



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

(11) PI 0112785-3 B1



(22) Data do Depósito: 26/07/2001

(45) Data de Concessão: 12/07/2016

(54) Título: POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO COMPREENDENDO UM PRÓ-DOMÍNIO DE MIOSTATINA, POLINUCLEOTÍDEO CODIFICANDO O MESMO, MICRO-ORGANISMO COMPREENDENDO O REFERIDO POLINUCLEOTÍDEO, BEM COMO MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE UMA PORÇÃO DE PEPTÍDEO FUNCIONAL DE UM PRÓ-DOMÍNIO DE MIOSTATINA

(51) Int.Cl.: C07K 14/00; A61K 38/00

(30) Prioridade Unionista: 27/07/2000 US 09/628,112

(73) Titular(es): THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE

(72) Inventor(es): SE-HIM LEE, ALEXANDRA C. MCPHERRON

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO COMPREENDENDO UM PRÓ-DOMÍNIO DE MIOSTATINA, POLINUCLEOTÍDEO CODIFICANDO O MESMO, MICRO-ORGANISMO COMPREENDENDO O REFERIDO POLINUCLEOTÍDEO, 5 BEM COMO MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE UMA PORÇÃO DE PEPTÍDEO FUNCIONAL DE UM PRÓ-DOMÍNIO DE MIOSTATINA".

Campo da Invenção

A invenção refere-se em geral a porções de peptídeo de promiostatina (fator-8 de diferenciação de crescimento; GDF-8), e mais especificamente 10 a composições que afetam a transdução de sinal de miostatina em uma célula e a métodos de uso de tais composições para modular a transdução de sinal de miostatina em uma célula.

Antecedentes da Invenção

A quantidade de tempo, esforço e dinheiro gasta nos Estados Unidos 15 a cada ano por indivíduos que pretendem perder peso é enorme. Para muitos desses indivíduos, o objetivo não é apenas parecer melhor, mas mais importante evitar os inevitáveis problemas médicos associados a estar acima do peso.

Mais da metade da população adulta nos Estados Unidos é considerada 20 estar acima do peso. Ainda, vinte a trinta por cento de homens adultos e trinta a quarenta por cento de mulheres adultas nos Estados Unidos são consideradas obesas, com as taxas mais altas acontecendo entre os pobres e as minorias. A obesidade, que é definida como uma pessoa pelo menos cerca de vinte por cento acima do nível médio de adiposidade, cresceu 25 drasticamente em prevalência durante as últimas décadas e está se tornando o problema principal entre a população pediátrica. Vinte por cento de todas as crianças são agora consideradas acima do peso, um número que representa uma duplicação durante os cinco últimos anos.

Obesidade e problemas médicos diretamente atribuíveis a ela 30 são a causa principal de morbidez e mortalidade em todo o mundo. A obesidade é um fator de risco principal para o desenvolvimento de várias condições patológicas, incluindo aterosclerose, hipertensão, ataque cardíaco, dia-

betes do tipo II, doença da vesícula biliar e certos cânceres, e contribui para morte prematura. Doença cardíaca é a causa principal de mortalidade nos Estados Unidos, e o diabetes do tipo II atinge mais de 16 milhões de pessoas nos Estados Unidos e é uma das causas principais de morte por doença.

Mais de oitenta por cento do diabetes do tipo II acontece em pessoas obesas. Embora o diabetes do tipo II afete todas as raças, ele é particularmente prevalente entre os nativos Americanos, Afro Americanos e Hispânicos. Significantemente, o diabetes do tipo II, que costumava acontecer quase que exclusivamente em adultos acima de quarenta anos, agora acontece em crianças, com casos descritos tendo quase que triplicado durante os últimos cinco anos. O diabetes do tipo II, também chamado diabetes não-dependente de insulina, é caracterizado por secreção reduzida de insulina em resposta à glicose e por resistência do corpo à ação de insulina, mesmo que os níveis de insulina na circulação geralmente estejam normais ou elevados. O diabetes do tipo II afeta o funcionamento de uma variedade de tecidos e órgãos diferentes e pode levar à doença vascular, falência renal, retinopatia e neuropatia.

Em contraste com os problemas médicos associados com a obesidade, a perda de peso grave que comumente acontece em pacientes com certas doenças crônicas também apresenta um desafio para intervenção médica. A base molecular para essa perda de peso, referida como caquexia, não é bem compreendida. Está claro agora, no entanto, que a caquexia complica o gerenciamento de tais doenças e está associada a um prognóstico pobre para os pacientes. Os efeitos da caquexia são evidentes na síndrome de definhamento que acontece nos pacientes com câncer e AIDS.

Embora grandes esforços tenham sido feitos na tentativa de elucidar os processos biológicos envolvidos na regulagem do peso do corpo, os resultados proveram mais fanfarra do que o valor real. Por exemplo, a descoberta da leptina foi aclamada como uma grande descoberta na compreensão da base molecular para acúmulo de gordura em humanos, e, com ela, a promessa de uma cura para obesidade. Estudos em animais indicaram que a leptina está envolvida na transmissão de sinais internos que regulam o apetite, e sugerem que a leptina poderia ser útil para tratar humanos que sofrem de obesidade. Progresso no uso da leptina para tratar a obesidade tem sido lento, no entanto, e até agora, a leptina não satisfez às expectativas

iniciais.

Tratamento da obesidade mórbida atualmente é limitado à cirurgia para remover porções do intestino, desse modo reduzindo a quantidade de comida (e calorias) absorvida. Para a obesidade moderada, o único "tratamento" é comer uma dieta saudável e praticar exercícios regularmente, um método que provou ser modestamente bem sucedido quando muito. Desse modo, existe a necessidade de se identificar os fatores biológicos envolvidos na regulagem do peso do corpo, incluindo desenvolvimento muscular e acúmulo de gordura, de modo que métodos para tratamento de distúrbios tal como obesidade e caquexia possam ser desenvolvidos. A presente invenção 10 satisfaz esta necessidade e provê vantagens adicionais.

Sumário da Invenção

A presente invenção refere-se a uma porção de peptídeo substancialmente purificada de um peptídeo de promiostatina. Um polipeptídeo 15 de promiostatina é exemplificado aqui por uma promiostatina de mamífero tendo uma seqüência de aminoácido tal como aquela de promiostatina humana (SEQ ID NO: 2); promiostatina de murino (SEQ ID NO: 4), promiostatina de rato (SEQ ID NO: 6); promiostatina de babuíno (SEQ ID NO: 10); promiostatina bovina (SEQ ID NO: 12); promiostatina de porco (SEQ ID NO: 20 14); e promiostatina de ovino (SEQ ID NO: 16); por uma promiostatina de ave tendo uma seqüência de aminoácido tal como aquela da promiostatina de galinha (SEQ ID NO: 8) e promiostatina de peru (SEQ ID NO: 18); e por uma promiostatina de peixe tal como polipeptídeo de promiostatina de peixe zebra tendo uma seqüência de aminoácido conforme descrito na SEQ ID 25 NO: 20. Em adição, um polipeptídeo de promiostatina é exemplificado por um polipeptídeo compreendendo a porção de alelo de salmão 1 (SEQ ID NO: 27) ou a porção do alelo de salmão 2 (SEQ ID NO: 29) descrita aqui.

A presente invenção também refere-se a um fragmento proteolítico de um polipeptídeo de fator de diferenciação de crescimento (GDF) (pró-GDF) ou uma porção de peptídeo funcional dele. Tais fragmentos proteolíticos são exemplificados aqui por fragmentos proteolíticos de um polipeptídeo de promiostatina e de um polipeptídeo de pró-GDF-11, e por porções de

peptídeo funcionais de tais fragmentos proteolíticos. Um fragmento proteolítico de um polipeptídeo de pró-GDF ou uma porção de peptídeo funcional dele é caracterizado, em parte, por ter ou afetar uma atividade associada à transdução de sinal de GDF. Desse modo, um polipeptídeo de promiostatina 5 ou sua porção de peptídeo funcional pode ter, por exemplo, atividade de ligação a receptor de miostatina, atividade estimuladora ou inibidora de transdução de sinal de miostatina, atividade de ligação de miostatina, ou atividade de ligação de promiostatina. Em uma modalidade, o fragmento proteolítico é 10 um fragmento produzido pela clivagem de um polipeptídeo de promiostatina em um sítio de reconhecimento de clivagem proteolítica tendo a seqüência de aminoácido Arg-Xaa-Xaa-Arg (SEQ ID NO: 21). Tais sítios de reconhecimento proteolítico são exemplificados pela seqüência Arg-Ser-Arg-Arg (SEQ ID NO: 22) mostrada como resíduos de aminoácido 263 a 266 na SEQ ID NO: 1 (promiostatina) ou resíduos de aminoácido 295 a 298 da SEQ ID NO: 15 25 (pró-GDF-11 humano) e pela seqüência Arg-Ile-Arg-Arg (SEQ ID NO: 23) mostrada como resíduos de aminoácido 263 a 266 na SEQ ID NO: 20.

