos $F(ab)_2$ podem ser produzidos tratando o anticorpo com pepsina. O fragmento $F(ab)_2$ resultante pode ser tratado para reduzir as pontes dissulfureto para produzir fragmentos Fab. É ainda pretendido que o anticorpo da presente divulgação inclua moléculas biespecíficas, de cadeia simples, e quiméricas e

humanizadas possuindo afinidade para um polipéptido de ActRII conferida por pelo menos uma região CDR do anticorpo. Em casos preferidos, o anticorpo compreende ainda um marcador ligada ao mesmo e que pode ser detectada (e. g., o marcador pode ser um radioisótopo, composto fluorescente, enzima ou cofactor de enzima).

Em determinados casos preferidos, um anticorpo da divulgação é um anticorpo monoclonal e, em determinados casos, a divulgação disponibiliza métodos para gerar novos anticorpos. Por exemplo, um método para gerar um anticorpo monoclonal que se liga especificamente a um polipéptido de ActRII pode compreender administrar a um ratinho uma quantidade de uma composição imunogénica compreendendo o polipéptido de ActRII eficaz para estimular uma resposta imunológica detectável, obter células produtoras de anticorpos (e. g., células do baço) a partir do ratinho e fundir as células produtoras de anticorpos com células de mieloma para obter hibridomas produtores de anticorpos e testar os hibridomas produtores de anticorpos para identificar um hibridoma que produz um anticorpo monoclonal que se liga especificamente ao polipéptido de ActRII. Uma vez obtido, um hibridoma pode ser propagado numa cultura celular, opcionalmente em condições de cultura em que as células derivadas de hibridoma produzem o anticorpo monoclonal que se liga especificamente ao polipéptido de ActRII. O anticorpo monoclonal pode ser purificado da cultura celular.

O adjectivo "especificamente reactivo com" como utilizado em referência a um anticorpo pretende significar, como é geralmente compreendido na técnica, que o anticorpo é suficientemente selectivo entre o antigénio de interesse (e. g., um polipéptido de ActRII) e outros antigénios que não são de

interesse, que o anticorpo é útil para, no mínimo, detectar a presença do antígeno de interesse num tipo particular de amostra biológica. Em determinados métodos que utilizam o anticorpo, tal como as aplicações terapêuticas, pode ser desejável um grau mais elevado de especificidade na ligação. Os anticorpos monoclonais têm geralmente uma maior tendência (em comparação com os anticorpos policlonais) para discriminar eficazmente entre os antígenos desejados e polipéptidos de reacção cruzada. Uma característica que influencia a especificidade de uma interacção anticorpo:antígeno é a afinidade do anticorpo para o antígeno. Embora a especificidade desejada possa ser alcançada com uma gama de afinidades diferentes, os anticorpos geralmente preferidos terão uma afinidade (uma constante de clivagem) de cerca de 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} ou menos.

Além disso, as técnicas utilizadas para rastrear anticorpos para identificar um anticorpo desejável podem influenciar as propriedades do anticorpo obtido. Por exemplo, se um anticorpo é para utilização para ligar um antígeno em solução, pode ser desejável testar a ligação em solução. Encontra-se disponível uma diversidade de técnicas diferentes para testar a interacção entre anticorpos e antígenos para identificar anticorpos particularmente desejáveis. Tais técnicas incluem ELISA, ensaios de ligação de ressonância plasmónica superficial (e. g., o ensaios de ligação Biacore, Bia-core AB, Uppsala, Suécia), ensaios em sanduíche (e. g., o sistema de esfera paramagnética de IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), transferências de Western, ensaios de imunoprecipitação e imuno-histoquímica.

Em determinados aspectos, a divulgação proporciona anticorpos que se ligam a um polipéptido de ActRII solúvel. Tais anticorpos podem ser produzidos essencialmente como descrito acima, utilizando um polipéptido de ActRII solúvel ou seu fragmento como um antigénio. Os anticorpos deste tipo podem ser utilizados, e. g., para detectar polipéptidos de ActRII em amostras biológicas e/ou para monitorizar os níveis de polipéptido de ActRII solúvel num indivíduo. Em determinados casos, um anticorpo que se liga especificamente a um polipéptido de ActRII solúvel pode ser utilizado para modular a actividade de um polipéptido de ActRII e/ou um ligando de ActRII, regulando (promovendo ou inibindo) desse modo o crescimento de tecidos, tais como osso, cartilagem, músculo, gordura e neurónios.

5. Ensaio de Rastreio

Em determinados aspectos, a presente divulgação refere-se à utilização dos polipéptidos de ActRII em causa (e. g., polipéptidos de ActRII solúveis) para identificar compostos (agentes) que são agonista ou antagonistas dos polipéptidos de ActRII. Os compostos identificados através deste rastreio podem ser testados em tecidos, tais como osso, cartilagem, músculo, gordura e/ou neurónios, para avaliar a sua aptidão para modular o crescimento de tecido *in vitro*. Opcionalmente, estes compostos podem ser ainda testados em modelos animais para avaliar a sua aptidão para modular o crescimento de tecido *in vivo*.

Existem numerosas abordagens para seleccionar agentes terapêuticos para modular o crescimento de tecido tendo como alvo os polipéptidos de ActRII. Em determinados casos pode ser realizado o rastreio de alto débito de compostos para

identificar agentes que perturbam os efeitos mediados pelo ActRII no crescimento do osso, cartilagem, músculo, gordura e/ou neurónio. Em determinados casos, o ensaio é realizado para seleccionar e identificar compostos que inibem ou reduzem especificamente a ligação de um polipéptido de ActRII ao seu parceiro de ligação, tal como um ligando de ActR-II (e. g., activina, Nodal, GDF8, GDF11 ou BMP7). Alternativamente, o ensaio pode ser utilizado para identificar compostos que melhoram a ligação de um polipéptido de ActRII à sua proteína de ligação, tal como um ligando de ActRII. Num outro caso, os compostos podem ser identificados pela sua aptidão para interagir com um polipéptido de ActRII.

Será suficiente uma variedade de formatos de ensaio e, à luz da presente divulgação, aqueles que não estão aqui expressamente descritos serão mesmo assim compreendidos por um técnico médio na matéria. Como aqui descrito, os compostos de ensaio (agentes) da divulgação podem ser criados por qualquer método químico combinatório. Alternativamente, os compostos em causa podem ser biomoléculas naturais sintetizadas *in vivo* ou *in vitro*. Os compostos (agentes) a serem testados quanto à sua aptidão para actuar como moduladores do crescimento de tecido podem ser produzidos, por exemplo, por bactérias, leveduras, plantas ou outros organismos (e. g., produtos naturais), produzidos quimicamente (e. g., moléculas pequenas, incluindo peptidomiméticos), ou produzidos de forma recombinante. Os compostos de ensaio contemplados pela presente divulgação incluem moléculas orgânicas não peptídicas, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, açúcares, hormonas e moléculas de ácido nucleico. Num caso específico, o agente de ensaio é uma molécula orgânica pequena possuindo um peso molecular inferior a cerca de 2000 Dalton.

Os compostos de ensaio da divulgação podem ser proporcionados como entidades discretas, simples ou proporcionados em bibliotecas de maior complexidade, tais como feitas por química combinatória. Estas bibliotecas podem compreender, por exemplo, álcoois, halogenetos de alquila, aminas, amidas, ésteres, aldeídos, éteres e outras classes de compostos orgânicos. A apresentação dos compostos de ensaio ao sistema de ensaio pode ser numa forma isolada ou como misturas de compostos, especialmente nos passos iniciais do rastreio. Opcionalmente, os compostos podem ser opcionalmente derivatizados com outros compostos e ter grupos de derivatização que facilitam o isolamento dos compostos. Os exemplos não limitativos dos grupos de derivatização incluem biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína fluorescente verde, isótopos, poli-histidina, esferas magnéticas, glutathione-S-transferase (GST), unidades de reticulação fotoactiváveis ou quaisquer combinações dos mesmos.

Em muitos programas de rastreio de fármacos que testam bibliotecas de compostos e extractos naturais são desejados ensaios de alto débito para maximizar o número de compostos analisados num dado intervalo de tempo. Os ensaios que são realizados em sistemas isentos de células, tal como pode ser derivado com proteínas purificadas ou semipurificadas, são frequentemente preferidos como rastreios "primários" pelo facto de poderem ser produzidos para permitir um desenvolvimento rápido e uma detecção relativamente fácil de uma alteração num alvo molecular que é mediado por um composto de ensaio. Além disso, os efeitos da toxicidade celular ou biodisponibilidade do composto de ensaio podem ser geralmente ignorados no sistema *in vitro*, estando em vez disso o ensaio principalmente focado no

efeito do fármaco no alvo molecular como pode ser manifestado numa alteração da afinidade de ligação entre um polipéptido de ActRII e a sua proteína de ligação (e. g., um ligando de ActRII).

Apenas para ilustrar, num ensaio de rastreio ilustrativo da presente divulgação, o composto de interesse é posto em contacto com um polipéptido de ActRII isolado e purificado que é normalmente capaz de se ligar a um ligando de ActRII, consoante apropriado para a intenção do ensaio. À mistura do composto e polipéptido de ActRII é, em seguida, adicionada uma composição contendo um ligando de ActRII. A detecção e quantificação dos complexos de ActRII/ligando de ActRII proporcionam um meio para determinar a eficácia do composto na inibição (ou potenciação) da formação do complexo entre o polipéptido de ActRII e a sua proteína de ligação. A eficácia do composto pode ser avaliada gerando curvas dose-resposta a partir dos dados obtidos utilizando várias concentrações do composto de ensaio. Além disso, também pode ser realizado um ensaio de controlo para proporcionar uma linha de base de comparação. Por exemplo, num ensaio de controlo, ligando de ActRII isolado e purificado é adicionado a uma composição contendo o polipéptido de ActRII, e a formação do complexo de ActRII/ligando de ActRII é quantificada na ausência do composto de ensaio. Entender-se-á que, em geral, a ordem pela qual os reagentes podem ser misturados pode ser modificada e podem ser misturados simultaneamente. Além disso, em vez de proteínas purificadas podem ser utilizados extractos celulares e lisados para fornecer um sistema de ensaio isento de células adequado.

A formação do complexo entre o polipéptido de ActRII e a sua proteína de ligação pode ser detectada por uma variedade de

técnicas. Por exemplo, modulação da formação de complexos pode ser quantificada utilizando, por exemplo, proteínas marcadas de forma detectável, tal como polipéptido de ActRII ou a sua proteína de ligação marcado radioactivamente (e. g., ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C ou ^3H), marcado fluorescentemente (e. g., FITC) ou marcado enzimaticamente, por um imunoensaio, ou por detecção cromatográfica.

Em determinados casos, a presente divulgação contempla a utilização de ensaios de polarização de fluorescência e ensaios transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET) medindo, directa ou indirectamente, o grau de interacção entre um polipéptido de ActRII e a sua proteína de ligação. Além disso, outros modos de detecção, tais como aqueles que se baseiam em guias de onda óptica (Publicação PCT WO 96/26432 e Pat. U.S. nº 5677196), ressonância plasmónica superficial (SPR), sensores de carga superficial e sensores de força superficial, são compatíveis com muitos exemplos da divulgação.

Além do mais, a presente divulgação considera a utilização de um ensaio de armadilha de interacção, também conhecido como o "ensaio de duplo híbrido," para identificar agentes que rompem ou potenciam a interacção entre um polipéptido de ActRII e a sua proteína de ligação. Ver, por exemplo, Pat. U.S. nº 5283317; Zervos *et al.* (1993) *Cell* 72:223-232; Madura *et al.* (1993) *J Biol Chem* 268:12046-12054; Bartel *et al.* (1993) *Biotechniques* 14:920-924; e Iwabuchi *et al.* (1993) *Oncogene* 8:1693-1696). Num caso específico, a presente divulgação considera a utilização de sistemas de duplo híbrido inverso para identificar compostos (e. g., moléculas pequenas ou péptidos) que dissociam interacções entre um polipéptido de ActRII e a sua proteína de ligação. Ver, por exemplo, Vidal e Legrain, (1999) *Nucleic Acid*

Res 27:919-29; Vidal e Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81; e Pat. U.S. N° 5525490; 5955280; e 5965368.

Em determinados casos, os compostos em causa são identificados pela sua aptidão para interagir com um polipéptido de ActRII da divulgação. A interacção entre o composto e o polipéptido de ActRII pode ser covalente ou não covalente. Por exemplo, essa interacção pode ser identificada ao nível da proteína utilizando métodos bioquímicos *in vitro*, incluindo fotorreticulação, ligação a ligando marcado radioactivamente e cromatografia de afinidade (Jakoby WB *et al.*, 1974, Methods in Enzymology 46: 1). Em determinados casos, os compostos podem ser rastreados num ensaio baseado no mecanismo, tal como um ensaio para detectar compostos que se ligam a um polipéptido de ActRII. Isto pode incluir um evento de ligação em fase sólida ou fase líquida. Alternativamente, o gene que codifica um polipéptido de ActRII pode ser transfectado com um sistema repórter (e. g., β -galactosidase, luciferase, ou proteína fluorescente verde) numa célula e rastreado contra a biblioteca, de um modo preferido, por um rastreio de alto débito ou com membros individuais da biblioteca. Podem ser utilizados outros ensaios de ligação baseados no mecanismo, por exemplo, ensaios de ligação que detectam alterações na energia livre. Os ensaios de ligação podem ser realizados com o alvo fixo num poço, esfera ou chip, ou capturado por um anticorpo imobilizado ou resolvido por electroforese capilar. Os compostos ligados podem ser geralmente detectados utilizando colorimetria ou fluorescência ou ressonância plasmónica superficial.