Em uma outra modalidade, o fragmento proteolítico é um pró-domínio de GDF, por exemplo, um pró-domínio de miostatina, que inclui resíduos de aminoácido 1 a cerca de 262 de um polipeptídeo de promiostatina, 20 ou uma porção de peptídeo funcional dele, ou um pró-domínio de GDF-11, que inclui os resíduos de aminoácido 1 a cerca de 295 de um polipeptídeo pró-GDF-11, ou uma porção de peptídeo funcional dele. Um pró-domínio de miostatina é exemplificado por resíduos de aminoácido 1 a cerca de 263 conforme indicado na SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 6; bem como por resíduos de aminoácido 1 a cerca de 262 conforme descrito na SEQ IS NO: 2, 25 SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20. Uma porção de peptídeo funcional de um pró-domínio de miostatina é exemplificada por uma porção de peptídeo de um pró-domínio de miostatina que pode interar especificamente com 30 miostatina ou com promiostatina. Um pró-domínio de GDF-11 é exemplificado por resíduos de aminoácido 1 a cerca de 295 da SEQ ID NO: 25, e uma porção de peptídeo funcional de um pró-domínio de DGF-11 é exemplificada

por uma porção de peptídeo de um pró-domínio de GDF-11 que pode especificamente interagir com um polipeptídeo de DGF-11 ou pró-GDF-11 maduro. De preferência, a porção de peptídeo funcional de um pró-domínio de GDF reduz ou inibe a habilidade do GDF correspondente ou um GDF relacionado em estimular a transdução de sinal.

Em ainda uma outra modalidade, o fragmento proteolítico de um polipeptídeo de pró-GDF é um peptídeo de GDF maduro, ou uma porção de peptídeo funcional dele. Desse modo, o fragmento proteolítico pode ser um peptídeo de miostatina C-terminal maduro, que inclui resíduos de aminoácido por volta de 268 a 374 de um polipeptídeo de promiostatina, ou um peptídeo de GDF-11 C-terminal, que inclui cerca de 299 a 407 resíduos de aminoácido de um polipeptídeo de pró-DGF-11. Um peptídeo de miostatina maduro é exemplificado por resíduos de aminoácido por volta de 268 a 375 conforme descrito na SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 6, por resíduos de aminoácido por volta de 267 a 374 conforme descrito na SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 14, SEQ IF NO: 16, e SEQ ID NO: 20; e pelos resíduos de aminoácido correspondentes da SEQ ID NO: 27 e SEQ ID NO: 29. Uma porção de peptídeo funcional de uma miostatina madura é exemplificada por uma porção de peptídeo de miostatina que tem atividade estimuladora ou inibidora de transdução de sinal de miostatina. Um peptídeo de GDF-11 maduro é exemplificado por resíduos de aminoácido 299 a 407 da SEQ ID NO: 25, e uma porção de peptídeo funcional de um peptídeo de GDF-11 maduro é exemplificada por uma porção de peptídeo de GDF-11 maduro que tem uma atividade estimuladora ou inibidora de transdução de sinal de GDF-11. A atividade da porção de peptídeo funcional de um peptídeo de GDF maduro por ser, por exemplo, uma habilidade em interagir especificamente com seu receptor, uma habilidade em reduzir ou inibir a habilidade de um peptídeo de GDF maduro em interagir especificamente com ser receptor, ou qualquer outra atividade que estimule ou iniba a atividade de transdução de sinal de GDF.

A presente invenção refere-se ainda a um polipeptídeo de pró-GDF mutante, por exemplo, um polipeptídeo de promiostatina mutante ou

um polipeptídeo de pró-GDF-11 mutante, que contém uma mutação de aminoácido que rompe a clivagem proteolítica em um sítio de clivagem proteolítica tendo uma seqüência de aminoácido Arg-Xa-Xaa-Arg (SEQ ID NO: 21). Desse modo, um polipeptídeo de promiostatina mutante ou pró-GDF-11 pode ter uma mutação de um resíduo Arg da SEQ ID NO: 21, de modo que o polipeptídeo mutante não pode ser clivado em um peptídeo de GDF de pró-domínio e um maduro. De preferência, o polipeptídeo de GDF mutante tem uma atividade negativa dominante com relação a um polipeptídeo de GDF do tipo selvagem correspondente ou relacionado. Por exemplo, um polipeptídeo de promiostatina mutante ou um polipeptídeo de pró-GDF-11 mutante pode exibir uma atividade negativa dominante com relação à miostatina ou GDF-11, respectivamente.

A presente invenção também refere-se a um polinucleotídeo codificando uma porção de peptídeo de um polipeptídeo de promiostatina ou pró-GDF-11. Por exemplo, o polinucleotídeo pode codificar um pró-domínio de miostatina ou GDF-11, ou uma porção de peptídeo funcional dele. A invenção refere-se ainda a anticorpos que se ligam especificamente a uma porção de peptídeo de um polipeptídeo de promiostatina, por exemplo, a um pró-domínio de miostatina ou uma porção de peptídeo funcional dele, bem como a anticorpos que podem especificamente se ligar a uma porção de peptídeo de um polipeptídeo de pró-GDF-11. Um kit contendo uma porção de peptídeo de um polipeptídeo de promiostatina ou pró-GDF-11, ou um polipeptídeo de promiostatina ou pró-GDF-11 mutante, ou um polinucleotídeo codificando uma porção de peptídeo de uma promiostatina ou um polipeptídeo de pró-GDF-11, ou um anticorpo que se liga especificamente a tal porção de um peptídeo, ou uma combinação dele, é também provido.

Em adição, a presente invenção refere-se a um método de identificação de uma porção de peptídeo funcional de um pró-domínio de miostatina ou um pró-domínio de GDF-11 que interage especificamente com um peptídeo de miostatina, um peptídeo de GDF-11, ou ambos. Um método de invenção pode ser realizado, por exemplo, testando uma porção de peptídeo de um pró-domínio de miostatina ou um pró-domínio de GDF-11 quanto à

habilidade em interagir especificamente com miostatina; e detecção de uma interação específica da porção de peptídeo com a miostatina. Em uma modalidade, um método da invenção é realizado usando um sistema de computador, onde a habilidade de uma porção de peptídeo virtual de um pró-
5 domínio de miostatina ou um pró-domínio de GDF-11 em interagir especificamente com um peptídeo de miostatina virtual é testada. Em uma outra modalidade, o método é realizado contatando a porção de peptídeo do pró-
domínio e o peptídeo de miostatina sob condições adequadas para que um pró-domínio especificamente interaja com um peptídeo de miostatina.

10 Breve Descrição das Figuras

A Figura 1 mostra as seqüências de aminoácido de promiostatina de murino (SEQ ID NO: 4), promiostatina de rato (SEQ ID NO: 6); promiostatina humana (SEQ ID NO: 2); promiostatina de babuíno (SEQ ID NO: 10); promiostatina bovina (SEQ ID NO: 12); promiostatina de porco (SEQ ID NO: 14); e promiostatina de ovino (SEQ ID NO: 16); promiostatina de galinha (SEQ ID NO: 8) e promiostatina de peru (SEQ ID NO: 18); e promiostatina de peixe zebra (SEQ ID NO: 20). Os aminoácidos são numerados com relação à promiostatina humana (SEQ ID NO: 2). As linhas pontilhadas indicam lacunas introduzidas para maximizar a homologia. Resíduos idênticos entre
15 20 as seqüências são sombreados.

A Figura 2 mostra as seqüências de aminoácido de promiostatina de murino (SEQ ID NO: 4) e promiostatina de peixe zebra (SEQ ID NO: 20), e porções das seqüências de aminoácido de promiostatina de alelo de salmão 1 (SEQ ID NO: 27; "salmão 1") e promiostatina de alelo de salmão 2 (SEQ ID NO: 29, "salmão 2"). A posição do aminoácido com relação à promiostatina humana é indicada à esquerda de cada fileira (compare a Figura 1; o primeiro aminoácido do salmão 1 corresponde à promiostatina humana 218; o primeiro aminoácido do salmão 2 corresponde à promiostatina humana 239). As linhas pontilhadas indicam lacunas introduzidas para maximizar a homologia. Posições de aminoácido relativas, incluindo lacunas, são indicadas junto ao alto de cada fileira. Resíduos idênticos entre as seqüências são sombreados.

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção provê uma porção de peptídeo substancialmente purificada de um polipeptídeo de promiostatina. A promiostatina, que anteriormente foi referida como um fator-8 de diferenciação de crescimento (GDF-8), compreende um peptídeo de miostatina maduro de pró-domínio amino terminal e C-terminal (vide Patente U.S. No. 5.827.733). A atividade da miostatina é realizada pelo peptídeo de miostatina maduro seguindo a sua clivagem a partir de promiostatina. Desse modo, a promiostatina é um polipeptídeo precursor que é proteoliticamente clivado para produzir miostatina ativa. Conforme aqui descrito, o pró-domínio da miostatina pode inibir a atividade da miostatina, atividade do GDF-11, ou ambos.

A presente invenção também provê uma porção de peptídeo substancialmente purificada de um polipeptídeo de pró-GDF-11. Pró-GDF-11, que foi anteriormente referido geralmente como GDF-11, compreende um peptídeo de GDF-11 maduro de pró-domínio amino terminal e C-terminal (vide Publicação Internacional No. WO 98/35019, que é aqui incorporada a título de referência). A atividade do GDF-11 é realizada pelo peptídeo de GDF-11 maduro seguindo a sua clivagem a partir de pró-GDF-11. Desse modo, pró-GDF-11, tal como promiostatina, é um polipeptídeo precursor que é proteoliticamente clivado para produzir GDF-11 ativo. Conforme aqui descrito, o pró-domínio de GDF-11 pode inibir a atividade de GDF-11, atividade da miostatina, ou ambos.

A promiostatina e o pró-GDF-11 são membros da superfamília do fator- β de transformação de crescimento (TGF- β), que consiste em polipeptídeo multifuncionais que controlam a proliferação, diferenciação e outras funções em vários tipos de célula. A superfamília do TGF- β , que comprehende um grupo de proteínas estruturalmente relacionadas que afetam uma ampla faixa de processos de diferenciação durante o desenvolvimento embrônico, inclui, por exemplo, substância de inibição Mullerian (MIS), que é requerida para desenvolvimento do sexo masculino normal (Behringer e outros, *Nature*, 345:167, 1990), produto de gene decapentaplégico (DPP) *Drosophila*, que é requerido para formação do eixo dorsal-ventral e morfogênese

dos discos imaginais (Padgett e outros, Nature 325:81-84, 1987), o produto do gene *Xenopus Vg-1*, que se localiza no pólo vegetal de ovos (Weeks e outros, Cell 52:861-867, 1987), as activinas (Mason e outros, Biochem. Biophys. Res. Comm. 135:957-964, 1986), que podem induzir a formação de mesoderma e estruturas anteriores em embriões *Xenopus* (Thomsen e outros, Cell 63:485, 1990) e as proteínas morfogênicas do osso (BMPs, osteogenina, OP-1), que podem induzir formação de cartilagem e osso *de novo* (Sampath e outros, J. Biol. Chem. 265:13198, 1990). Os membros da família de TGF- β podem influenciar uma variedade de processo de diferenciação, incluindo adipogênese, miogênese, condrogênese, hematopoiese e diferenciação de célula epitelial (Massague, Cell 49:437, 1987; Massague, Ann. Rev. Biochem. 67:753-791, 1998; cada uma deles aqui incorporado a título de referência).

Muitos membros da família do TGF- β têm efeitos de regulagem (positiva ou negativa) sobre outros fatores de crescimento de peptídeo. Em particular, certos membros da superfamília de TGF- β têm padrões de expressão ou possuem atividades que se relacionam com o funcionamento do sistema nervoso central. Por exemplo, as inibinas e activinas são expressas no cérebro (Meunier e outros, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85:247, 1988; Sawchenko e outros, Nature 334:615, 1988), e a activina pode funcionar como uma molécula de sobrevivência de célula nervosa (Schubert e outros, Nature 344:868, 1990). Um outro membro da família, fator-1 de diferenciação de crescimento (GDF-1), é específico do sistema nervoso em seu padrão de expressão (Lee, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 88:4250, 1991), e outros membros da família tal como Vrg-1 (Lyons e outros, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86:4554, 1989; Jones e outros, Development 111:531, 1991), OP-1 (Ozkaynak e outros, J. Biol. Chem. 267:25220, 1992) e BMP-4 (Jones e outros, Development 111:531, 1991), são também expressos no sistema nervoso. Devido ao fato do músculo esquelético produzir um fator ou fatores que promovem a sobrevivência de neurônios motores (Brown, Trends Neurosci. 7:10, 1984), a expressão de miostatina (GDF-8) e GDF-11 no músculo sugere que a miostatina e GDF-11 podem ser fatores trópicos para os neu-

rônios. Desse modo, métodos para modulação da atividade de miostatina, GDF-11 ou ambos podem ser úteis para tratamento de doenças neurodegenerativas tal como esclerose amiotrópica lateral ou distrofia muscular, ou para manter as células ou tecidos em cultura antes do transplante.

5 As proteínas da família de TGF- β são sintetizadas como proteínas precursoras grandes, que subsequentemente sofrem clivagem proteolítica em um grupo de resíduos básicos de aproximadamente 110 a 140 aminoácidos a partir do terminal C, resultando na formação de um peptídeo predominante e um peptídeo maduro C-terminal. Os peptídeos maduros C-10 terminais dos membros desta família de proteínas são estruturalmente relacionados, e os membros da família diferentes podem ser classificados em subgrupos diferentes baseados na extensão de sua homologia. Embora as homologias dentro de subgrupos particulares variem de 70% a 90% de identidade de seqüência de aminoácido, as homologias entre os subgrupos são 15 significantemente menores, geralmente variando de 20% a 50%. Em cada caso, as espécies ativas parecem ser um dímero ligado a dissulfeto de fragmentos de peptídeo C-terminal.

20 Polipeptídeos de promiostatina e pró-GDF-11 foram identificados em espécies de mamífero, aves e peixes, e a miostatina é ativa em varias outras espécies, incluindo vertebrados e invertebrados. Durante o desenvolvimento embriônico e em animais adultos, a miostatina, por exemplo, é expressa especificamente por células nas linhas impressas miogênica (McPherron e outros, *Nature* 387:83-90, 1997, que é incorporada aqui a título de referência). Durante a embriogênese inicial, a miostatina é expressa por 25 céulas no compartimento de miotoma de somitos de desenvolvimento. Em estágios embriônicos mais avançados e em animais adultos, a miostatina é expressa amplamente em tecido muscular esquelético, embora os níveis de expressão variem consideravelmente de músculo para músculo. A expressão da miostatina também é detectada em tecido adiposo, embora em níveis 30 menores do que no músculo. Similarmente, GDF-11 é expresso no músculo esquelético e tecido adiposo, bem como em timo, baço e útero adulto, e também é expresso no cérebro em vários estágios de desenvolvimento.

Os polipeptídeos de promiostatina de várias espécies compartilham identidade de seqüência substancial, e as seqüências de aminoácido de seqüência C-terminal de miostatina madura de humano, murino, rato e galinha são 100% idênticas (vide Figura 1). Os polipeptídeos de promiostatina são exemplificados aqui (vide Figura 1) por promiostatina humana ((SEQ ID NO: 2); promiostatina de murino (SEQ ID NO: 4), promiostatina de rato (SEQ ID NO: 6); promiostatina de babuíno (SEQ ID NO: 10); promiostatina bovina (SEQ ID NO: 12); promiostatina de porco (SEQ ID NO: 14); e promiostatina de ovino (SEQ ID NO: 16); promiostatina de galinha (SEQ ID NO: 8) 10 e promiostatina de peru (SEQ ID NO: 18); e promiostatina de peixe zebra (SEQ ID NO: 20). Os polipeptídeos de promiostatina são também exemplificados aqui por um polipeptídeo compreendendo as porções de alelo 1 de salmão (SEQ ID NO: 27; "salmão 1") e de alelo 2 de salmão (SEQ ID NO: 29; "salmão 2"; vide Figura 2). As moléculas de ácido nucléico codificando 15 esses polipeptídeos de promiostatina são descritas aqui como SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 7, 17, 19, 26 e 28, respectivamente (vide também McPherron e Lee, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 94:12457, 1997, que é aqui incorporado a título de referência). Um polipeptídeo de pró-GDF-11 é exemplificado aqui por pró-GDF-11 humano (SEQ ID NO: 25), que é codificado pela 20 SEQ ID NO: 24.

Em vista da longa conservação entre os polipeptídeos de promiostatina, particularmente entre espécies tão diversas quanto humanos e peixe, seria uma questão rotineira se obter nucleotídeos codificando miostatina de qualquer espécie, incluindo o restante das seqüências de salmão 1 e 25 salmão 2, e identificar a expressão de promiostatina ou miostatina em qualquer espécie. Em particular, a seqüência de miostatina madura compartilha homologia significante com outros membros da superfamília de TGF- β , e a miostatina contém a maior parte dos resíduos que são altamente conservados entre os outros membros da família e em outras espécies. Ainda, a miostatina, tal como TGF- β s e inibina β s, contém um par extra de resíduos de cisteína em adição a sete resíduos de cisteína presentes em virtualmente 30 todos os outros membros da família. A miostatina é mais homóloga a Vgr-1

(45% de identidade de seqüência). Tal como outros membros da superfamília de TGF- β , a miostatina é sintetizada como um polipeptídeo de promiostatina precursor maior que é proteoliticamente clivado em um peptídeo de miostatina ativo.

5 Os polinucleotídeos que codificam polipeptídeos de promiostatina de vários organismos podem ser identificados usando procedimentos e algoritmos bem conhecidos com base na identidade (ou homologia) com as seqüências descritas. A homologia ou identidade é muitas vezes medida usando software de análise de seqüência tal como Sequence Analysis Software Package do Genetics Computer Group (University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Tal software combina seqüências similares apontando os graus de homologia para várias deleções, substituições e outras modificações. O termo "homologia" e "identidade", quando usado aqui no contexto de duas ou mais seqüências de áci-
10 dos nucléico ou polipeptídeo, refere-se a duas ou mais seqüências ou subseqüências que são iguais ou têm uma porcentagem especificada de resíduos de aminoácido ou de nucleotídeos que são iguais quando comparadas e alinhadas para correspondência máxima em uma janela de comparação ou região designada conforme medido usando qualquer número de algoritmos
15 de comparação de seqüência ou através de alinhamento manual e inspeção visual.
20

Para comparação de seqüência, tipicamente uma seqüência age como uma seqüência de referência, com a qual as seqüências de teste são comparadas. Quando usando um algoritmo de comparação de seqüência, seqüências de teste e de referência são postas no computador, coordenados de seqüência são designados, se necessário, e os parâmetros de programa de algoritmo de seqüência são designados. Parâmetros de programa ausentes podem ser usados, ou parâmetros alternativos podem ser designados. O algoritmo de comparação de seqüência então calcula as identidades de seqüência percentuais para as seqüências de teste com relação às seqüências de referência, com base nos parâmetros do programa.
25
30

O termo "janela de comparação" é usado aqui amplamente para

incluir referência a um segmento de qualquer uma das várias posições contíguas, por exemplo, cerca de 20 a 600 posições, por exemplo, posição de aminoácido ou nucleotídeo, geralmente cerca de 50 a cerca de 200 posições, mais comumente cerca de 100 a cerca de 150 posições, onde uma