Em determinados aspectos, a presente invenção proporciona polipéptidos da invenção para estimular o crescimento do músculo e aumentar a massa muscular, por exemplo, antagonizando funções

de um ligando de ActRII. Consequentemente, qualquer composto identificado pode ser testado nas células de tamanho totais ou tecidos, *in vitro* ou *in vivo*, para confirmar a sua aptidão para modular o crescimento de músculo. Vários métodos conhecidos na técnica podem ser utilizados para este efeito. Por exemplo, os métodos da divulgação são realizados de tal forma que é reduzida ou inibida a transdução de sinal através de uma proteína ActRII activada por ligação a um ligando de ActRII (e. g., GDF8). Reconhecer-se-á que o crescimento de tecido muscular no organismo resultaria num aumento da massa muscular no organismo em comparação com a massa muscular de um organismo correspondente (ou população de organismos) no qual a transdução de sinal através de uma proteína ActRII não foi efectuada desse modo.

Por exemplo, o efeito dos polipéptidos de ActRII ou compostos de ensaio no crescimento/proliferação de células musculares pode ser determinado medindo a expressão génica de Pax-3 e Myf-5, as quais estão associadas à proliferação de células miogénicas, e a expressão génica da MyoD que está associada à diferenciação muscular (e. g., Amthor et al., Dev Biol. 2002,251:241-57). Sabe-se que o GDF8 regula negativamente a expressão génica de Pax-3 e Myf-5 e impede a expressão génica de MyoD. Prevê-se que os polipéptidos de ActRII ou compostos de ensaio antagonizam esta actividade de GDF8. Outro exemplo de ensaios baseados em células inclui a medição da proliferação de mioblastos, tais como mioblastos C(2)C(12) na presença dos polipéptidos de ActRII ou compostos de ensaio (e. g., Thomas et al., J Biol Chem. 2000, 275:40235-43).

A presente divulgação também considera ensaios *in vivo* para medir a massa e força muscular. Por exemplo, Whittemore et al.

(Biochem Biophys Res Commun. 2003, 300:965-71) divulga um método de medição do aumento da massa músculo-esquelético e aumento da força de aperto em ratinhos. Opcionalmente, este método pode ser utilizado para determinar efeitos terapêuticos dos compostos de ensaio (e. g., polipéptidos de ActRII) em doenças ou estados musculares, por exemplo, aquelas doenças para as quais a massa muscular é limitante.

Em determinados aspectos, a presente invenção proporciona polipéptidos da invenção para estimular a formação de osso e aumento da massa óssea. Consequentemente, qualquer composto identificado pode ser testado em células de tamanho totals ou tecidos, *in vitro* ou *in vivo*, para confirmar a sua aptidão para modular o crescimento de osso ou cartilagem. Vários métodos conhecidos na técnica podem ser utilizados para este efeito.

Por exemplo, o efeito dos polipéptidos de ActRII ou compostos de ensaio no crescimento de osso ou cartilagem pode ser determinado medindo a indução de Msx2 ou a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos em ensaios baseados em células (ver, e. g., Daluiski *et al.*, Nat Genet. 2001, 27(1):84-8; Hino *et al.*, Front Biosci. 2004,9:1520-9). Outro exemplo de ensaios baseados em células inclui a análise da actividade osteogénica dos polipéptidos de ActRII em causa e compostos de ensaio em células progenitoras mesenquimais e osteoblásticas. Para ilustrar, foram construídos adenovírus recombinantes que expressam um polipéptido de ActRII para infectar células progenitoras mesenquimais pluripotentes C3H10T1/2, células pré-osteoblásticas C2C12 e células osteoblásticas TE-85. A actividade osteogénica é em seguida determinada medindo a indução da fosfatase alcalina,

osteocalcina e mineralização da matriz (ver, e. g., Cheng et al., J bone Joint Surg Am. 2003, 85-A(8):1544-52).

A presente divulgação também considera ensaios *in vivo* para medir o crescimento de osso ou cartilagem. Por exemplo, Namkung-Matthai et al., Bone, 28:80-86 (2001) divulga um modelo osteoporótico em rato no qual é estudada a reparação do osso durante o período inicial após fractura. Kubo et al., Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 68:197-202 (1999) divulga também um modelo osteoporótico em rato no qual é estudada a reparação do osso durante o período tardio após fractura. Em determinados aspectos, a presente divulgação utiliza ensaios de cicatrização de fracturas que são conhecidos na técnica. Estes ensaios incluem a técnica de fractura, análise histológica e análise biomecânica, as quais são descritas em, por exemplo, Pat. U.S. nº 6521750.

Em determinados aspectos, a presente invenção proporciona polipéptidos da invenção para controlar o ganho de peso e a obesidade. Ao nível celular, a proliferação e diferenciação de adipócitos é crítica para o desenvolvimento de obesidade, as quais levam à geração de células adiposas adicionais (adipócitos). Consequentemente, qualquer composto identificado pode ser testado nas células de tamanho totals ou tecidos, *in vitro* ou *in vivo*, para confirmar a sua aptidão para modular a adipogénese medindo a proliferação ou diferenciação de adipócitos. Vários métodos conhecidos na técnica podem ser utilizados para este efeito. Por exemplo, o efeito de um polipéptido de ActRII (e. g., um polipéptido de ActRII solúvel) ou compostos de ensaio sobre a adipogénese pode ser determinado medindo a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos maduros em ensaios baseados em células, tais como, por

observação da acumulação de triacilglicerol em vesículas reveladas com Óleo Vermelho O e pelo aspecto de determinados marcadores de adipócitos tais como FABP (aP2/422) e PPAR γ 2. Ver, por exemplo, Reusch et al., 2000, Mol Cell Biol. 20:1008-20; Deng et al., 2000, Endocrinology. 141:2370-6; Bell et al., 2000, Obes Res. 8:249-54. Outro exemplo de ensaios baseados em células inclui a análise do papel de polipéptidos de ActRII e compostos de ensaio na proliferação de adipócitos ou células precursoras de adipócitos (e. g., células 3T3-L1), tal como, monotorizando células positivas para bromodesoxiuridina (BrdU). Ver, por exemplo, Pico et al., 1998, Mol Cell Biochem. 189:1-7; Masuno et al., 2003, Toxicol Sci. 75:314-20.

Entende-se que os ensaios de rastreio da presente divulgação aplicam-se não só aos polipéptidos de ActRII em causa e variantes dos polipéptidos de ActRII, mas também a quaisquer compostos de ensaio incluindo agonistas e antagonista dos polipéptidos de ActRII. Além disso, estes ensaios de rastreio são úteis para verificação do alvo do fármaco e para efeitos de controlo de qualidade.

6. Utilizações Terapêuticas Exemplificativas

Em determinadas formas de realização, as composições da presente invenção podem ser utilizadas para o tratamento ou prevenção de uma doença ou estado que está associada à actividade anómala de um polipéptido de ActRII e/ou um ligando de ActRII (e. g., GDF8). Estas doenças, distúrbios ou estados são geralmente aqui referidas como "condições associadas a ActRII." Em determinados casos, a presente divulgação proporciona métodos de tratamento ou prevenção de um indivíduo

necessitado do mesmo através da administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipéptido de ActRII como descrito acima. Estes métodos são particularmente destinados ao tratamento terapêutico e profiláctico de animais, e mais particularmente, humanos.

Como aqui utilizado, um agente terapêutico que "previne" um distúrbio ou estado refere-se a um composto que, numa amostra estatística, reduz a ocorrência do distúrbio ou estado na amostra tratada relativamente a uma amostra de controlo não tratada, ou atrasa o início ou reduz a gravidade de um ou mais sintomas do distúrbio ou estado relativamente à amostra de controlo não tratada. O termo "tratamento" como aqui utilizado inclui a profilaxia da condição indicada ou a melhoria ou eliminação da condição uma vez estabelecida.

Os complexos de ActRII/ligando de ActRII desempenham papéis essenciais no crescimento de tecido bem como nos processos de desenvolvimento inicial tal como a formação correcta de várias estruturas ou em uma ou mais capacidades pós-desenvolvimento incluindo desenvolvimento sexual, produção de hormona pituitária, e criação de osso e cartilagem. Assim, as condições associadas a ActRII incluem crescimento anómalo de tecido e defeitos do desenvolvimento. Além disso, as condições associadas a ActRII incluem, mas não estão limitados a, distúrbios do crescimento e diferenciação de células tais como inflamação, alergia, doenças auto-imunes, doenças infecciosas e tumores.

Os estados associados a ActRII exemplificativos incluem distúrbios neuromusculares (e. g., distrofia muscular e atrofia muscular), doença pulmonar obstrutiva congestiva, síndrome de perda de massa muscular, sarcopenia, caquexia, distúrbios do

tecido adiposo (e. g., obesidade), diabetes tipo 2 e doença degenerativa do osso (e. g., osteoporose). Outros estados associados a ActRII exemplificativas incluem distúrbios degenerativos do músculo e neuromusculares, reparação de tecido (e. g., cicatrização de feridas), doenças neurodegenerativas (e. g., esclerose lateral amiotrófica), distúrbios imunológicos (e. g., distúrbios relacionados com a proliferação ou funcionamento anómalo de linfócitos) e obesidade ou distúrbios relacionados com a proliferação anómala de adipócitos.

Em determinadas formas de realização, as composições da invenção são utilizadas como parte de um tratamento para uma distrofia muscular. O termo "distrofia muscular" refere-se a um grupo de doenças musculares degenerativas caracterizadas pelo enfraquecimento e deterioração graduais dos músculos-esqueléticos e por vezes dos músculos cardíaco e respiratório. As distrofias musculares são distúrbios genéticos caracterizados pela perda progressiva de massa muscular e fraqueza que começa com alterações microscópicas no músculo. À medida que os músculos degeneram ao longo do tempo, a força muscular da pessoa diminui. As distrofias musculares exemplificativas que podem ser tratadas com um régimen que inclui os polipéptidos de ActRII em causa incluem: Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), Distrofia Muscular de Becker (BMD), Distrofia Muscular de Emery-Dreifuss (EDMD), Distrofia Muscular de Limb-Girdle (LGMD), Distrofia Muscular Fascio-escápulo-humeral (FSH ou FSHD) (também conhecida como Landouzy-Dejerine), Distrofia Miotónica (MMD) (também conhecida como Doença de Steinert), Distrofia Muscular Oculofaríngea (OPMD), Distrofia Muscular Distal (DD), Distrofia Muscular Congénita (CMD).

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) foi descrita pela primeira vez pelo neurologista Francês Guillaume Benjamin Amand Duchenne nos anos de 1860. A Distrofia Muscular de Becker (BMD) é assim designada em homenagem ao médico Alemão Peter Emil Becker, que descreveu pela primeira vez esta variante da DMD nos anos de 1950. A DMD é uma das doenças hereditárias mais comuns entre seres masculinos, que afecta um em cada 3500 rapazes. A DMD ocorre quando o gene da distrofina, localizado num braço curto do cromossoma X, é quebrado. Uma vez que os seres masculinos têm apenas uma cópia do cromossoma X, eles têm apenas uma cópia do gene da distrofina. Sem a proteína distrofina, o músculo é facilmente danificado durante os ciclos de contracção e relaxamento. Apesar de no início da doença o músculo compensar por regeneração, mais tarde as células progenitoras musculares não conseguem lidar com o dano contínuo e o músculo saudável é substituído por tecido fibroadiposo não funcional.

A BMD resulta de diferentes mutações no gene da distrofina. Os doentes com BMD têm alguma distrofina, mas esta é insuficiente em quantidade ou fraca em qualidade. O ter alguma distrofina protege os músculos daqueles com BMD de degenerar de forma tão grave ou tão rapidamente quanto as pessoas com DMD.

Por exemplo, pesquisas recentes demonstram que o bloqueamento ou eliminação da função do GDF8 (um ligando de ActRII) *in vivo* pode tratar eficazmente pelo menos determinados sintomas em doentes com DMD e BMD (Bogdanovich *et al.*, supra; Wagner *et al.*, supra). Assim, os polipéptidos de ActRII em causa podem actuar como inibidores de GDF8 (antagonistas) e constituem um meio alternativo para bloquear as funções do GDF8 e/ou ActRII *in vivo* em doentes com DMD e BMD.

Analogamente, os polipéptidos de ActRII em causa proporcionam um meio eficaz para aumentar a massa muscular noutros estados patológicos que estão necessitados de crescimento de músculo. Por exemplo, Gonzalez-Cadavid *et al.* (*supra*) referiu que a expressão de GDF8 correlaciona inversamente com massa isenta de gordura em humanos e que o aumento da expressão génica do GDF8 está associado a perda de peso em homens com síndrome de perda de massa associada a SIDA. Ao inibir a função do GDF8 em doentes com SIDA podem ser aliviados, se não completamente eliminados, pelo menos determinados sintomas da SIDA, melhorando assim significativamente a qualidade de vida em doentes com SIDA.

Uma vez que a perda da função do GDF8 (um ligando de ActRII) também está associada a perda de gordura sem diminuição da ingestão de nutrientes (Zimmers *et al.*, *supra*; McPherron e Lee, *supra*), os polipéptidos de ActRII em causa podem ser ainda utilizados como um agente terapêutico para abrandar ou prevenir o desenvolvimento de obesidade e diabetes de tipo II.

A síndrome de anorexia-caquexia do cancro está entre os aspectos mais debilitantes e potencialmente fatais de cancro. A perda progressiva de peso na síndrome de anorexia-caquexia de cancro é uma característica comum de muitos tipos de cancro e é responsável não só por uma fraca qualidade de vida e resposta fraca à quimioterapia, mas também por um tempo de sobrevivência mais curto do que o encontrado em doentes com tumores comparáveis sem perda de peso. Associada à anorexia, gordura e perda de tecido muscular, sofrimento psicológico e uma qualidade de vida inferior, a caquexia resulta de uma interacção complexo entre o cancro e o hospedeiro. É uma das causas mais comuns de morte entre os doentes com cancro e está presente em 80% na

altura da morte. É um exemplo complexo de caos metabólico que afecta o metabolismo de proteínas, hidratos de carbono e gordura. Os tumores produzem anormalidades directas e indirectas, que resultam em anorexia e perda de peso. Actualmente, não há qualquer tratamento para controlar ou inverter o processo. A síndrome de anorexia-caquexia de cancro afecta a produção de citocina, a libertação de factores de mobilização de lípidos e indução da proteólise, e alterações no metabolismo intermediário. Embora a anorexia seja comum, uma diminuição na ingestão de alimentos por si só não é capaz de ser responsável pelas alterações na composição corporal observada em doentes com cancro e o aumento da ingestão de nutrientes não é capaz de inverter a síndrome de perda de massa. Deve suspeitar-se de caquexia em doentes com cancro se ocorrer uma perda de peso involuntária superior a cinco por cento do peso pré-mórbido num período inferior a seis meses.

Uma vez que se constatou que a sobreexpressão sistémica de GDF8 em ratinhos adultos induz perda profunda de músculo e gordura análoga à observada em síndromes de caquexia humana (Zimmers *et al.*, supra), os polipéptidos de ActRII em causa como composições farmacêuticas podem ser vantajosamente utilizados para prevenir, tratar ou aliviar os sintomas da síndrome de caquexia, onde é desejado o crescimento de músculo.

Noutras formas de realização, a presente invenção proporciona composições para induzir a formação de osso e/ou cartilagem, prevenir a perda óssea, aumentar a mineralização do osso ou prevenir a desmineralização do osso. Por exemplo, os polipéptidos de ActRII em causa da presente invenção têm aplicação no tratamento de osteoporose e na cicatrização de fracturas ósseas e defeitos da cartilagem em humanos e outros

animais. Os polipéptidos de ActRII podem ser úteis em doentes que são diagnosticados com densidade óssea baixa subclínica, como uma medida de protecção contra o desenvolvimento de osteoporose.

Numa forma de realização específica, as composições da presente invenção podem encontrar utilidade médica na cicatrização de fracturas ósseas e defeitos da cartilagem em humanos e outros animais. Os métodos e composições em causa também podem ter utilização profiláctica na redução de fracturas fechadas bem como expostas e também na fixação melhorada de articulações artificiais. A formação de osso de novo induzido por um agente osteogénico contribui para a reparação de defeitos craniofaciais congénitos, induzidos por traumatismo ou induzidos por ressecção oncológica, e é também útil em cirurgia plástica cosmética. Além disso, as composições da invenção podem ser utilizadas no tratamento de doença periodontal e noutros processos de reparação de dentes. Em determinados casos, os polipéptidos de ActRII em causa podem proporcionar um ambiente para atrair células formadoras de osso, estimular o crescimento de células formadoras de osso ou induzir a diferenciação de progenitores de células formadoras de osso. Os polipéptidos de ActRII da invenção também podem ser úteis no tratamento de osteoporose. Além disso, os polipéptidos de ActRII podem ser utilizados na reparação de defeitos da cartilagem e na prevenção/inversão de osteoartrite.

Noutra forma de realização específica, a invenção proporciona uma composição terapêutica para reparar fracturas e outros estados relacionados com defeitos da cartilagem e/ou osso ou doenças periodontais. A divulgação proporciona ainda métodos e composições terapêuticos para a cicatrização de feridas e reparação de tecido. Os tipos de feridas incluem, mas não estão

limitados a, queimaduras, incisões e úlceras. Ver e. g., Publicação PCT nº WO84/01106. Tais composições compreendem uma quantidade terapêuticamente eficaz de pelo menos um dos polipéptidos de ActRII da invenção em mistura com um veículo, veículo ou matriz farmacêuticamente aceitável.

Noutra forma de realização específica, as composições da invenção podem ser aplicadas a estados que originam perda óssea tais como osteoporose, hiperparatireoidismo, doença de Cushing, tireotoxicose, estado diarreico crónico ou malabsorção, acidose tubular renal ou anorexia nervosa. Muitas pessoas sabem que o ser feminino, possuir um baixo peso corporal e levar um estilo de vida sedentário são factores de risco para osteoporose (perda de densidade mineral óssea, que conduzem a risco de fractura). No entanto, a osteoporose também pode resultar da utilização prolongada de determinadas medicações. A osteoporose resultante de fármacos ou outro estado clínico é conhecida como osteoporose secundária. Num estado conhecido como doença de Cushing, a quantidade excessiva de cortisol produzida pelo corpo resulta em osteoporose e fracturas. As medicações mais comuns associadas à osteoporose secundária são os corticosteróides, uma classe de fármacos que actuam como o cortisol, uma hormona produzida naturalmente pelas glândulas supra-renais. Embora sejam necessários níveis adequados de hormonas tiroideias (as quais são produzidas pela glândula tiróide) para o desenvolvimento do esqueleto, o excesso de hormona tiroideia pode diminuir a massa óssea ao longo do tempo. Os antiácidos que contêm alumínio podem levar a perda óssea quando tomados em doses elevadas por pessoas com problemas renais, em particular aquelas que fazem diálise. Outras medicações que podem provocar osteoporose secundária incluem fenitoína (Dilantin) e barbituratos que são utilizados para prevenir ataques apoplécticos; metotrexato (Rheumatrex,

Immunex, Folex PFS), um fármaco para algumas formas de artrite, cancro e distúrbios imunológicos; ciclosporina (Sandimmune, Neoral), um fármaco utilizado para tratar algumas doenças auto-imunes e para suprimir o sistema imunitário em doentes com transplante de órgão; agonistas da hormona de libertação da hormona luteinizante (Lupron, Zoladex), utilizado para tratar cancro da próstata e endometriose; heparina (Calciparine, Liquaemin), uma medicação anticoagulante; e colestiramina (Questran) e colestipol (Colestid), utilizados para tratar colesterol elevado. A doença das gengivas provoca perda óssea porque estas bactérias prejudiciais nas nossas bocas forçam os nossos organismos a defenderem-se das mesmas. As bactérias produzem toxinas e enzimas debaixo da linha da gengiva, originando uma infecção crónica.

Num outro caso, a presente divulgação proporciona métodos e agentes terapêuticos para o tratamento de doenças ou distúrbios associados a crescimento ósseo anómalo ou indesejado. Por exemplo, os doentes com a doença conhecida como Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP) desenvolvem um "segundo esqueleto" anómalo que impede qualquer movimento. Além disso, o crescimento ósseo anómalo pode ocorrer após cirurgia de substituição da anca e arruinar desse modo o resultado da cirúrgica. Este é um exemplo mais comum de crescimento ósseo patológico e de uma situação em que os métodos e composições em causa podem ser terapêuticamente úteis. Os mesmos métodos e composições também podem ser úteis para o tratamento de outras formas de crescimento ósseo anómalo (e. g., crescimento patológico de osso após traumatismo, queimaduras ou lesão da medula espinal), e para o tratamento ou prevenção de estados indesejáveis associadas ao crescimento ósseo anómalo observado em relação com cancro metastático da próstata ou osteossarcoma. Os exemplos

destes agentes terapêuticos incluem, mas não estão limitados a, polipéptidos de ActRII que antagonizam a função de um ligando de ActRII (e. g., BMP7), compostos que rompem a interacção entre um ActRII e o seu ligando (e. g., BMP7) e anticorpos que se ligam especificamente a um receptor ActRII de tal forma que um ligando de ActRII (e. g., BMP7) não se pode ligar ao receptor ActRII.

Noutras formas de realização, a presente invenção proporciona composições para regular o teor de gordura corporal num animal e para tratar ou prevenir estados relacionados com aquele, e particularmente, estados que comprometem a saúde relacionadas com aquele. De acordo com a presente invenção, para regular (controlar) o peso corporal pode referir-se à redução ou aumento de peso corporal, redução ou aumento da taxa de ganho de peso, ou aumento ou redução da taxa de perda de peso, e inclui também manter activamente, ou não mudar significativamente o peso corporal (e. g., contra influências externas ou internas que de outro modo aumentariam ou diminuiriam o peso corporal). Uma forma de realização da presente invenção refere-se à regulação do peso corporal administrando um polipéptido de ActRII a um animal (e. g., um humano) necessitado do mesmo.

Numa forma de realização específica, a presente invenção refere-se a polipéptidos para reduzir o peso corporal e/ou reduzir o ganho de peso num animal, e mais particularmente, para o tratamento ou melhoramento da obesidade em doentes em risco de sofrer ou que sofrem de obesidade. Noutro caso específico, a presente divulgação é dirigida a métodos e compostos para o tratamento de um animal que não é capaz de ganhar ou reter peso (e. g., um animal com uma síndrome de perda de massa). Tais métodos são eficazes para aumentar o peso e/ou massa corporal, ou para reduzir a perda de peso e/ou massa, ou para melhorar

estados associados ou provocados por um peso e/ou massa corporal indesejavelmente baixo (e. g., doentio).

Noutras formas de realização, os polipéptidos de ActRII em causa podem ser utilizados para preparar composições farmacêuticas que podem ser vantajosamente utilizadas para prevenir, tratar ou aliviar sintomas de um hospedeiro de doenças que envolvem neurodegenerescência. Embora não se pretenda ficar limitado por qualquer teoria particular, os polipéptidos de ActRII em causa podem antagonizar o mecanismo inibidor de retorno mediado através do receptor ALK7 de tipo I, permitindo assim o crescimento e diferenciação de novos neurónios. Os polipéptidos de ActRII em causa como composições farmacêuticas podem ser vantajosamente utilizados para prevenir, tratar ou aliviar sintomas de doenças com neurodegenerescência, incluindo doença de Alzheimer (AD), doença de Parkinson (PD), Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS) e doença de Huntington (HD).

A AD é um distúrbio crónico, incurável e imparável do sistema nervoso central (SNC) que ocorre gradualmente, resultando em perda de memória, comportamento fora do comum, alterações da personalidade e um declínio nas aptidões de pensamento. Estas perdas estão relacionadas com a morte de tipos específicos de células cerebrais e com a destruição das conexões entre as mesmas. A AD foi descrita como o desenvolvimento infantil em sentido inverso. Na maioria das pessoas com AD, os sintomas surgem após os 60 anos de idade. Os sintomas mais precoces incluem perda de memória recente, julgamento erróneo e alterações na personalidade. Mais tarde na doença, os indivíduos com AD podem esquecer como fazer tarefas simples como lavar as mãos. Eventualmente, as pessoas com AD perdem todas as suas aptidões de raciocínio e tornam-se dependentes de outras pessoas

para os seus cuidados diários. Finalmente, a doença torna-se tão debilitante que os doentes são acamados e tipicamente desenvolvem doenças coexistentes. Muito geralmente, os doentes com AD morrem de pneumonia, 8 a 20 anos a partir do início da doença.

A PD é um distúrbio crónico, incurável e imparável do SNC que ocorre gradualmente e resulta em movimentos não controlados do corpo, rigidez, tremor e dificuldades em andar. Estes problemas do sistema motor estão relacionados com a morte de células cerebrais numa área do cérebro que produz dopamina, uma substância química que ajuda a controlar a actividade muscular. Na maioria das pessoas com PD, os sintomas surgem após os 50 anos de idade. Os sintomas iniciais de PD são um tremor acentuado que afecta os membros, especialmente nas mãos ou lábios. Os sintomas posteriores característicos de PD são ancilose ou lentidão de movimento, um caminhar a arrastar os pés, postura parada e equilíbrio enfraquecido. Existe uma grande variedade de sintomas secundários, tais como perda de memória, demência, depressão, alterações emocionais, dificuldades de deglutição, discurso anómalo, disfunção sexual, e problemas de bexiga e intestino. Estes sintomas começarão a interferir com as actividades de rotina, tal como segurar um garfo ou ler um jornal. Finalmente, as pessoas com PD tornam-se tão profundamente incapacitadas que são acamadas. As pessoas com PD morrem geralmente de pneumonia.