5 seqüência pode ser comparada a uma seqüência de referência do mesmo número de posições contíguas após as duas seqüências serem otimamente alinhadas. Métodos de alinhamento de seqüência para comparação são bem conhecidos na técnica. Alinhamento ótimo de seqüências para comparação pode ser realizado, por exemplo, através de algoritmo de homologia local de

10 Smith e Waterman (*Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981), através do algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman and Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:443, 1970), através do método de pesquisa quanto à similaridade de Person e Lipman (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988), cada um deles aqui incorporada a título de referência; através de implementações computadorizadas desses algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI); ou através de alinhamento manual e inspeção visual. Outros algoritmos para determinação da homologia ou identidade incluem, por exemplo, em adição ao programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool

15 no National Center for Biological Information), ALIGN, AMAS (Analysis of Multiply Aligned Sequences), AMPS (Protein Multiple Sequence Alignment), ASSET (Aligned Segments Statistical Evaluation Tool), BANDS, BEST-SCOR, BIOSCAN (Biological Sequence Comparative Analysis Node), BLIMPS (Blocks Improved Searcher), FASTA, Intervals&Points, BMB,

20 CLUSTAL V, CLUSTAL W, CONSENSUS, LCONSENSUS, WCONSENSUS, algoritmo Smith-Waterman, DARWIN, algoritmo Las Vegas, FNAT (Forced Nucleotide Alignment Tool), Framealignn, Framesearch, DYNAMIC, FILTER, FSAP (Fristensky Sequence Analysis Package), GAP (Global Alignment Program), GENAL, GIBBS, GenQuest, ISSC (Sensitive Sequence Comparison), LALIGN (Local Sequence Alignment), LCP (Local Content Program),

25 MACAW (Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench), MAP (Multiple Alignment Program), MBLKP, MBLKN, PIMA (Pattern-Induced

30

Multi-sequence Alignment), SAGA (Sequence Alignment by genetic Algorithm) e WHAT-IF. Tais programas de alinhamento podem ser também usados para avaliar dados de base de genoma para identificar seqüências de polinucleotídeos tendo seqüências substancialmente idênticas.

5 Vários dados de base de genoma estão disponíveis para comparação, incluindo, por exemplo, uma porção substancial do genoma humano que está disponível como parte do Human Genome Sequencing Project (J. Roach, http://weber.u.Washington.edu/~roach/human_genome_progress_2.html). Em adição, pelo menos vinte genomas foram seqüenciados em sua totalidade, incluindo, por exemplo, *M. genitalium*, *M. jannaschii*, *H. influenzae*, *E. coli*, levedura (*S. cerevisiae*) e *D. melanogaster*. Progresso significante foi também feito no seqüenciamento de genomas de organismo modelo tal como camundongo, *C. elegans* e *Arabidopsis sp*. Vários dados de base contendo informação genômica anotada com alguma informação funcional são mantidos por organizações diferentes, e são acessíveis através da Internet, por exemplo, <http://wwwtigr.org/tdb>; <http://www.genetics.wisc.edu>; <http://genome-www.stanford.edu/~ball>; <http://hiv-web.lanl.gov>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; <http://www.ebi.ac.uk>; <http://Pasteur.fr/other/biology>; e <http://www.genome.wi.mit.edu>.

10 20 Um exemplo de um algoritmo útil são algoritmos BLAST e BLAST 2,0, que são descritos por Altschul e outros (*Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1977; *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990, cada um aqui incorporado a título de referência). Software para realizar análise BLAST está publicamente disponível através do National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Este algoritmo envolve primeiro identificação de pares de seqüência de contagem alta (HSPs) através da identificação de palavras pequenas de comprimento W na seqüência em dúvida, que ou combinam ou satisfazem alguma contagem limiar de valor positivo T quando alinhadas com uma palavra do mesmo comprimento na seqüência de dados de base. T é referido como o limiar de contagem de palavra da vizinhança (Altschul e outros, supra, 1977, 1990). Esses acertos de palavra da vizinhança iniciais agem como sementes para iniciar pesquisas para encontrar

15 25 30

HSPs mais longos contendo-as. Os acertos de palavra são estendidos em ambas direções ao longo de cada seqüência pelo máximo que a contagem de alinhamento cumulativa puder ser aumentada. Contagens cumulativas são calculadas usando, para seqüências de nucleotídeo, os parâmetros M (contagem de recompensa para um par de resíduos em combinação; sempre > 0). Para seqüências de aminoácido, uma matriz de contagem é usada para calcular a contagem cumulativa. A extensão do acerto da palavra em cada direção é parada quando: a contagem de alinhamento cumulativa cai pela quantidade X a partir do seu valor máximo atingido; a contagem cumulativa vai a zero ou menos, devido ao acúmulo de um ou mais alinhamentos de resíduo de contagem negativa; ou o final de qualquer seqüência é atingido. Os parâmetros do algoritmo BLAST W, T e X determinam a sensibilidade e a velocidade do alinhamento. O programa BLAST (para seqüências de nucleotídeo) usa como ausência um comprimento de palavra (W) de 11, uma expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4 e uma comparação de ambos filamentos. Para seqüências de aminoácido, o programa BLAST usa como ausências um comprimento de palavra de 3, e expectativas (E) de 10, e os alinhamentos (B) de matriz de contagem BLOSUM62 (vide Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89:10915, 1989) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4, e uma comparação de ambos filamentos.

O algoritmo BLAST também realiza uma análise estatística da similaridade entre duas seqüências (vide, por exemplo, Karlin e Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 90:5873, 1993, que é aqui incorporado a título de referência). Uma medição de similaridade provida pelo algoritmo BLAST é a menor probabilidade de soma (P(N)), que provê uma indicação da probabilidade através da qual uma combinação entre duas seqüências de nucleotídeo ou aminoácido aconteceria por acaso. Por exemplo, um ácido nucléico é considerado similar a uma seqüência de referência se a menor probabilidade de soma em uma comparação do ácido nucléico de teste com o ácido nucléico de referência for menos do que cerca de 0,2, com mais preferência menos do que cerca de 0,01, e com mais preferência menos do que cerca de 0,001.

Em uma modalidade, homologias de seqüência de proteína e ácido nucléico são avaliadas usando o Basic Local Alignment Search Tool ("BLAST"). Em particular, cinco programas BLAST específicos são usados para realizar a seguinte tarefa:

- 5 (1) BLASTP e BLAST3 compararam uma seqüência de dúvida de aminoácido contra dados de base de uma seqüência de proteína;
- (2) BLASTN compara uma seqüência de dúvida de nucleotídeo contra dados de base de seqüência de nucleotídeo;
- (3) BLASTX compara os produtos de tradução conceitual de seis
- 10 estruturas de uma seqüência de nucleotídeo de dúvida (ambos filamentos) contra dados de base de uma seqüência de proteína;
- (4) TBLASTN compara uma seqüência de proteína de dúvida contra dados de base de uma seqüência de nucleotídeo traduzida em todas as seis estruturas de leitura (ambos filamentos); e
- 15 (5) TBLASTX compara as traduções de seis estruturas de uma seqüência de dúvida de nucleotídeo contra traduções de seis estruturas de dados de seqüência de nucleotídeo.

Os programas BLAST identificam seqüências homólogas identificando segmentos similares, que são aqui referidos como "pares de segmento de contagem alta", entre uma seqüência de amino ou ácido nucléico de dúvida e pelo menos uma seqüência que é de preferência obtida de dados de base de uma seqüência de proteína ou ácido nucléico. Pares de segmento de contagem alta são de preferência identificados (isto é, alinhados) por meio de matriz de contagem, muitas das quais são conhecidas na técnica. De preferência, a matriz de contagem usada é a matriz BLOSUM62 (Gonnet e outros, Science 256:1443-1445, 1992; Henikoff e Henikoff, Proteins 17:49-61, 1993, cada um aqui incorporado a título de referência). Com menos preferência, as matrizes PAM ou PAM250 podem ser também usadas (Schwartz e Dayhoff, eds., "Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure", (Washington, National Biomedical Research Foundation, 1978)). Programas BLAST são acessíveis através do U.S. National Library of Medicine, por exemplo, no www.ncbi.nlm.nih.gov.

Os parâmetros usados com os algoritmos acima podem ser adaptados dependendo do comprimento da seqüência e grau de homologia estudado. Em algumas modalidades, os parâmetros podem ser os parâmetros de ausência usados pelos algoritmos na ausência de instruções para o

5 usuário.