A ALS, também chamada doença de Lou Gehrig (doença do neurónio motor) é um distúrbio crónico, incurável e imparável do SNC que ataca os neurónios motores, componentes do SNC que ligam o cérebro aos músculos-esqueléticos. Na ALS, os neurónios motores deterioram-se e eventualmente morrem, e apesar do

cérebro da pessoa permanecer normalmente em funcionamento e alerta completos, o comando para mexer nunca chega aos músculos. A maioria das pessoas que desenvolve ALS está entre os 40 e 70 anos de idade. Os primeiros neurónios motores que enfraquecem são aqueles que ligam aos braços ou pernas. Aqueles com ALS podem ter dificuldade de caminhar, podem deixar cair coisas, cair, má articulação de discurso, e rir ou chorar incontrolavelmente. Eventualmente, os músculos dos membros começam a atrofiar pelo desuso. Esta fraqueza muscular tornar-se-á debilitante e a pessoa necessitará de uma cadeira de rodas ou tornar-se-á incapaz de funcionar fora da cama. A maioria dos doentes com ALS morre de insuficiência respiratória ou de complicações da assistência do ventilador como pneumonia, 3-5 anos a partir do início da doença.

As causas destas doenças neurológicas têm permanecido em grande parte desconhecidas. Elas são convencionalmente definidas como doenças distintas, apesar de exibirem claramente semelhanças extraordinárias nos processos básicos e demonstrarem geralmente sintomas sobrepostos muito maiores do que seriam esperados pelo mero acaso. As definições actuais da doença falham em lidar adequadamente com a questão da sobreposição e tem sido pedida uma nova classificação dos distúrbios neurodegenerativos.

A HD é outra doença neurodegenerativa resultante de degenerescência geneticamente programada dos neurónios em determinadas áreas do cérebro. Esta degenerescência provoca movimentos descontrolados, perda de faculdades intelectuais e perturbação emocional. A HD é uma doença familiar, transmitida de pais para filhos através de uma mutação dominante no gene de tipo selvagem. Alguns sintomas iniciais da HD são alterações de

humor, depressão, irritabilidade ou problemas de condução, aprendizagem de novas coisas, memória de um facto ou tomar uma decisão. À medida que a doença progride, a concentração nas tarefas intelectuais torna-se crescentemente difícil e o doente pode ter dificuldade em se alimentar e deglutir. A taxa de progressão da doença e a idade de início varia de pessoa para pessoa.

A doença de Tay-Sachs e a doença de Sandhoff são doenças de conservação de glicolípidos provocadas pela falta de β -hexosaminidase lisossómica (Gravel *et al.*, in *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, eds. Scriver *et al.*, McGraw-Hill, Nova Iorque, p. 2839-2879, 1995). Em ambos os distúrbios, o gangliósido GM2 e os substratos glicolipídicos relacionados para a β -hexosaminidase acumulam-se no sistema nervoso e desencadeiam neurodegenerescência aguda. Nas formas mais graves, o início dos sintomas começa na primeira infância. Segue-se um curso neurodegenerativo precipitoso, com as crianças afectadas a apresentar disfunção motora, ataque apopléctico, perda visual e surdez. A morte geralmente ocorre pelos 2-5 anos de idade. Foi demonstrada perda neuronal através de um mecanismo apoptótico (Huang *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* 6: 1879-1885, 1997).

Sabe-se bem que a apoptose desempenha um papel na patogénese da SIDA no sistema imunitário. No entanto, o HIV-1 também induz doença neurológica. Shi *et al.* (*J. Clin. Invest.* 98: 1979-1990, 1996) analisou a apoptose induzida pela infecção do sistema nervoso central (SNC) pelo HIV num modelo *in vitro* e no tecido do cérebro de doentes com SIDA, e determinou que a infecção por HIV-1 de culturas primárias do cérebro induziu a apoptose em neurónios e astrócitos *in vitro*. A apoptose de neurónios e astrócitos foi também detectada em tecido do cérebro

de 10/11 doentes com SIDA, incluindo 5/5 doentes com demência pelo HIV-1 e 4/5 doentes não dementes.

A perda neuronal é também uma característica saliente da doenças de priões, tal como a doença de Creutzfeldt-Jakob em humanos, BSE em gado bovino (doença das vacas loucas), Doença de Scrapie em ovelhas e cabras, e encefalopatia espongiforme felina (FSE) em gatos.

Os polipéptidos de ActRII em causa também são úteis para prevenir, tratar e aliviar sintomas de vários distúrbios do SNP, tais como os descritos abaixo. O SNP é composto pelos tecidos nervosos que vão para, ou ramificam a partir, do SNC. Os tecidos nervosos periféricos lidam com uma matriz variada de funções no corpo, incluindo funções sensoriais, motoras e autónomas. Quando um indivíduo tem uma neuropatia periférica, os tecidos nervosos do SNP foram danificados. Os danos nos tecidos nervosos podem resultar de um número de causas, tais como doença, lesão física, envenenamento ou desnutrição. Estes agentes podem afectar os nervos aferentes ou eferentes. Dependendo da causa do dano, o axónio da célula nervosa, o seu revestimento de protecção de mielina ou ambos podem ser danificados ou destruídos.

A expressão "neuropatia periférica" abrange uma grande gama de distúrbios nos quais foram danificados os tecidos nervosos fora do cérebro e medula espinal - os tecidos nervosos periféricos. A neuropatia periférica também pode ser referida como nevrite periférica, ou se estiverem envolvidos muitos tecidos nervosos, podem ser utilizados os termos polineuropatia ou polinevrite.

A neuropatia periférica é um distúrbio disseminado, e existem muitas causas subjacentes. Algumas destas causas são comuns, tal como a diabetes, e outras são extremamente raras, tal como o envenenamento por acrilamida e determinados distúrbios hereditários. A causa mundial mais comum de neuropatia periférica é a lepra. A lepra é provocada pela bactéria *Mycobacterium leprae*, a qual ataca os tecidos nervosos periféricos das pessoas afectadas. De acordo com estatísticas recolhidas pela Organização Mundial de Saúde, um número estimado de 1,15 milhões de pessoas tem lepra em todo o mundo.

A lepra é extremamente rara nos estados Unidos, onde a diabetes é a causa mais geralmente conhecida de neuropatia periférica. Foi estimado que mais do que 17 milhões de pessoas nos estados Unidos e Europa têm diabetes relacionadas com polineuropatia. Muitas neuropatias são idiopáticas - não pode ser encontrada qualquer causa conhecida. A mais comum das neuropatias periféricas hereditárias nos estados Unidos é a doença de Charcot-Marie-Tooth, a qual afecta aproximadamente 125000 pessoas.

Outra das neuropatias periféricas melhor conhecidas é a síndrome de Guillain-Barré, a qual resulta de complicações associadas a doenças virais, tais como citomegalovírus, vírus Epstein-Barr e vírus da imunodeficiência humana (HIV), ou infecção bacteriana, incluindo *Campylobacter jejuni* e doença de Lyme. A taxa de incidência mundial é de aproximadamente 1,7 casos por 100 000 pessoas por ano. Outras causas bem conhecidas de neuropatias periféricas incluem o alcoolismo crónico, infecção pelo vírus varicella-zoster, botulismo e poliomielite. A neuropatia periférica pode desenvolver-se como um sintoma primário ou pode ser devida a outra doença. Por exemplo, a

neuropatia periférica é apenas um sintoma de doenças, tais como neuropatia amilóide, determinados cancros ou distúrbios neurológicos hereditários. Tais doenças podem afectar o sistema nervoso periférico (SNP) e o sistema nervoso central (SNC), bem como outros tecidos corporais.

Outras doenças do SNP que podem ser tratadas com os polipéptidos de ActRII em causa incluem: Neuropatias do Plexo Braquial (doenças das raízes cervical e primeira torácica, troncos nervosos, cordões e componentes dos tecidos nervosos periféricos do plexo braquial. As manifestações clínicas incluem dor regional, parestesia; fraqueza muscular e menor sensação na extremidade superior. Estes distúrbios podem estar associados a traumatismo, incluindo lesões de parto; síndrome da saída torácica; neoplasmas, nevrite, radioterapia; e outros estados. Ver Adams et al., Principles of Neurology, 6th ed, p. 1351-2); Neuropatias Diabéticas (periférica, autónoma e distúrbios do nervo craniano que estão associadas a diabetes mellitus). Em geral, estas condições resultam de lesão microvascular diabética envolvendo pequenos vasos sanguíneos que abastecem os tecidos nervosos (vasa nervorum). Estados relativamente comuns que podem estar associados à neuropatia diabética incluem paralisia do terceiro nervo; mononeuropatia; mononeuropatia múltipla; amiotrofia diabética; uma polineuropatia dolorosa; neuropatia autónoma; e neuropatia toracoabdominal (ver Adams et al., Principles of Neurology, 6ª ed, p1325); mononeuropatias (doença ou traumatismo envolvendo um único nervo periférico isolado ou fora de proporção relativamente à evidência de disfunção nervosa periférica difusa). A mononeuropatia múltipla refere-se a um estado caracterizado por lesões nervosas isoladas múltiplas. As mononeuropatias podem resultar de uma grande variedade de causas, incluindo isquemia; lesão traumática; compressão;

doenças do tecido conjuntivo; distúrbios de traumatismo acumulativo; e outros estados); Nevralgia (dor intensa ou dor dolorosa que ocorre ao longo do curso ou distribuição de um nervo periférico ou craniano); Neoplasmas do Sistema Nervoso Periférico (neoplasmas que surgem no tecido nervoso periférico. Isto inclui neurofibromas; Schwannomas; tumores de células granulares; e tumores malignos do revestimento dos tecidos nervosos periféricos. Ver DeVita Jr et al., Cancer: Principles and Practice of Oncology, 5^a ed, p. 1750-1); Síndromes de Compressão de Tecido Nervoso (compressão mecânica de tecidos nervosos ou raízes nervosas de causas internas ou externas. Isto pode resultar num bloqueio da condução dos impulsos nervosos, devido a, por exemplo, disfunção do revestimento de mielina ou perda axónica. As lesões dos tecidos nervosos e revestimento dos tecidos nervosos pode ser provocada por isquemia; inflamação; um efeito mecânico directo; ou Nevrite (um termo geral que indica inflamação de um tecido nervoso periférico ou craniano). A manifestação clínica pode incluir dor; parestesias; paresia; ou hipertesia; Polineuropatias (doenças de múltiplos tecidos nervosos periféricos). As várias formas são classificadas pelo tipo de tecido nervoso afectado (e. g., sensorial, motor ou autónomo), pela distribuição da lesão nervosa (e. g., distal vs. proximal), pelo componente nervoso principalmente afectado (e. g., desmielinizante vs. axónico), pela etiologia, ou pelo padrão hereditário.

7. Composições Farmacêuticas

Em determinadas formas de realização, os polipéptidos de ActRII da presente invenção são formulados com um veículo farmacêuticamente aceitável. Por exemplo, um polipéptido de

ActRII pode ser administrado sozinho ou como um componente de uma formulação farmacêutica (composição terapêutica). Os compostos em causa podem ser formulados para administração de qualquer modo conveniente para ser utilizada em medicina humana ou veterinária.

Em determinados casos, o método terapêutico da divulgação inclui administrar a composição por via tópica, sistémica ou local como um implante ou dispositivo. Quando administrada, a composição terapêutica a ser utilizado nesta invenção está, evidentemente, numa forma apirogénica, fisiologicamente aceitável. Além disso, a composição pode ser desejavelmente encapsulada ou injectada numa forma viscosa para administração num sítio tecidual alvo (e. g., osso, cartilagem, músculo, gordura ou neurónio), por exemplo, um sítio possuindo um dano tecidual. A administração tópica pode ser adequada para a cicatrização de feridas e reparação de tecido. Os agentes terapeuticamente úteis diferentes dos polipéptidos de ActRII que possam ser também opcionalmente incluídos na composição como descrita acima, podem, alternativa ou adicionalmente, ser administrados simultânea ou sequencialmente com os compostos em causa (e. g., polipéptidos de ActRII) nos métodos da divulgação.

Em determinadas formas de realização, as composições da presente invenção podem incluir uma matriz capaz de administrar um ou mais compostos terapêuticos (e. g., polipéptidos de ActRII) a um sítio tecidual alvo (e. g., osso, cartilagem, músculo, gordura ou neurónio), proporcionando uma estrutura para o desenvolvimento de tecido e, numa situação óptima, capaz de ser reabsorvida pelo corpo. Por exemplo, a matriz pode proporcionar uma libertação lenta dos polipéptidos de ActRII. Tais matrizes podem ser preparadas a partir de materiais

presentemente utilizados para outras aplicações médicas implantadas.

A escolha do material da matriz baseia-se na biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades mecânicas, aspecto cosmético e propriedades de interface. A aplicação particular das composições em causa definirá a formulação apropriada. As matrizes potenciais para as composições podem ser sulfato de cálcio, fosfato tricálcico, hidroxiapatite, poli(ácido láctico) e polianidridos biodegradáveis e quimicamente definidos. Outros materiais potenciais são biodegradáveis e biologicamente bem definidos, tal como osso ou colagénio dérmico. Outras matrizes são constituídas por proteínas puras ou componentes da matriz extracelular. Outras matrizes potenciais são não biodegradáveis e quimicamente definidas, tais como hidroxiapatite sinterizada, biovidro, aluminatos ou outras cerâmicas. As matrizes podem ser constituídas por combinações de quaisquer dos tipos de material supramencionados, tais como poli(ácido láctico) e hidroxiapatite ou colagénio e fosfato tricálcico. As biocerâmicas podem ser alteradas em termos de composição, tal como no cálcio-aluminato-fosfato e processadas para alterar o tamanho de poro, tamanho de partícula, forma de partícula e biodegradabilidade.

Em determinadas formas de realização, as composições da invenção podem ser administradas por via oral, *e. g.*, na forma de cápsulas, hóstias, pílulas, comprimidos, pastilhas (utilizando uma base aromatizada, geralmente sacarose e acácia ou tragacanta), pós, granulados, ou como uma solução ou uma suspensão num líquido aquoso ou não aquoso, ou como uma emulsão líquida de óleo em água ou água em óleo, ou como um elixir ou xarope, ou como pastilhas (utilizando uma base inerte, tal como

gelatina e glicerina, ou sacarose e goma-arábica) e/ou como colutórios e semelhantes, contendo, cada, uma quantidade predeterminada de um agente como um ingrediente activo. Um agente também pode ser administrado como um bolus, electuário ou pasta.

Nas formas de dosagem sólidas para administração oral (cápsulas, comprimidos, pílulas, drageias, pós, granulados e semelhantes), um ou mais compostos terapêuticos da presente invenção podem ser misturados com um ou mais veículos farmacologicamente aceitáveis, tal como citrato de sódio ou fosfato dicálcico, e/ou quaisquer dos seguintes: (1) enchimentos ou agentes de extensão, tais como amidos, lactose, sacarose, glucose, manitol e/ou ácido silícico; (2) aglutinantes, tais como, por exemplo, carboximetilcelulose, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarose e/ou acácia; (3) humectantes, tal como glicerol; (4) desintegrantes, tais como ágar-ágar, carbonato de cálcio, amido de batata ou tapioca, ácido algínico, determinados silicatos e carbonato de sódio; (5) agentes de retardação da dissolução, tal como parafina; (6) aceleradores de absorção, tais como compostos de amónio quaternário; (7) humectantes, tais como, por exemplo, álcool cetílico e monoestearato de glicerol; (8) absorventes, tais como caulino e argila de bentonite; (9) lubrificantes, tais como talco, estearato de cálcio, estearato de magnésio, polietilenoglicóis sólidos, laurilsulfato de sódio e as suas misturas; e (10) corantes. No caso de cápsulas, comprimidos e pílulas, as composições farmacêuticas também podem compreender agentes tamponizantes. As composições sólidas de um tipo semelhante também podem ser utilizadas como enchimentos em cápsulas de gelatina moles e duras utilizando excipientes tais como lactose

ou açúcares lácteos, bem como polietilenoglicóis de alto peso molecular e semelhantes.

As formas de dosagem líquidas para administração oral incluem emulsões, microemulsões, soluções, suspensões, xaropes e elixires farmacologicamente aceitáveis. Além do ingrediente activo, as formas de dosagem líquidas podem conter diluentes inertes geralmente utilizados na técnica, tais como água ou outros solventes, solubilizantes e emulsionantes, tais como álcool etílico, álcool isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, álcool benzílico, benzoato de benzilo, propilenoglicol, 1,3-butilenoglicol, óleos (em particular, óleos de semente de algodão, amendoim, milho, gérmen, azeite, rícino e sésamo), glicerol, álcool tetra-hidrofurílico, polietilenoglicóis e ésteres de sorbitano de ácido gordo e as suas misturas. Além dos diluentes inertes, as composições orais também podem incluir adjuvantes, tais como humectantes, emulsionantes e agentes de suspensão, edulcorantes, agentes de sabor, corantes, aromatizantes e conservantes.

As suspensões, além dos compostos activos, podem conter agentes de suspensão, tais como álcoois isoestearílicos etoxilados, polioxietileno sorbitol e ésteres de sorbitano, celulose microcristalina, meta-hidróxido de alumínio, bentonite, ágar-ágar e tragacanta e as suas misturas.

Determinadas composições aqui divulgadas podem ser administradas por via tópica, na pele ou em membranas da mucosa. As formulações tópicas podem incluir ainda um ou mais da grande variedade de agentes conhecidos como sendo eficazes como intensificadores de penetração na pele ou estrato córneo. Os exemplos destes são 2-pirrolidona, N-metil-2-pirrolidona,

dimetilacetamida, dimetilformamida, propilenoglicol, álcool metílico ou isopropílico, dimetilsulfóxido e azona. Podem ser ainda incluídos outros agentes para tornar a formulação cosmeticamente aceitável. Os exemplos destes são gorduras, ceras, óleos, corantes, fragrâncias, conservantes, estabilizantes e agentes tensioactivos. Podem ser também incluídos agentes queratolíticos, tais como aqueles conhecidos na técnica. Os exemplos são ácido salicílico e enxofre.

As formas de dosagem para administração tópica ou transdérmica incluem pós, formulações para pulverização, pomadas, pastas, cremes, loções, geles, soluções, adesivos e inalantes. O composto activo pode ser misturado sob condições estéreis com um veículo farmacêuticamente aceitável, e com quaisquer conservantes, tampões ou propulsores que possam ser necessários. As pomadas, pastas, cremes e geles podem conter, além de um composto em causa da invenção (e. g., um polipéptido de ActRII), excipientes, tais como gorduras animais e vegetais, óleos, ceras, parafinas, amido, tragacanta, derivados de celulose, polietilenoglicóis, silicones, bentonites, ácido silícico, talco e óxido de zinco ou as suas misturas.

Os pós e formulações para pulverização podem conter, além de um composto em causa, excipientes tais como lactose, talco, ácido silícico, hidróxido de alumínio, silicatos de cálcio, e poliamida em pó, ou misturas destas substâncias. As formulações para pulverização podem conter adicionalmente propulsores habituais, tais como clorofluoro-hidrocarbonetos e hidrocarbonetos não substituídos voláteis, tais como butano e propano.

Em determinadas formas de realização, as composições farmacêuticas adequadas para administração parentérica podem compreender um ou mais polipéptidos de ActRII da invenção em associação com uma ou mais soluções, dispersões, suspensões ou emulsões aquosas ou não aquosas, isotónicas, estéreis, farmacêuticamente aceitáveis, ou pós estéreis que podem ser reconstituídos em soluções ou dispersões injectáveis estéreis imediatamente antes da utilização, os quais podem conter antioxidantes, tampões, agentes bacteriostáticos, solutos que tornam a formulação isotónica com o sangue do destinatário pretendido ou agentes de suspensão ou espessantes. Os exemplos de veículos aquosos e não aquosos adequados que podem ser utilizados nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, polióis (tais como glicerol, propilenoglicol, polietilenoglicol e semelhantes), e as suas misturas adequadas, óleos vegetais, tal como azeite, e ésteres orgânicos injectáveis, tal como oleato de etilo. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, através da utilização de materiais de revestimento, tal como lecitina, através da manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersões, e pela utilização de tensioactivos.

As composições da invenção também podem conter adjuvantes, tais como conservantes, humectantes, emulsionantes e dispersantes. A prevenção da acção de microrganismos pode ser garantida pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico e semelhantes. Pode ser também desejável incluir agentes isotónicos, tais como açúcares, cloreto de sódio e semelhantes nas composições. Além disso, a absorção prolongada da forma farmacêutica injectável pode ser provocada pela inclusão de

agentes que retardam a absorção, tais como monoestearato de alumínio e gelatina.

Entende-se que o régimen de dosagem será determinado pelo médico assistente considerando vários factores que modificam a acção dos polipéptidos em causa da invenção. Os vários factores incluem, mas não estão limitados à quantidade de peso de osso que se pretende que seja formada, o sítio da lesão óssea, o estado do osso danificado, o tamanho de uma ferida, o tipo de tecido danificado, a idade, género e regime alimentar do doente, a gravidade de qualquer infecção, tempo de administração, e outros factores clínicos. Opcionalmente, a dosagem pode variar com o tipo de matriz utilizada na reconstituição e os tipos de compostos na composição. A adição de outros factores de crescimento conhecidos à composição final, também pode afectar a dosagem. O progresso pode ser seguido por avaliação periódica do crescimento e/ou reparação ósseos, por exemplo, raios X, determinações histomorfométricas e marcação com tetraciclina.

Em determinados casos da divulgação podem ser administrados um ou mais polipéptidos de ActRII, em conjunto (simultaneamente) ou em alturas diferentes (de forma sequencial ou sobreposta). Além disso, os polipéptidos de ActRII podem ser administrados com outros tipos de agentes terapêuticos, por exemplo, um agente de indução de cartilagem, um agente de indução de osso, um agente de indução de músculo, um agente de redução de gordura ou um agente de indução de neurónios. Os dois tipos de compostos podem ser administrados simultaneamente ou em alturas diferentes. Prevê-se que os polipéptidos de ActRII da invenção podem actuar em cooperação ou, eventualmente, de forma sinérgica com outro agente terapêutico.

Num exemplo específico foi descrita uma variedade de factores osteogénicos, de indução de cartilagem e de indução de osso, particularmente bisfosfonatos. Ver e. g., Pedidos de Patente Europeia nº 148155 e 169016. Por exemplo, outros factores que podem ser combinados com os polipéptidos de ActRII em causa incluem vários factores de crescimento, tais como o factor de crescimento epidérmico (EGF), factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crescimento transformante (TGF- α e TGF- β) e factor de crescimento análogo a insulina (IGF).

Em determinados casos, a presente divulgação também proporciona uma terapia génica para a produção *in vivo* de polipéptidos de ActRII. Tal terapia conseguiria o seu efeito terapêutico através da introdução das sequências polinucleotídicas de ActRII nas células ou tecidos possuindo os distúrbios como listados acima. A administração das sequências polinucleotídicas de ActRII pode ser conseguida utilizando um vector de expressão recombinante tal como um vírus quimérico ou um sistema de dispersão coloidal. Preferida para a administração terapêutica de sequências polinucleotídicas de ActRII é a utilização de lipossomas direccionados.

Os vários vectores virais que podem ser utilizados para a terapia génica como aqui ensinada incluem adenovírus, vírus do herpes, vaccinia ou, de um modo preferido, um vírus de ARN, tal como um retrovírus. De um modo preferido, o vector retroviral é um derivado de um retrovírus murídeo ou aviário. Os exemplos de vectores retrovirais nos quais pode ser inserido um único gene estranho incluem, mas não estão limitados a: vírus da leucemia murídea de Moloney (MoMuLV), vírus do sarcoma murídeo de Harvey (HaMuSV), vírus do tumor mamário murídeo (MuMTV) e Vírus do

Sarcoma de Rous (RSV). Um número de vectores retrovirais adicionais pode incorporar genes múltiplos. Todos estes vectores podem transferir ou incorporar um gene para um marcador seleccionável de modo que possam ser identificadas e produzidas células transduzidas. Os vectores retrovirais podem ser tornados específicos para o alvo ligando, por exemplo, um açúcar, um glicolípido ou uma proteína. O direccionamento preferido é conseguido utilizando um anticorpo. Os especialistas na técnica reconhecerão que podem ser inseridas sequências polinucleotídicas específicas no genoma retroviral ou ligadas a um envelope viral para permitir a administração específica a um alvo do vector retroviral contendo o polinucleótido ActRII. Numa forma de realização preferida, o vector é direccionado para células/tecidos de osso, cartilagem, músculo ou neurónio.

Alternativamente, células de cultura de tecido podem ser directamente transfectadas com plasmídeos que codificam os genes estruturais retrovirais gag, pol e env, por transfecção com fosfato de cálcio convencional. Estas células são em seguida transfectadas com o plasmídeo vector contendo os genes de interesse. As células resultantes libertam o vector retroviral no meio de cultura.

Outro sistema de administração direccionado para os polinucleótidos de ActRII é um sistema de dispersão coloidal. Os sistemas de dispersão coloidais incluem complexos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, esferas e sistemas baseados em lípidos incluindo emulsões de óleo em água, micelas, micelas mistas e lipossomas. O sistema coloidal preferido desta divulgação é um lipossoma. Os lipossomas são vesículas de membrana artificiais que são úteis como veículos de administração *in vitro* e *in vivo*. ARN, ADN e viriões intactos

podem ser encapsulados no interior aquoso e ser administrados às células numa forma biologicamente activa (ver *e. g.*, Fraley, *et al.*, Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Os métodos para a transferência eficiente de genes utilizando um veículo de lipossomas são conhecidos na técnica, ver *e. g.*, Mannino, *et al.*, Biotechniques, 6:682, 1988. A composição do lipossoma é geralmente uma associação de fosfolípidos, geralmente em associação com esteróides, especialmente colesterol. Podem ser também utilizados outros fosfolípidos ou outros lípidos. As características físicas dos lipossomas dependem do pH, força iónica e da presença de catiões bivalentes.

Os exemplos de lípidos úteis na produção de lipossomas incluem compostos de fosfatidilo, tais como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos e gangliósidos. Os fosfolípidos exemplificativos incluem fosfatidilcolina de ovo, dipalmitoilfosfatidilcolina e distearoilfosfatidilcolina. É também possível o direccionamento de lipossomas com base, por exemplo, na especificidade para o órgão, especificidade para a célula e especificidade para o organito, e é conhecido na técnica

EXEMPLIFICAÇÃO

A invenção será mais facilmente compreendida por referência aos exemplos seguintes, os quais são incluídos meramente para fins de ilustração de determinadas formas de realização e formas de realização da presente invenção.