Um polinucleotídeo codificando uma promiostatina pode ser derivado de qualquer organismo, incluindo, por exemplo, camundongo, rato, vaca, porco, humano, galinha, peru, peixe zebra, salmão, "finfish", outros organismos aquáticos e outras espécies. Exemplos de organismos aquáticos

10 incluem aqueles que pertencem à classe *Piscina*, tal como truta, "char", "ayu", carpa, carpa "crucian", peixe dourado, "roach", "whitebait", enguia, "conger eel", sardinha, peixe voador, perca do mar, "sea bream", perca papagaio, "snapper", cavala, cavala "horse", atum, bonito, rabo amarelo, peixe pedra, linguado, linguado, "blowfish", "filefish"; aqueles pertencentes à classe

15 *Cephalopoda*, tal como lula, "cuttlefish", polvo; aqueles pertencentes à classe dos *Pelecypoda*, tal como mariscos (por exemplo, de casca dura, Manila, Quahog, Surf, Casca Macia); berbigão, mexilhões, "periwinkles", vieiras (por exemplo, mar, baía, "caloo"); concha, caracóis, pepinos do mar; e concha de arca; ostras (por exemplo, *C. virginica*, Golfo, Nova Zelândia, Pacífico); a-

20 queles pertencentes à classe *Gastropoda* tal como casca de turbante, haliote (por exemplo, verde, rosa, vermelho); e aqueles pertencentes à classe *Crustácea* tal como lagosta, incluindo mas não limitado a Spiny, Rock e Americana; "prawn", camarão, incluindo mas não limitado a *M. rosenbergii*, *P. styli-*
rolls, *P. indicus*, *P. japonicus*, *P. monodon*, *P. vannemeli*, *M. ensis*, *S. melan-*

25 *tho*, *N. norvegicus*, camarão de água fria; caranguejo, incluindo mas não limitado a, Azul, gralha, pedra, rei, rainha, neve, marrom, "dungeness", Jonah, Mangrove, de casca mole; "squilla", "krill", lagostinos; camarão de água doce, incluindo, mas não limitado a, Azul, Marrom, de Pata vermelha, de casca mole, branco; *Annelida*; *Chordata*, incluindo, mas não limitado a, rép-

30 teis tal como jacarés e tartarugas; *Amphibia*, incluindo sapos; e *Echinodermata*, incluindo mas não limitado a ouriços-do-mar.

A presente invenção provê porções de peptídeo substancialmen-

te purificadas de um polipeptídeo de promiostatina e porções de peptídeo substancialmente purificadas de um polipeptídeo de pró-GDF-11. Conforme aqui usado, referência à "pró-GDF", por exemplo, promiostatina ou pró-GDF-11, significa o polipeptídeo de comprimento completo, incluindo o pró-domínio amino terminal e o peptídeo de GDF biologicamente ativo carbóxi terminal. Em adição, o pró-domínio inclui um peptídeo de sinal (seqüência líder), que compreende por volta dos primeiros 15 a 30 aminoácidos no terminal amino do pró-domínio. O peptídeo de sinal pode ser clivado a partir do polipeptídeo de pró-GDF de comprimento completo, que pode ser ainda clivado em um sítio de clivagem proteolítico Arg-Xaa-Xaa-Arg (SEQ ID NO: 21).

Referência aqui a resíduos de aminoácido é feita com relação aos polipeptídeos de pró-GDF de comprimento completo conforme mostrado nas Figuras 1 e 2 (vide, também, Listagem de Seqüência). Deve ser reconhecido que referência é feita aqui a peptídeos particulares começando ou terminando "por volta" de um resíduo de aminoácido em particular. O termo "por volta" é usado nesse contexto porque é reconhecido que uma protease em particular pode clivar um polipeptídeo de pró-GDF no ou imediatamente adjacente a um sítio de reconhecimento de clivagem proteolítico, ou um ou alguns aminoácidos do sítio de reconhecimento. Desse modo, referência, por exemplo, a um pró-domínio de miostatina tendo uma seqüência por volta dos resíduos de aminoácido 1 a 263 da SEQ ID NO: 4 incluiria uma porção de peptídeo amino terminal de promiostatina que inclui o peptídeo de sinal e tem um terminal carbóxi terminando do resíduo de aminoácido 257 ao resíduo de aminoácido 269, de preferência no resíduo de aminoácido 260 ao resíduo de aminoácido 266.

Similarmente, o peptídeo de sinal pode ser clivado em qualquer posição a partir por volta do resíduo de aminoácido 15 a 30 de um polipeptídeo de pró-GDF, por exemplo, no resíduo 15, 20, 25 ou 30, sem afetar o funcionamento, por exemplo, de um pró-domínio restante. Desse modo, para conveniência, referência é feita em geral aqui a uma porção de peptídeo de um polipeptídeo de pró-GDF, a partir do qual o peptídeo de sinal foi clivado,

como começando a partir por volta do resíduo de aminoácido 20. No entanto, será reconhecido que a clivagem do peptídeo de sinal pode ser em qualquer posição de aminoácido dentro por volta dos primeiros 15 a 30 aminoácidos amino terminal de um polipeptídeo pró-GDF. Desse modo, referência, 5 por exemplo, a um pró-domínio de miostatina tendo uma seqüência de por volta dos resíduos de aminoácido 20 a 263 da SEQ ID NO: 4 incluiria uma porção de peptídeo de promiostatina que não tem por volta dos 15 a 30 aminoácidos de promiostatina, compreendendo o peptídeo de sinal, e que tem um terminal carbóxi terminando no resíduo de aminoácido 257 ao resíduo de 10 aminoácido 269, de preferência no resíduo de aminoácido 260 até o resíduo de aminoácido 266.

Em geral, referência é feita aqui a um polipeptídeo de pró-GDF ou um pró-domínio de GDF como começando por volta do aminoácido 1. Em vista da descrição acima, no entanto, será reconhecido que tais polipeptídeos de pró-GDF ou pró-domínios de GDF que não têm o peptídeo de sinal 15 são também compreendidos na presente invenção. Ainda com relação a isso, deve ser reconhecido que a presença ou ausência de um peptídeo de sinal em um peptídeo da invenção pode influenciar, por exemplo, os compartimentos de uma célula através da qual um peptídeo, por exemplo, um pró- 20 domínio de miostatina vai passar e na qual o peptídeo vai se localizar por último, incluindo se o peptídeo será secretado da célula. Desse modo, a presente invenção provê ainda uma porção de peptídeo de sinal substancialmente purificada de um peptídeo de pró-GDF. Conforme aqui descrito, tal peptídeo de sinal pode ser usado para marcar um agente, particularmente 25 um agente peptídeo, para os mesmos compartimentos celulares que o GDF de ocorrência natural a partir do qual o peptídeo de sinal é derivado. O termo "peptídeo" ou "porção de peptídeo" é usado amplamente aqui para significar dois ou mais aminoácidos ligados por uma ligação de peptídeo. O termo "fragmento" ou "fragmento proteolítico" também é usado aqui para se referir 30 a um produto que pode ser produzido através de uma reação proteolítica em um polipeptídeo, isto é, um peptídeo produzido quando da clivagem de uma ligação de peptídeo no polipeptídeo. Embora o termo "fragmento proteolítico"

seja usado aqui em geral para se referir a um peptídeo que pode ser produzido através de uma reação proteolítica, deve ser reconhecido que o fragmento não precisa ser necessariamente produzido por uma reação proteolítica, mas também pode ser produzido usando métodos de síntese química 5 ou métodos de tecnologia de DNA recombinante, conforme discutido em mais detalhe abaixo, para produzir um peptídeo sintético que é equivalente a um fragmento proteolítico. Em vista da homologia descrita da promiostatina com outros membros da superfamília dos TGF- β , será reconhecido que um peptídeo da invenção é caracterizado, em parte, pelo fato de que ele não 10 está presente em membros anteriormente descritos desta superfamília. Se uma porção de peptídeo de um polipeptídeo de promiostatina ou pró-GDF-11 está presente em um membro da superfamília de TGF- β anteriormente descrita pode ser imediatamente determinado usando os algoritmos de computador descritos acima.

15 Em geral, um peptídeo da invenção contém pelo menos cerca de seis aminoácidos, geralmente contém cerca de dez aminoácidos, e pode conter quinze ou mais aminoácidos, particularmente vinte e ou mais aminoácidos. Deve ser reconhecido que o termo "peptídeo" não é usado aqui para sugerir um tamanho ou número de aminoácidos em particular compreendendo 20 a molécula, e que um peptídeo da invenção pode conter até vários resíduos de aminoácido ou mais. Por exemplo, um peptídeo de miostatina C-terminal maduro de comprimento completo contém mais de 100 aminoácidos e um peptídeo de pró-domínio de comprimento completo pode conter mais de 260 aminoácidos.

25 Conforme aqui usado, o termo "substancialmente purificado" ou "substancialmente puro" ou "isolado" significa que a molécula sendo referida a, por exemplo, um peptídeo ou um polinucleotídeo, está em uma forma que é relativamente livre de proteínas, ácidos nucléicos, lipídeos, carboidratos ou outros materiais com os quais ela se associa naturalmente. Em geral, um 30 peptídeo, polinucleotídeo, ou outra molécula substancialmente pura, constitui pelo menos vinte por cento de uma amostra, geralmente constitui pelo menos cerca de cinqüenta por cento de uma amostra, geralmente constitui pelo

menos cerca de oitenta por cento de uma amostra, e particularmente constitui cerca de noventa por cento ou noventa e cinco por cento ou mais de uma amostra. Uma determinação de que um peptídeo ou polinucleotídeo da invenção é substancialmente puro pode ser feita usando métodos bem conhecidos, por exemplo, realizando eletroforese e identificando a molécula em particular como uma faixa relativamente diferente. Um polinucleotídeo substancialmente puro, por exemplo, pode ser obtido através de clonagem do polinucleotídeo, ou através de síntese química ou enzimática. Um peptídeo substancialmente puro pode ser obtido, por exemplo, através de um método de síntese química, ou usando métodos de purificação de proteína, seguido por proteólise e, se desejado, purificação adicional através de métodos cromatográficos ou eletroforéticos.