Exemplo 1. Geração de mutantes de ActRIIB:

A requerente gerou uma série de mutações no domínio extracelular do ActRIIB e produziu estas proteínas mutantes como proteínas de fusão solúveis entre o ActRIIB extracelular e um domínio Fc. Uma estrutura co-cristalina de Activina e ActRIIB extracelular não mostrou qualquer papel para os 15 aminoácidos finais (C-terminais) (aqui referidos como a "cauda") do domínio extracelular na ligação ao ligando. Esta sequência não pôde ser resolvida em termos de estrutura cristalina, o que sugere que estes resíduos estão presentes numa ansa flexível que não se empacota de forma uniforme no cristal. Thompson *et al.* EMBO J. 2003 Apr 1;22(7):1555-66. Esta sequência também é mal conservada entre o ActRIIB e o ActRIIA. Consequentemente, estes resíduos foram omitidos da construção de fusão ActRIIB-Fc básica, ou de base. Além disso, a posição 64 na forma de base é ocupada por uma alanina, a qual é geralmente considerada a forma de "tipo selvagem", embora ocorra naturalmente um alelo A64R. Assim, a fusão ActRIIB-Fc de base tem a sequência (porção Fc sublinhada) (SEQ ID N°:14):

**SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVK
KGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGGGTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQP
REPOVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK**

Surpreendentemente, como se discute abaixo, determinou-se que a cauda C-terminal melhora a ligação de activina e GDF-11, assim uma versão preferida de ActRIIB-Fc tem uma sequência (porção Fc sublinhada) (SEQ ID N°:15):

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVK
 KGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVVFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPP
TAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYKCKVSNKA
LPVPIEKTISKAKGOPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
OPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

Foram introduzidas várias mutações na proteína ActRIIB-Fc de base. As mutações foram produzidas no domínio extracelular do ActRIIB por mutagénese de PCR. Depois da PCR, os fragmentos foram purificados através de uma coluna Qiagen, digeridos com SfoI e AgeI e purificados em gel. Estes fragmentos foram ligados num vector de expressão pAID4 de tal forma que após ligação criaram uma quimera de fusão com a IgG1 humana. Após transformação em *E. coli* DH5 alfa, as colónias foram cuidadosamente seleccionadas e os ADN foram isolados. Todos os mutantes foram verificados quanto à sequência.

Todos os mutantes foram produzidos em células HEK293T por transfecção transitória. Abreviadamente, num balão centrífugador de 500 mL foram aplicadas células HEK293T a 6×10^5 células/mL em meio Freestyle (Invitrogen) num volume de 250 mL e crescidas de um dia para o outro. No dia seguinte, estas células foram tratadas com complexo ADN:PEI (1:1) a 0,5 ug/mL de concentração final de ADN. Após 4 h foram adicionados 250 mL de meio e as células foram cultivadas durante 7 dias. O meio condicionado foi colhido centrifugando as células e concentrado.

Todos os mutantes foram purificados numa coluna de proteína A e eluídos com tampão de glicina a pH baixo (3,0). Após neutralização, estes foram submetidos a diálise contra PBS.

Foram também produzidos mutantes em células CHO por uma metodologia semelhante.

Os mutantes foram testados nos ensaios de ligação e bioensaios descritos abaixo. As proteínas expressas nas células CHO e células HEK293 foram indistinguíveis nos ensaios de ligação e bioensaios.

Exemplo 2. Ligação a GDF-11 e Activina A

A ligação das proteínas ActRIIB-Fc foi testada num ensaio BiaCore™.

O GDF-11 ou a Activina A ("ActA") foi imobilizado num chip BiaCore CM5 utilizando um procedimento de acoplamento de amina padrão. A proteína ActRIIB-Fc mutante ou de tipo selvagem foi carregada no sistema e foi medida a ligação. Os resultados estão resumidos no Quadro 1, abaixo.

Quadro 1: Ligação do ActRIIB-Fc solúvel ao GDF11 e Activina A (ensaio BiaCore)

ActRIIB	ActA	GDF11
WT (64A)	KD= 1,8e-7M (+)	KD= 2,6e-7M (+)
WT (64R)	na	KD= 8,6e-8M (+++)
+caudal5	KD ~ 2,6e-8M (+++)	KD= 1,9e-8M (++++)
E37A	*	*
R40A	-	-
D54A	-	*

(continuação)

ActRIIB	ActA	GDF11
K55A	++	*
R56A	*	*
K74A	KD= 4,35e-9 M +++++	KD= 5,3e-9M +++++
K74Y	*	—
K74F	*	—
K74I	*	—
W78A	*	*
L79A	+	*
D80K	*	*
D80R	*	*
D80A	*	*
D80F	*	*
D80G	*	*
D80M	*	*
D80N	*	*
D80I	*	—
F82A	++	—

* Não foi observada qualquer ligação

-- < 1/5 da ligação de WT

- ~ 1/2 da ligação de WT

+ WT

++ ligação aumentada < 2×

+++ ligação aumentada ~5×

++++ ligação aumentada ~10×

++++ ligação aumentada ~40×

Como se mostra no Quadro 1, as mutações tiveram efeitos variáveis na ligação ao ligando. A adição dos 15 aminoácidos

C-terminais do domínio extracelular provocou um aumento substancial na afinidade de ligação à Activina A e ao GDF-11, e prevê-se que este efeito se traduzirá essencialmente a todas as outras mutações. Outras mutações provocaram um aumento global na afinidade de ligação a ligando, incluindo o alelo de ocorrência natural A64R e K74A. A mutação R40A provocou uma diminuição moderada na afinidade de ligação à Activina A e ao GDF-11. Muitas mutações anularam a ligação detectável à Activina A e ao GDF-11, incluindo: E37A, R56A, W78A, D80K, D80R, D80A, D80G, D80F, D80M e D80N. Determinadas mutações provocaram uma alteração na selectividade. As seguintes mutações provocaram um aumento na razão de ligação ao GDF-11 relativamente à Activina A: K74Y, K74F, K74I e D80I. As seguintes mutações provocaram uma diminuição na razão de ligação ao GDF-11 relativamente à Activina A: D54A, K55A, L79A e F82A.

Exemplo 3. Bioensaio para a sinalização mediada por GDF-11 e Activina.

Foi utilizado um Ensaio de Gene Repórter A-204 para avaliar os efeitos das proteínas ActRIIB-Fc na sinalização pelo GDF-11 e Activina A. Linha celular: Rabdomiossarcoma Humano (derivado de músculo). Vector repórter: pGL3(CAGA)12 (Descrito em Dennler *et al.*, 1998, EMBO 17: 3091-3100.) Ver Figura 5. O motivo CAGA12 está presente em genes sensíveis ao TGF-Beta (gene PAI-1), pelo que este vector é de utilização geral para factores que sinalizam através de Smad2 e 3.

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

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

Dia 3: Adicionar os factores (diluídos em meio+0,1% de BSA). Os inibidores têm de ser pré-incubados com Factores durante 1 h antes da adição às células. Após 6 h, lavar as células com PBS e submeter as células a lise.

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

Como se mostra na Figura 16, a ActRIIB-Fc de tipo selvagem (A64 de base) inibe a sinalização do GDF-11 no Ensaio de Gene Repórter A-204. A construção A64 de base mostrou um efeito inibidor na actividade do GDF-11. A mutação A64K (também uma forma de ocorrência natural) provocou um aumento substancial na inibição do GDF-11 e uma combinação da mutação A64K com a adição dos 15 aminoácidos C-terminais do domínio extracelular (a "cauda" de 15 aminoácidos) produziu um inibidor ainda mais potente da actividade do GDF-11. Como se mostra na Figura 17, a construção A64 de base mostrou um efeito inibidor na actividade da Activina A. A mutação K74A provocou um aumento substancial na inibição da Activina A. Uma amostra de controlo que carece da Activina A não exibiu qualquer actividade.

Estes dados do sistema de bioensaio correlacionam bem com os ensaios de ligação mostrados no Quadro 1 e demonstram que os efeitos das várias mutações são traduzidos para um sistema biológico.

Exemplo 4: Proteínas de Fusão ActRIIA-Fc

Como se mostra na Figura 14, os ActRIIA e ActRIIB são altamente conservados. Consequentemente, prevê-se que a maioria das mutações testadas no ActRIIB tem efeitos semelhantes no ActRIIA. Assim, pode ser construída uma fusão ActRIIA-Fc de base com a seguinte sequência (porção Fc sublinhada) (SEQ ID N°: 16):

AILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQ
GCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMGGGTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Como se discute abaixo, constatou-se que a cauda C-terminal melhora a ligação à activina e ao GDF-11, assim uma versão preferida da ActRIIA-Fc tem uma sequência (porção Fc sublinhada) (SEQ ID N°:17):

AILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQ
GCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVT
KPPGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PVPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

Podem ser feitas outras mutações, correspondentes àquelas feitas no ActRIIB, na versão de base do ActRIIA ou na versão de "cauda" do ActRIIA. A correspondência entre as mutações do ActRIIB e ActRIIA é mostrada no Quadro 2 abaixo.

Mutante de ActRIIB	Efeito Funcional	Mutante de ActRIIA Correspondente
WT (64A)	Base.	WT é K65, pelo que prevê-se que a mutação K65A diminua a ligação a todos os ligandos.
WT (64R)	Aumenta a ligação a todos os ligandos.	K65, base.
+cauda15	Aumenta a ligação a todos os ligandos.	+cauda 15
E37A	Elimina ligação detectável a todos os ligandos.	E38A
R40A	Diminui a ligação a todos os ligandos.	R41A
D54A	Diminui a razão de ligação GDF-11/activina.	D55A
K55A	Diminui a razão de ligação GDF-11/activina.	K56A

(continuação)

Mutante de ActRIIB	Efeito Funcional	Mutante de ActRIIA Correspondente
R56A	Elimina ligação detectável a todos os ligandos.	R57A
K74A	Aumenta a ligação a todos os ligandos.	K75A
K74Y	Aumenta a razão de ligação GDF-11/activina.	K75Y
K74F	Aumenta a razão de ligação GDF-11/activina.	K75F
K74I	Aumenta a razão de ligação GDF-11/activina.	K75I
W78A	Elimina ligação detectável a todos os ligandos.	W79A
L79A	Diminui a razão de ligação GDF-11/activina.	L80A
D80K	Elimina ligação detectável a todos os ligandos.	D81K
D80R	Elimina ligação detectável a todos os ligandos.	D81R
D80A	Elimina ligação detectável a todos os ligandos.	D81A
D80F	Elimina ligação detectável a todos os ligandos.	D81F
D80G	Elimina ligação detectável a todos os ligandos.	D81G

(continuação)

Mutante de ActRIIB	Efeito Funcional	Mutante de ActRIIA Correspondente
D80M	Elimina ligação detectável a todos os ligandos.	D81M
D80N	Elimina ligação detectável a todos os ligandos.	D81N
D80I	Aumenta a razão de ligação GDF-11/activina.	D81I
F82A	Diminui a razão de ligação GDF-11/activina.	I83A

Lisboa, 14 de Agosto de 2013

REIVINDICAÇÕES

1. Polipéptido de ActRIIB solúvel compreendendo um domínio extracelular de um polipéptido de ActRIIB possuindo uma sequência de aminoácidos, pelo menos, 97% idêntica à SEQ ID N°:2, uma unidade de ligação flexível possuindo a sequência TGGG e um domínio Fc de imunoglobulina, em que o domínio Fc de imunoglobulina está fundido com a extremidade C-terminal do domínio extracelular do polipéptido de ActRIIB pela unidade de ligação flexível e, em que o polipéptido de ActRIIB compreende um domínio de ligação a GDF8 alterado que inclui uma ou mais mutações que aumentam a selectividade do domínio de ligação para
 - (a) o GDF8 em relação à activina relativamente ao domínio de ligação a GDF8 de SEQ ID N°:2,
 - (b) a activina em relação ao GDF8 relativamente ao domínio de ligação a GDF8 de SEQ ID N°:2, ou
 - (c) o GDF8 e a activina relativamente ao domínio de ligação a GDF8 de SEQ ID N°:2.
2. Polipéptido de ActRIIB solúvel da reivindicação 1, em que a sequência de aminoácidos do domínio extracelular do polipéptido de ActRIIB é, pelo menos, 98% idêntico à SEQ ID N°:2.

3. Polipéptido de ActRIIB solúvel da reivindicação 1, em que a sequência de aminoácidos do domínio extracelular do polipéptido de ActRIIB é, pelo menos, 99% idêntico à SEQ ID N°:2.
4. Polipéptido de ActRIIB solúvel de qualquer reivindicação anterior, em que o domínio Fc de imunoglobulina compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°:13.
5. Polipéptido de ActRIIB solúvel de qualquer reivindicação anterior, em que o resíduo de aminoácido Asp na posição 62 da SEQ ID N°: 2 está mutado para um resíduo de aminoácido seleccionado do grupo consistindo de: um aminoácido não carregado, um aminoácido negativo e um aminoácido hidrófobo.
6. Polipéptido de ActRIIB solúvel de qualquer reivindicação anterior, em que o polipéptido de ActRIIB solúvel inclui um ou mais resíduos de aminoácido modificados seleccionados de: um aminoácido glicosilado, um aminoácido PEGuilado, um aminoácido farnesilado e aminoácido acetilado, um aminoácido biotinilado e aminoácido conjugado com uma porção lipídica, e um aminoácido conjugado com um agente de derivatização orgânico.
7. Polipéptido de ActRIIB solúvel de qualquer reivindicação anterior, em que o polipéptido de ActRIIB solúvel tem uma ou mais das seguintes características:

liga-se a um ligando de ActRIIB com um K_d de pelo menos 10^{-5} M; e

inibe a sinalização de ActRIIB numa célula.