Um peptídeo da invenção pode ser identificado através de comparação com uma seqüência de promiostatina ou pró-GDF-11 e determinação de que a seqüência de aminoácido do peptídeo está contida na seqüência de promiostatina ou pró-GDF-11, respectivamente. Deve ser reconhecido, no entanto, que um peptídeo da invenção não precisa ser idêntico a uma seqüência de aminoácido de promiostatina ou pró-GDF-11. Desse modo, o peptídeo da invenção pode corresponder a uma seqüência de aminoácido de um polipeptídeo de promiostatina, por exemplo, mas pode variar de uma seqüência de ocorrência natural, por exemplo, ao conter um ou mais D-aminoácidos no lugar de um L-aminoácido correspondente; ou contendo um ou mais análogos de aminoácido, por exemplo, um aminoácido que foi derivado ou de outro modo modificado nessa cadeia lateral reativa. Similarmente, uma ou mais ligações de peptídeo no peptídeo podem ser modificadas. Em adição, um grupo reativo no terminal amino ou no terminal carbóxi ou ambos pode ser modificado. Tais peptídeos podem ser modificados, por exemplo, para terem estabilidade aperfeiçoada a uma protease, um agente oxidante ou outro material reativo que o peptídeo possa encontrar em um ambiente biológico, e, desse modo, por ser particularmente útil em realizar um método da invenção. Por certo, os peptídeos podem ser modificados para terem estabilidade menor em um ambiente biológico de modo que o perí-

odo de tempo que o peptídeo é ativo no ambiente é reduzido.

A seqüência de um peptídeo da invenção pode ser também modificada em comparação com a seqüência correspondente em um polipeptídeo de promiostatina ou pró-GDF-11 incorporando uma substituição de aminoácido conservadora a um ou alguns aminoácidos no peptídeo. Substituições de aminoácido conservadoras incluem a substituição de um resíduo de aminoácido com um outro resíduo de aminoácido tendo relativamente as mesmas características químicas, por exemplo, a substituição de um resíduo hidrofóbico, tal como isoleucina, valina, leucina ou metionina por outro, ou a substituição de um resíduo polar por outro, por exemplo, substituição de lisina por arginina; ou de ácido aspártico por glutâmico; ou de asparagina por glutamina; ou similar. Exemplos de posições de um polipeptídeo de promiostatina que podem ser modificadas são evidentes a partir do exame da Figura 1, que mostra várias diferenças de aminoácido no pró-domínio de miostatina e peptídeo de miostatina maduro que não afetam substancialmente a atividade da promiostatina ou miostatina.

A presente invenção também provê um fragmento proteolítico substancialmente purificado de um polipeptídeo de fator de diferenciação de crescimento (GDF) (um polipeptídeo de pró-GDF) ou uma porção peptídeo funcional dele. Fragmentos proteolíticos de um polipeptídeo de GDF são exemplificados aqui por fragmentos proteolíticos de um polipeptídeo de promiostatina e fragmentos proteolíticos de um polipeptídeo de pró-GDF-11. Conforme descrito aqui, uma porção de peptídeo de um polipeptídeo de pró-GDF que é equivalente a um fragmento proteolítico de um pró-GDF pode ser produzida através de um método químico ou um método de DNA recombinante. Em vista da presente descrição, fragmentos proteolíticos de outros polipeptídeos de GDF podem ser imediatamente feitos e usados.

Em geral, peptídeos correspondendo a fragmentos proteolíticos de um polipeptídeo de pró-GDF são exemplificados por um fragmento de GDF maduro carbóxi-terminal (C-terminal), que pode interagir especificamente com um receptor de GDF e afetar a transdução de sinal de GDF, e um fragmento de pró-domínio amino terminal, que pode incluir um peptídeo

de sinal, e conforme aqui descrito, pode interagir especificamente com um polipeptídeo de pró-GDF ou peptídeo de GDF maduro e afetar a sua habilidade em realizar a transdução de sinal de GDF. Por exemplo, fragmentos proteolíticos de um polipeptídeo de promiostatina incluem um peptídeo de 5 miostatina C-terminal maduro, que pode interagir especificamente com um receptor de miostatina e induzir transdução de sinal de miostatina; e um fragmento de pró-domínio amino terminal, que pode interagir especificamente com miostatina, desse modo reduzindo ou inibindo a habilidade da miostatina em induzir transdução de sinal de miostatina.

10 Um fragmento proteolítico de um polipeptídeo de pró-GDF, ou uma porção funcional dele, é caracterizado, em parte, por ter ou realizar uma atividade associada ao estímulo ou inibição de transdução de sinal de GDF. Por exemplo, um polipeptídeo de promiostatina ou uma porção de peptídeo funcional dele pode ter atividade de ligação de receptor de miostatina, atividade estimuladora ou inibidora de transdução de sinal de miostatina, atividade de ligação de miostatina, atividade de ligação de promiostatina ou uma combinação delas. Desse modo, o termo "porção de peptídeo funcional", quando usado aqui em referência a um polipeptídeo de pró-GDF, significa uma porção de peptídeo do polipeptídeo de pró-GDF que pode interagir especificamente com o seu receptor e estimular ou inibir a transdução de sinal de GDF; que pode interagir especificamente com um GDF maduro ou pró-GDF; ou que exibe atividade de localização celular, isto é, a atividade de um peptídeo de sinal. Deve ser reconhecido que uma porção de peptídeo funcional de peptídeo de miostatina madura de comprimento completo, por exemplo, não precisa ter a mesma atividade da miostatina madura, incluindo a habilidade em estimular a transdução de sinal de miostatina, uma vez que as porções de peptídeo funcionais do peptídeo maduro podem ter, por exemplo, uma habilidade em interagir especificamente com um receptor de miostatina sem também ter a habilidade em ativar o curso de transdução de 15 sinal. Métodos de identificação de tal porção de peptídeo funcional de um polipeptídeo de pro-GDF, que podem ser úteis como um antagonista de miostatina, são descritos aqui ou de outra maneira conhecidos na técnica.

20

25

30

Desse modo, em uma modalidade, uma porção de peptídeo funcional de um polipeptídeo de promiostatina pode interagir especificamente com um receptor de miostatina, e pode agir como um antagonista para estimular a transdução de sinal de miostatina ou como um antagonista para reduzir ou inibir a

5 transdução de sinal de miostatina.

Em uma outra modalidade, uma porção de peptídeo funcional de um polipeptídeo de promiostatina pode interagir especificamente com um polipeptídeo de promiostatina ou com um peptídeo de miostatina maduro, desse modo bloqueando a transdução de sinal de miostatina. Tal porção de

10 peptídeo funcional de promiostatina pode agir, por exemplo, prevenindo a clivagem de um polipeptídeo de promiostatina em miostatina madura; formando um complexo com um peptídeo de miostatina maduro; ou através de algum outro mecanismo. Onde um complexo de peptídeo-miostatina é formado, o complexo pode bloquear a transdução de sinal de miostatina, por

15 exemplo, reduzindo ou inibindo a habilidade da miostatina em interagir especificamente com o seu receptor, ou ligando ao receptor na forma de que não a habilidade em induzir transdução de sinal de miostatina.

Fragmentos proteolíticos de um polipeptídeo de pró-GDF podem ser produzidos através de clivagem do polipeptídeo em um sítio de clivagem proteolítico tendo uma seqüência de aminoácido de consenso Arg-Xaa-Xaa-Arg (SEQ ID NO: 21). Tais sítios de reconhecidos proteolíticos são exemplificados pela seqüência Arg-Ser-Arg-Arg (SEQ ID NO: 22) mostrada como resíduos de aminoácido 236 a 266 na SEQ ID NO: 1 (promiostatina) ou resíduos de aminoácido 295 a 298 da SEQ ID NO: 25 (pró-GDF-11 humano; vide também posições relativas 267 a 270 da Figura 2); e pela seqüência Arg-Ile-Arg-Arg (SEQ ID NO: 23) mostrada como resíduos de aminoácido 263 a 266 na SEQ ID NO: 20.

Em adição ao sítio de clivagem proteolítico para o peptídeo de sinal, polipeptídeos de promiostatina, por exemplo, contêm dois sítios de processamento proteolítico potenciais adicionais (Lys-Arg e ARg-Arg). Clivagem de um polipeptídeo de promiostatina no ou próximo ao sítios de processamento proteolítico final, que está contido no sítio de reconhecimento de

clivagem proteolítico de consenso Arg-Xaa-Xaa-Arg (SEQ ID NO: 2) (vide, por exemplo, resíduos de aminoácido 263 a 266 da SEQ ID NO: 2), gera um fragmento de miostatina humano madura C-terminal biologicamente ativa. Os peptídeos de miostatina maduros de comprimento completo exemplificados contêm cerca de 103 a cerca de 109 aminoácidos e têm um peso molecular previsto de aproximadamente 12.000 dáltons (Da). Em adição, a miostatina pode formar dímeros, que têm um peso molecular esperado de cerca de 23 a 30 kilidáltons (kDa). Os dímeros podem ser homodímeros de miostatina ou podem ser heterodímeros, por exemplo, com GDF-11 ou um outro 5 membro da família GDF ou TGF-9.

10 Um fragmento proteolítico da invenção é exemplificado por um pró-domínio GDF, por exemplo, um pró-domínio de miostatina, que inclui resíduos por volta dos aminoácidos 20 a 262 de um polipeptídeo de promiostatina, ou uma porção de peptídeo funcional dele, ou um pró-domínio de 15 GDF-11, que inclui resíduos de aminoácido por volta de 20 a 295 de um polipeptídeo de pró-GDF-11, ou uma porção de polipeptídeo funcional dele, cada um deles pode ainda conter o peptídeo de sinal compreendendo por volta dos aminoácidos 1 a 20 do respectivo polipeptídeo de pró-GDF. Pró-domínios de miostatina são ainda exemplificados por volta dos resíduos de 20 aminoácido 20 a 63 conforme descrito na SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 6, bem como por volta dos resíduos de aminoácido 20 a 262 conforme descrito na SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, que podem ser produzidos através de clivagem proteolítica de um polipeptídeo de promiostatina correspondente, podem ser quimicamente sintetizados, ou podem ser expressos a partir de um polinucleotídeo recombinante codificando o fragmento proteolítico. Uma porção de peptídeo funcional de um pró-domínio de miostatina é exemplificada por uma porção de peptídeo de um pró-domínio de miostatina que pode interagir especificamente com miostatina ou com 25 promiostatina. Um pró-domínio de GDF-11 é exemplificado por volta dos resíduos de aminoácido 20 a 295 da SEQ ID NO: 25, que pode ainda incluir o peptídeo de sinal compreendendo por volta dos resíduos de aminoácido 1 a 30

20 da SEQ ID NO: 25, e uma porção de peptídeo funcional de um pró-domínio GDF-11 é exemplificada por uma porção de peptídeo de um pró-domínio GDF-11 que pode interagir especificamente com polipeptídeo de GDF-11 ou pró-GDF-11 maduro. De preferência, a porção de peptídeo funcional de um pró-domínio de GDF inibe a habilidade do GDF correspondente ou GDF relacionado em estimular transdução de sinal, por exemplo, reduzindo ou inibindo a habilidade do GDF em interagir especificamente com seu receptor, ou se ligando ao receptor como um complexo inativo. Em uma modalidade, a presente invenção provê um fragmento funcional de um polipeptídeo de pró-GDF, particularmente um fragmento funcional de um pró-domínio de GDF, operavelmente ligado a um peptídeo de sinal de GDF, de preferência um peptídeo de sinal de miostatina ou um peptídeo de sinal de GDF-11 compreendendo por volta dos primeiros 15 a 30 aminoácidos terminais de promiostatina ou pró-GDF-11, respectivamente.

15 Conforme aqui descrito, um pró-domínio de miostatina ou pró-domínio de GDF-11 pode interagir com a miostatina madura, GDF-11 ou ambos, desse modo reduzindo ou inibindo a habilidade da GDF madura em interagir especificamente com o seu receptor (vide Exemplos 7 e 8). Desse modo, uma porção de peptídeo funcional de um pró-domínio de miostatina, 20 por exemplo, pode ser obtida através de exame das porções de peptídeo de um pró-domínio de miostatina usando métodos conforme aqui provido, e identificando porções de peptídeo funcionais do pró-domínio que podem interagir especificamente com a miostatina ou com a promiostatina e podem reduzir ou inibir a habilidade da miostatina em interagir especificamente com 25 um receptor de miostatina ou em estimular a transdução de sinal de miostatina.

 Uma porção de peptídeo funcional de um pró-domínio de miostatina que pode especificamente interagir com miostatina, ou uma porção de peptídeo funcional de um outro pró-domínio de GDF, pode também ser identificada usando qualquer um dos vários ensaios sabidos ser úteis para identificação de interações proteína-proteína específicas. Tais ensaios incluem, por exemplo, métodos de eletroforese de gel, cromatografia de afinidade, o

sistema híbrido duplo de Fields e Song (Nature 340:245-246, 1989; vide, também, Patente U.S. No. 5.283.173; Fearon e outros, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89:7958-7962, 1992; Chien e outros, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 88:9578-9582, 1991; Young, Biol. Reprod. 58:302-322 (1998), cada um deles aqui incorporado a título de referência), o ensaio híbrido duplo reverso (Leanna e Hannink, Nucl. Acids. Res. 24:3341-3347, 1996, que é aqui incorporado a título de referência), o sistema transativador reprimido (Patente U.S. No. 5.885.779, que é aqui incorporado a título de referência), o sistema de mostra de fago (Lowman, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:401-424, 1997, que é aqui incorporado a título de referência), ensaios de enfraquecimento de GST/HIS, operadores mutantes (WO 98/01879, que é aqui incorporado a título de referência), o sistema de recrutamento de proteína (Patente U.S. No. 5.776.689, que é aqui incorporada a título de referência), e similar (vide, por exemplo, Mathis, Clin. Chem. 41:139-147, 1995, Lam, Anticancer Drugs Res. 12:145-167, 1997; Phizicky e outros, Microbiol. Rev. 59:94-123, 1995; cada um deles aqui incorporado a título de referência).

Uma porção de peptídeo funcional de um pró-domínio de GDF pode ser também identificada usando métodos de modelagem molecular. Por exemplo, uma seqüência de aminoácido de um peptídeo de miostatina maduro pode ser posta em um sistema de computador tendo software de modelagem apropriado, e uma representação tridimensional da miostatina ("miostatina virtual") pode ser produzida. Uma seqüência de aminoácido de promiostatina pode ser posta no sistema de computador, de modo que o software de modelagem pode simular porções da seqüência de promiostatina, por exemplo, porções do pró-domínio, e pode identificar aquelas porções de peptídeo do pró-domínio que podem interagir especificamente com a miostatina virtual. Uma base para uma interação específica pode ser predefinida através de modelagem da miostatina virtual e um pró-domínio de promiostatina de comprimento completo, e identificação dos resíduos de aminoácido na miostatina virtual que são "contatados" pelo pró-domínio, uma vez que tal interação é sabida inibir a atividade da miostatina.

Deve ser reconhecido que tais métodos, incluindo ensaios de

dois híbridos e métodos de modelagem molecular, podem ser também usados para identificar outras moléculas que interagem especificamente compreendidas na presente invenção. Desse modo, métodos tal como o ensaio híbrido duplo podem ser usados para identificar um receptor de GDF tal como um receptor de miostatina usando, por exemplo, um peptídeo de miostatina ou uma porção de peptídeo dele que especificamente interage com um receptor Act RIIA ou Act RIIB como um componente de ligação do ensaio, e identificação de um receptor de GDF, que especificamente interage com o peptídeo de miostatina. Similarmente, métodos de modelagem molecular 5 podem ser usados para identificar um agente que interage especificamente com um peptídeo de GDF maduro tal como uma miostatina madura, ou com um receptor de GDF e, desse modo, pode ser útil como um agonista ou um antagonista de transdução de sinal mediada pelo GDF ou pelo receptor de GDF. Tal agente pode ser, por exemplo, uma porção de peptídeo funcional 10 de um pró-domínio de miostatina ou pró-domínio de GDF-11, ou um agente químico que imita a ação do pró-domínio de GDF.

15

Sistemas de modelagem úteis para os propósitos descritos aqui podem ser baseados em informação estrutural obtida, por exemplo, através de análise cristalográfica ou análise de ressonância magnética nuclear, ou 20 em informação de seqüência primária (vide, por exemplo, Dunbrack e outros, "Meeting Review: the Second meeting on the Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction (CASP2) (Asilomar, Califórnia, Dezembro 13-16, 1996). Fold Des. 2 (2):R27-42 (1997); Fischer e Eisenberg, Protein Sci. 5:947-55, 1996; (vide, também, Patente U.S. No. 5.436.850); Havel, 25 Prog. Biophys. Mol. Biol. 56:43-78, 1991; Litchtarge e outros, J. Mol. Biol. 274:325-37, 1997; Matsumoto e outros, J. Biol. Chem. 270:19524-31, 1995; Sali e outros, J. Biol. Chem. 268:9023034, 1993; Sali, Molec. Med. Today 1:270-7, 1995a; Sali, Curr. Opin. Biotechnol. 6:437-51, 1995b; Sali e outros, Proteins 23:318-26; 1995c; Sali, Nature Struct. Biol. 5:1029-1032, 1998; Patente U.S. No. 5.933.819; Patente U.S. No. 5.265.030, cada um aqui incorporado a título de referência).

30

Os coordenados de estrutura de cristal de um polipeptídeo de

promiostatina ou de um receptor de GDF podem ser usados para formar compostos que se ligam à proteína e alteram as suas propriedades físicas ou fisiológicas de várias maneiras. Os coordenados de estrutura da proteína podem ser também usados no computador para analisar dados de molécula

5 pequena quanto a agentes que se ligam a polipeptídeo para desenvolver agentes de modulação ou ligação, que possam agir como agonistas ou antagonistas de transdução de sinal de GDF. Tais agentes podem ser identificados através de dados cinéticos de ajuste no computador usando equações padrão (vide, por exemplo, Segel, "Enzyme Kinetics" (J. Wiley & Sons, 10 1975), que é aqui incorporado a título de referência).

Métodos de uso de dados de estrutura de cristal para produzir inibidores ou agentes de ligação são conhecidos na técnica. Por exemplo, coordenados de receptor de GDF podem ser superpostos sobre vários coordenados disponíveis de receptores similares, incluindo receptores tendo um 15 inibidor de ligação, para prover uma aproximação do caminho que o inibidor interage com o receptor. Programas de computador empregados na prática de produção de droga racional podem ser também usados para identificar compostos que reproduzem características de interação similares àquelas encontradas, por exemplo, entre um pró-domínio de miostatina madura e de 20 miostatina co-cristalizada. Conhecimento detalhado da natureza das interações específicas permite a modificação de compostos para alterar ou melhorar a solubilidade, farmacocinética, e similar, sem afetar a atividade de ligação.