8. Polipéptido de ActRIIB solúvel de qualquer reivindicação anterior, em que o polipéptido de ActRIIB solúvel liga-se a um ligando de ActRIIB com um K_d inferior a 1 micromolar.
9. Polipéptido de ActRIIB solúvel da reivindicação 7 ou 8, em que o ligando de ActRIIB é seleccionado do grupo consistindo de: BMP7, GDF8, GDF11 e Nodal.
10. Polipéptido de ActRIIB solúvel de qualquer reivindicação anterior, em que o domínio de ligação a GDF8 alterado inclui uma mutação A64R, utilizando a numeração de aminoácidos de SEQ ID N°: 4.
11. Polipéptido de ActRIIB solúvel de qualquer reivindicação anterior, em que o domínio de ligação a GDF8 alterado inclui uma mutação K74A, utilizando a numeração de aminoácidos de SEQ ID N°: 4.
12. Preparação farmacêutica para o tratamento de um distúrbio associado a ActRIIB, compreendendo:

o polipéptido de ActRIIB solúvel de qualquer reivindicação anterior; e

um veículo farmacêuticamente aceitável.
13. Preparação farmacêutica da reivindicação 12, em que a referida preparação é substancialmente apirogénica.

14. Polinucleótido isolado compreendendo uma sequência de codificação para um polipéptido de ActRIIB solúvel de qualquer uma das reivindicações 1-11.
15. Polinucleótido recombinante compreendendo uma sequência promotora operativamente ligada a um polinucleótido da reivindicação 14.
16. Célula transformada com um polinucleótido recombinante da reivindicação 15.
17. Célula da reivindicação 16, em que a célula é uma célula de mamífero.
18. Célula da reivindicação 17, em que a célula é uma célula humana.
19. Método de preparação de um polipéptido de ActRIIB solúvel, compreendendo:
 - a) cultivar uma célula sob condições adequadas para a expressão do polipéptido de ActRIIB solúvel, em que a referida célula está transformada com um polinucleótido recombinante da reivindicação 15; e
 - b) recuperar o polipéptido de ActRII solúvel assim expresso.
20. Polipéptido de ActRIIB de qualquer das reivindicações 1-11 para utilização no tratamento de uma distrofia muscular.

21. Polipéptido de ActRIIB para utilização de acordo com a reivindicação 20, em que a distrofia muscular é seleccionada do grupo consistindo de: Distrofia Muscular de Duchenne, Distrofia Muscular de Becker, Distrofia Muscular de Emery-Dreifuss, Distrofia Muscular de Limb-Girdle, Distrofia Muscular Fascio-escápulo-humeral, Distrofia Muscular Miotónica, Distrofia Muscular Oculofaríngea, Distrofia Muscular Distal e Distrofia Muscular Congénita.
22. Polipéptido de ActRIIB de qualquer das reivindicações 1-11 para utilização no tratamento de Esclerose Lateral Amiotrófica.
23. Polipéptido de ActRIIB de qualquer uma das reivindicações 1-11 para utilização no tratamento de um distúrbio de perda de massa muscular, em que o distúrbio de perda de massa muscular é seleccionado do grupo consistindo de caquexia, anorexia, síndrome de DMD, síndrome de BMD, síndrome de perda de massa associada a SIDA, distrofias musculares, doenças neuromusculares, doenças do neurónio motor, doenças da junção neuromuscular e miopatias inflamatórias.
24. Polipéptido de ActRIIB de qualquer uma das reivindicações 1-11 para utilização no tratamento de um distúrbio neurodegenerativo, em que o distúrbio neurodegenerativo é seleccionado do grupo consistindo de doença de Alzheimer (AD), doença de Parkinson (PD), Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS), doença de Huntington (HD).

25. Polipéptido de ActRIIB de qualquer uma das reivindicações 1-11 para utilização no tratamento de um distúrbio associado a ganho de peso corporal indesejável, em que o referido distúrbio é seleccionado do grupo consistindo de obesidade, diabetes mellitus não insulino-dependente (NIDDM), doença cardiovascular, cancro, hipertensão, osteoartrite, acidente vascular cerebral, problemas respiratórios e doença da vesícula biliar.
26. Polipéptido de ActRIIB de qualquer uma das reivindicações 1-11 para utilização no tratamento de um distúrbio associado à actividade anómala de GDF-8, em que o distúrbio associado à actividade anómala de GDF-8 é seleccionado do grupo consistindo de: distúrbios metabólicos tais como diabetes tipo 2, tolerância reduzida à glucose, síndrome metabólica (e. g., síndrome X), e resistência à insulina induzida por traumatismo (e. g., queimaduras ou desequilíbrio de azoto); distúrbios do tecido adiposo (e. g., obesidade); distrofia muscular (incluindo distrofia muscular de Duchenne); esclerose lateral amiotrófica (ALS); atrofia muscular; atrofia de órgão; fraqueza; síndrome do túnel carpiano; doença pulmonar obstrutiva congestiva; sarcopenia, caquexia e outras síndromes de perda de massa muscular; osteoporose; osteoporose induzida por glucocorticóides; osteopenia; osteoartrite; fracturas relacionadas com osteoporose; massa óssea baixa devido a terapia crónica com glucocorticóides, insuficiência gonadal prematura, supressão de androgénios, deficiência de vitamina D, hiperparatireoidismo secundário, deficiências nutricionais e anorexia nervosa.

Lisboa, 14 de Agosto de 2013

Sequência do polipéptido (extracelular) solúvel de ActRIIA humano designada como SEQ ID N°: 1 (116 aa)

AILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGC
WLDDINCYDRDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPP

Figura 1

Sequência do polipéptido (extracelular) solúvel de ActRIIB humano designada como SEQ ID N°: 2 (116 aa)

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGC
WLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT

Figura 2

Sequência do precursor de ActRIIA humano designada como
SEQ ID N°: 3 (NP_001607, 513 aa)

MGAAAKLAFVFLISCSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRH
CFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP
EM EVTQPTSNPVTPKPPYYNILLVPLMLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLVPTQD
PGPPPPSPLLGLKPLQLLEVKARGRFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVY
SLPGMKHENILQFIGAEKRGTSDVDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVVSWNELCHIAET
MARGLAYLHEDIPGLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFGALALKEAGKSAG
DTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELASRCTAADGPVDEYML
PFEEEIGQHPSLEDMQEVVVHKKRPVLRDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSA
GCVGERITQMQRLTNIITTEDIVTVVTMVTNVDFPPKESSL

Figura 3

Sequência do precursor de ActRIIB humano designada como
SEQ ID N°: 4 (NP_001097, 512 aa)

MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHC
YASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE
AGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPG
PPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFST
PGMKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGKNIITWNELCHVAETMS
RGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLAVRFEPGKPPGD
THGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVDEYMLP
FEEEIGQHPSLEELQE VVVHKKMRPTIKDHWLKHPLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAG
CVEERVSLIRRSVNGTTS DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI

Figura 4

Sequência do ácido nucleico que codifica um polipéptido (extracelular) solúvel de ActRIIA humano designada como SEQ ID N°: 5 (348 pb)

```
Gctatacttggtagatcagaaactcaggagtgtcttttctttaatgctaattgggaaaaagacagaacc  
aatcaaactggtggtgaaccgtgttatggtgacaaagataaacggcggcattgttttgctacctggaag  
aatatttctggttccattgaaatagtgaacaagggtgttggctggatgatatcaactgctatgacagg  
actgattgtgtagaaaaaaagacagccctgaagtatattttgttgctgtgagggcaatatgtgtaat  
gaaaagttttcttattttccagagatggaagtacacagcccacttcaaatccagttacacctaagcca  
ccc
```

Figura 5

Sequência do ácido nucleico que codifica um polipéptido (extracelular) solúvel de ActRIIB humano designada como SEQ ID N°: 6 (348 pb)

**Tctgggctgtggggaggctgagacacgggagtgcatctactacaacgccaactgggagctggagcgcaacc
aaccagagcggcctggagcgctgcgaaggcgagcaggacaagcggctgcactgctacgcctcctgggccc
aacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaagggtgctggctagatgacttcaactgctacgatagg
caggagtgtgtggccactgaggagaacccccaggtgtacttctgctgctgtgaaggcaacttctgcaac
gagcgcttcactcatttgccagaggctggggggccggaagtcacgtacgagccacccccgacagccccc
acc**

Figura 6

Sequência do ácido nucleico que codifica uma proteína precursora de ActRIIA humano, designada como SEQ ID N°: 7 (nucleótidos 164-1705 de NM_001616, 1542 pb)

```

atgggagctgctgcaaagttggcgtttgccgtctttcttatctcctgttcttcaggtgctatacttgg
agatcagaaactcaggagtgtcttttctttaatgctaattgggaaaaagacagaaccaatcaaactgg
gttgaaccgtgttatggtgacaaagataaacggcggcattgttttgctacctggaagaatatttctgg
tccattgaaatagtgaacaaggttgttggctggatgatatcaactgctatgacaggactgattgtgta
gaaaaaaaaagacagccctgaagtatattttgttgtgtgagggcaatatgtgtaatgaaaagttttct
tattttccagagatggaagtcacacagcccacttcaaattccagttacacctaagccaccctattacaac
atcctgctctattccttgggtgccacttatgttaattgcggggattgtcatttgtgcattttgggtgtac
aggcatcacaagatggcctaccctcctgtacttgttccaaactcaagaccagggaaccacccaccttct
ccattactaggggtgaaaccactgcagttattagaagtgaagcaaggggaagatttgggttgtgtctgg
aaagcccagttgcttaacgaatatgtggctgtcaaaatatccaatacaggacaaacagtcattggcaa
aatgaatacgaagtctacagtttgcctggaatgaagcatgagaacatattacagttcattgggtgcagaa
aaacgaggcaccagtggtgatgtggatctttggctgatcacagcatttcatgaaaagggttcactatca
gactttcttaaggctaattgtgggtctcttgggaatgaactgtgtcatattgcagaaaccatggctagagga
ttggcataatttacatgaggatatacctggcctaaaagatggccacaaacctgccatatctcacagggac
atcaaaagtaaaaatgtgctgttgaaaaacaacctgacagcttgcatgtgtgactttgggttggcctta
aaatttgaggctggcaagtctgcaggcgatacccatggacaggttggtaccggaggtacatggctcca
gaggtattagaggggtgctataaaacttcaaagggtatgcatttttgaggatagatatgtatgccatggga
ttagtcctatgggaactggcttctcgctgtactgctgcagatggacctgtagatgaatacatgttgcca
tttgaggaggaaattggccagcatccatctcttgaagacatgcaggaagttgttgtgcataaaaaaaag
aggcctgttttaagagattattggcagaaacatgctggaatggcaatgctctgtgaaaccattgaagaa
tgttgggatcacgacgcagaagccaggttatcagctggatgtgtagggtgaaagaattaccagatgcag
agactaacaatatattattaccacagaggacattgtaacagtggtcacaatgggtgacaaatgttgacttt
cctcccaaagaatctagtctatga

```

Figura 7

Sequência do ácido nucleico que codifica uma proteína precursora de ActRIIB humano, designada como SEQ ID N°: 8 (nucleótidos 5-1543 de NM_001106, 1539 pb)

```

atgacggcgccctgggtggccctcgccctcctctggggatcgctgtggcccggtctgggcgtgggga
gctgagacacgggagtgcatctactacaacgccaaactgggagctggagcgaccaaaccagagcgccctg
gagcgctgcaaggcgagcaggacaagcggtgactgctacgcctcctgggccaacagctctggcacc
atcgagctcgtgaagaagggtgctggctagatgacttcaactgctacgataggcaggagtggtggcc
actgaggagaacccccaggtgtacttctgctgctgtgaaggcaacttctgcaacgagcgcttcactcat
ttgccagaggctggggggccggaagtacgtacgagccaccccgacagccccaccctgctcacggtg
ctggcctactcactgctgcccacgggggcctttccctcatcgtcctgctggcccttttggtgtaccgg
catcgcaagccccctacggtcatgtggacatccatgaggacccctgggcctccaccaccatcccctctg
gtgggcctgaagccactgcagctgctggagatcaaggctcgggggcgctttggctgtgtctggaaggcc
cagctcatgaatgactttgtagctgtcaagatcttccactccaggacaagcagtcgtggcagagtga
cgggagatcttcagcacacctggcatgaagcacgagaacctgctacagttcatgtgtgccgagaagcga
ggctccaacctcgaagtagagctgtggctcatcacggccttccatgacaagggtccctcacggattac
ctcaagggggaacatcatcacatggaacgaactgtgtcatgtagcagagacgatgtcacgaggcctctca
tacctgcatgaggatgtgccctggtgccgtggcgagggccacaagccgtctattgccacagggacttt
aaaagtaagaatgtattgctgaagagcgacctcacagccgtgctggctgactttggcttggctgttcga
tttgagccagggaaacctccaggggacacccacggacaggtaggcacgagacggtacatggctcctgag
gtgctcgagggagccatcaacttccagagagatgccttcctgcgcattgacatgtatgccatgggggtg
gtgctgtgggagcttgtgtctcgctgcaaggctgcagacggacccgtggatgagtacatgctgcccttt
gaggaagagattggccagcaccccttcgttggaggagctgcaggaggtggtggtgcacaagaagatgagg
cccaccattaaagatcactggttgaaacacccgggcctggcccagctttgtgtgaccatcgaggagtgc
tgggacatgatgcagaggctcgcttgtccgcgggctgtgtggaggagcgggtgtccctgattcgagg
tcggtcaacggcactacctcggaactgtctcggttccctgggtgacctctgtcaccaatgtggacctgcc
cctaaagagtcaagcatctaa

```

Figura 8

Expressão dos Domínios

Extracelulares de ActRIIa e ActRIIb

Características Básicas Gerais das Construções



Sequência sinal: Nativa, fusão de abelha-comum ou TPA



Domínio extracelular



Fc Mutada

- ligação reduzida ao receptor de Fc e activação do complemento
- maior semivida em circulação

Sequência de ActRIIA humano

Sequência sinal nativa:

MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGL
ERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVAT
EENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA

Sequência sinal HBML:

MKFLVNVALVFMVVYISYIYASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSG
LERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECV
ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA

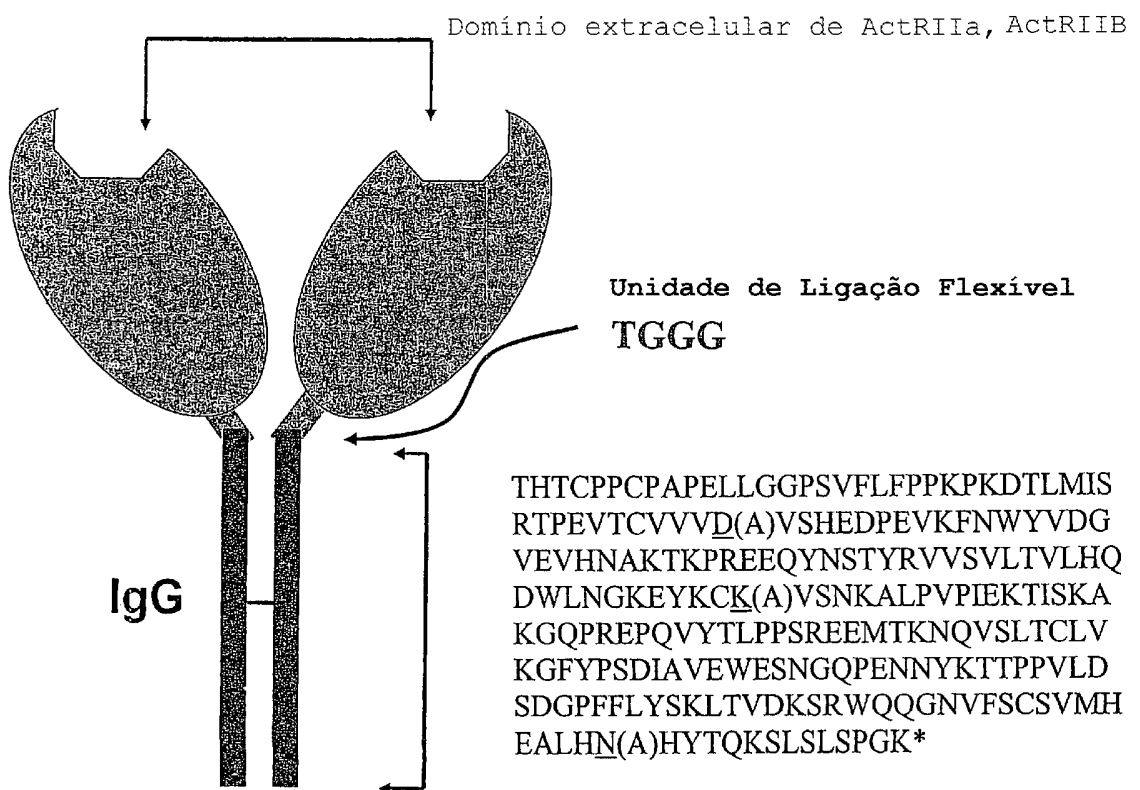
Sequência sinal TPA:

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSGRGEAETRECIYYNANWELERTN
QSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQ
ECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA

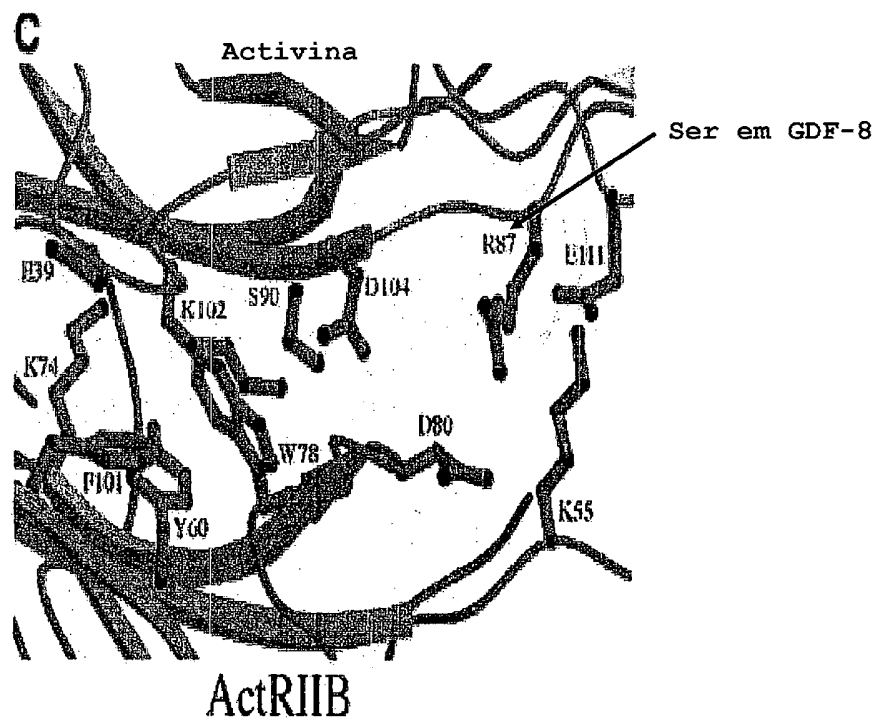
ACtRIIa humano com sequência sinal nativa:

MGAAAKLAFAVFVISCSSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEP
CYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSP
EVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPP

Concepção dos Produtos de Fc



Interacções Activina ActRIIb



Alinhamento dos domínios extracelulares humanos de ActRIIA
e ActRIIB

```

RIIA 20  AILGRSETQECLFFNANWĒKDR̄TNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKOGCWĒDD 82
          G +ET+EC+++NANWĒ +RTNQ+G+E C G++DKR HC+A+WĒN SG+IE+VK+GCWLDD
RIIB 19  SGRGEAETRECIYYNANWĒLERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWĒNSSGTIELVKKGCWLDD 81

      83  ĒNCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVTOPTSNPVTIPKPP 135
          NCYDR +CV +++P+VYFCCCEGN CNE+F++ PE Ē T P P P
      82  ĒNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT 134

```

Figura 14

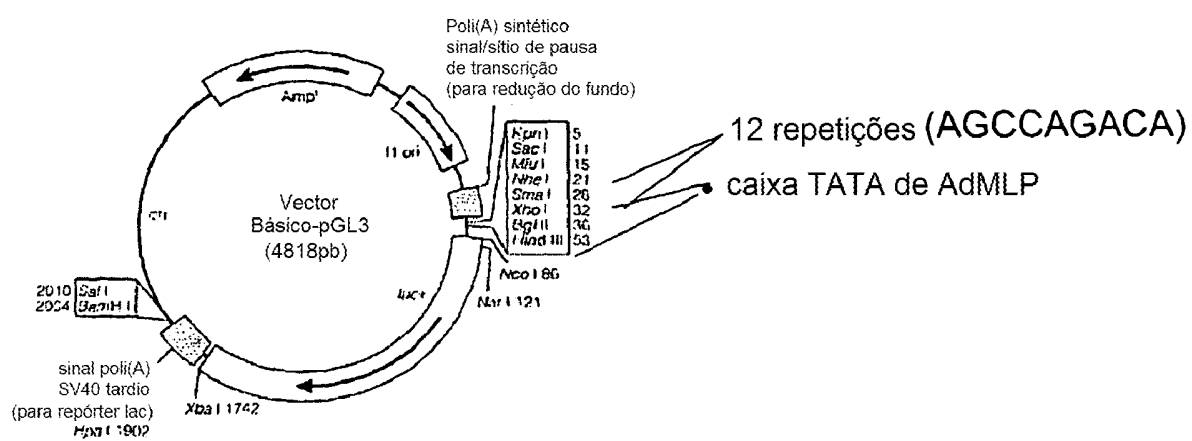


Figura 15

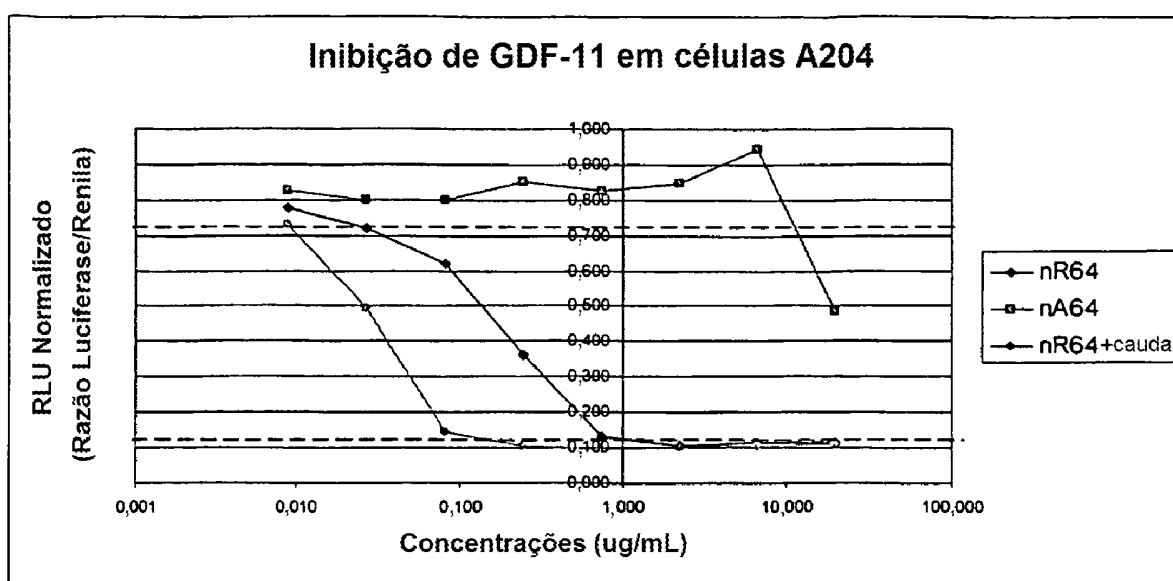


Figura 16

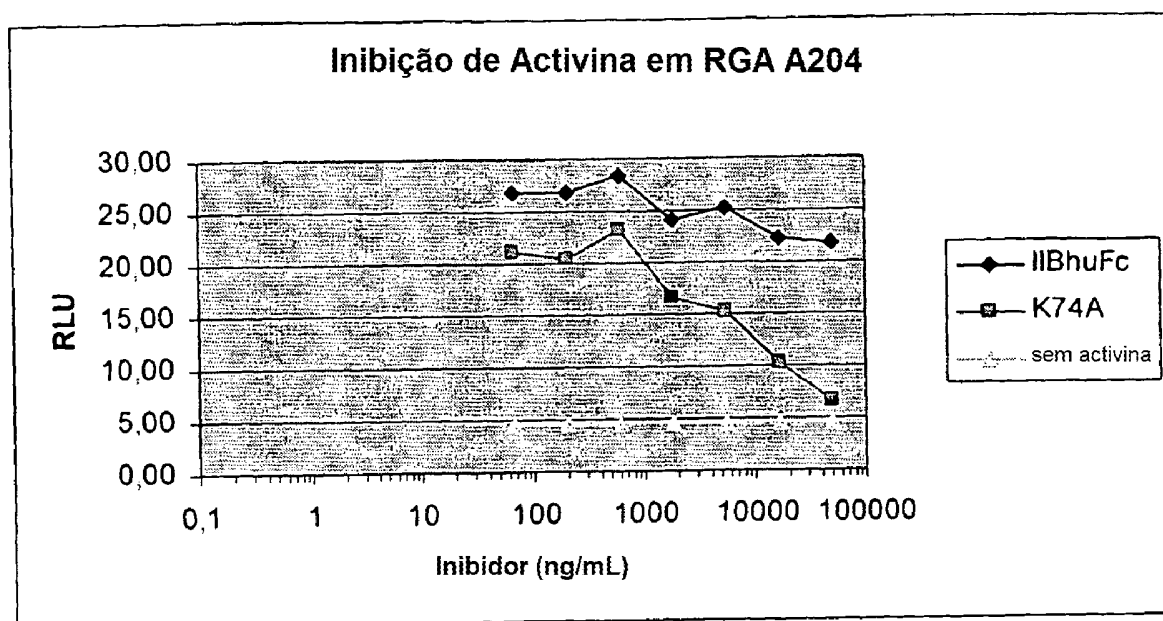


Figura 17