Programas de computador para realizar as atividades necessárias para se produzir agentes usando informação de estrutura de cristal são 25 bem conhecidos. Exemplos de tais programas incluem Catalyst Databases® - um programa de recuperação de informação que acessa dados químicos tal como o BioByte Master File, Derwent WDI e ACD; Catalyst/HYPO® - gera modelos de compostos e hipóteses para explicar variações de atividade com a estrutura de drogas candidatas; Ludi® - ajusta as moléculas no sítio ativo 30 de uma proteína identificando e combinando grupos polares e hidrofóbicos complementares; e Leapfrog® - "cria" novos ligantes usando um algoritmo

genético com parâmetros sob o controle do usuário.

Várias máquinas de propósito geral podem ser usadas com tais programas, ou pode ser mais conveniente construir aparelhos mais especializados para realizar as operações. Em geral, a modalidade é implementada

5 em um ou mais programas de computador executando sistemas programáveis cada um compreendendo pelo menos um processador, pelo menos um sistema de armazenamento de dados (incluindo memória volátil e não-volátil e/ou elementos de armazenamento), pelo menos um dispositivo de entrada e pelo menos um dispositivo de saída. O programa é executado no processador para realizar as funções descritas aqui.

10

Cada tal programa pode ser implementado em qualquer linguagem de computador desejada, incluindo, por exemplo, máquina, montagem, procedimento de alto nível, ou linguagens de programação orientadas para o objeto, para se comunicar com o sistema do computador. Em qualquer caso,

15 a linguagem pode ser uma linguagem compilada ou interpretada. O programa de computador será tipicamente armazenado em um meio ou dispositivo de armazenamento, por exemplo, um ROM, CD ROM, meio magnético ou óptico, ou similar, que possa ser lido por um computador geral ou de propósito especial, para configurar e operar o computador quando o meio ou dispositivo de armazenamento é lido pelo computador para realizar os procedimentos descritos aqui. O sistema pode ser também considerado ser implementado como um meio de armazenamento que possa ser lido por computador, configurado com um programa de computador, onde o meio de armazenamento desse modo configurado faz com que o computador opere de

20

25 uma maneira específica e predefinida para realizar as funções descritas aqui.

Modalidades da invenção incluem sistemas, por exemplo, sistemas à base de Internet, particularmente sistemas de computador que armazenam e manipulam informação coordenada obtida através de análise cristalográfica ou RMN, ou informação de seqüência de aminoácido ou nucleotídeo, conforme descrito aqui. Conforme aqui usado, o termo "sistema de computador" refere-se aos componentes hardware, componentes software e

30

componentes de armazenamento de dados usados para analisar coordenadas ou seqüências conforme descrito aqui. O sistema de computador tipicamente inclui um processador para processamento, acesso e manipulação dos dados de seqüência. O processador pode ser qualquer tipo bem conhecido de unidade de processamento central, por exemplo, um processador Pentium II ou Pentium III da Intel Corporation, ou um processador similar da Sun, Motorola, Compaq, Advanced MicroDevices ou International Business Machines.

Tipicamente, o sistema de computador é um sistema de propósito geral que compreende o processador e um ou mais componentes de armazenamento de dados internos para armazenamento de dados, e um ou mais dispositivos de recuperação de dados para recuperar os dados armazenados nos componentes de armazenamento de dado. Um versão na técnica pode compreender imediatamente que qualquer um dos sistemas de computador atualmente disponíveis é adequado.

Em uma modalidade, o sistema de computador inclui um processador conectado a um barramento, que está conectado a uma memória principal, de preferência implementada como RAM, e um ou mais dispositivos de armazenamento de dado internos tal como um disco rígido ou outro meio que possa ser lido pelo computador tendo dados registrados nele. Em algumas modalidades, o sistema de computador inclui ainda um ou mais dispositivos de recuperação de dados para leitura dos dados armazenados nos dispositivos de armazenamento de dados internos.

O dispositivo de recuperação de dados pode representar, por exemplo, um drive de disquete, um drive de CD, um drive de fita magnética, ou um modem capaz de conexão a um sistema de armazenamento de dados remoto (por exemplo, através da Internet). Em algumas modalidades, o dispositivo de armazenamento de dados interno é um meio que pode ser lido pelo computador removível tal como um disquete, um CD, uma fita magnética, etc. contendo lógica de controle e/ou dados registrados nele. O sistema de computador pode vantajosamente incluir ou ser programado pelo software apropriado para leitura da lógica de controle e/ou dos dados a partir do

componente de armazenamento de dados uma vez inserido no dispositivo de recuperação de dados.

O sistema de computador geralmente inclui um mostrador, que é usado para mostrar o resultado a um usuário de computador. Deve ser notado que o sistema de computador pode estar ligado a outros sistemas de computador em uma rede ou em uma rede de área ampla para prover acesso centralizado ao sistema de computador.

Onde for desejado identificar uma entidade química que interage especificamente com miostatina ou com um receptor de GDF, qualquer um dos vários métodos para avaliar entidades químicas ou fragmentos quanto à sua habilidade em interagir especificamente com a molécula pode ser usado. Este processo pode começar com inspeção visual, por exemplo, da miostatina e um pró-domínio de miostatina na tela do computador. Porções de peptídeo selecionadas do pró-domínio, ou entidades química que podem agir como mímicas, então podem ser posicionadas em uma variedade de orientações, ou cortadas, dentro de um sítio de ligação individual da miostatina. O corte pode ser realizado usando software tal como Quanta e Sybyl, seguido por minimização de energia e dinâmica molecular com campos de força mecânicos moleculares padrão, tal como CHARMM e AMBER.

Programas de computador especializados podem ser particularmente úteis para seleção de porções de peptídeo de um pró-domínio, ou entidades químicas úteis, por exemplo, como um agonista ou antagonista de receptor de GDF. Tais programas incluem, por exemplo, GRID (Goodford, J. Med. Chem. 28:849-857, 1985; disponível da Oxford University, Oxford, UK); MCSS (Miranker and Karplus, Proteins: Structure, Function and Genetics, 11:29-34, 1991, disponível da Molecular Simulations, Burlington, MA); AUTODOCK (Goodsell e Olsen, Proteins Structure, Function and Genetics 8:195-202, 1990, disponível do Scripps Research Institute, La Jolla, CA); DOCK (Kuntz e outros, J. Mol. Biol. 161:269-288, 1982, disponível da University of California, São Francisco, CA), cada um deles aqui incorporado a título de referência.

Peptídeos ou agentes adequados que foram selecionados po-

dem ser montados em um composto ou agente de ligação único. A montagem pode ser realizada através de inspeção visual da relação dos fragmentos um com o outro na imagem tridimensional mostrada em uma tela de computador, seguido pela construção manual do modelo usando software tal como Quanta ou Sybyl. Programas úteis para auxiliar uma pessoa de habilidade na técnica a conectar as entidades química individuais ou fragmentos incluem, por exemplo, CAVEAT (Barillet e outros, Special Pub. Royal Chem. Soc., 78:182-196, 1989, disponível da University of California, Berkeley, CA); Sistemas de dados de 3D tal como MACCS-3D (MDL Information Systems, San Leandro, CA; para revisão, vide Martin, J. Med. Chem. 35:2145-2154, 1992); HOOK (disponível da Molecular Simulations, Burlington, Mass.) cada um deles aqui incorporado a título de referência.

Em adição ao método de construção ou identificação de tais agentes interagindo especificamente de uma maneira em etapas, um fragmento ou entidade química de cada vez conforme descrito acima, os agentes podem ser projetados como um todo ou *de novo* usando ou um sítio ativo vazio ou, opcionalmente, incluindo algumas porões de um agente conhecido que especificamente interage, por exemplo, um pró-domínio de miostatina de comprimento completo, com miostatina. Tais métodos incluem, por exemplo, LUDI (Bohm, J. Comp. Aid. Molec. Design 6:61-78, 1992, disponível da Biosym Technologies, São Diego, CA); LEGEND (Nishibata and Itai, Tetrahedron 47:8985, 1991, disponível da Molecular Simulations, Burlington, MA); LeapFrog (disponível da Tipos Associates, St. Louis, MO) e aqueles descritos por Cohen e outros (J. Med. Chem. 33:883-894, 1990) e por Navia e Murcko, Curr. Opin. Struct. Biol. 2:202-210, 1992, cada um aqui incorporado a título de referência.

Software de computador específico está disponível na técnica para avaliar energia de deformação do composto e interação eletrostática. Exemplos de programas projetados pra tais usos incluem Gaussian 92, revisão C (Frisch, Gaussian, Inc., Pittsburg, PA, 1992); AMBER, versão 4,0 (Kollman, University of California em São Francisco, 1994); QUANTA/CHARMM (Molecular Simulations, Inc., Burlington, MA, 1994); e Insight II/Discover (Bi-

osysm Technologies Inc., São Diego, CA, 1994). Esses programas podem ser implementados usando, por exemplo, uma estação de trabalho Silicon Graphic, IRIS 4D/35 ou uma estação de trabalho IBM RISC/6000 modelo 550. Outros sistemas de pacotes de hardware e software serão conhecidos 5 daqueles versados na técnica cujas velocidade e capacidade são continuamente modificadas.

Um processo de modelagem molecular para identificação de um agente que interaja especificamente com uma molécula de interesse, por exemplo, com um peptídeo de GDF maduro, ou com um receptor de GDF 10 pode ser realizado conforme aqui descrito. Em uma primeira etapa, uma representação virtual de uma molécula alvo, por exemplo, miostatina, é realizada. Desse modo, em uma modalidade, a presente invenção provê uma representação virtual de uma molécula alvo, onde a molécula alvo é selecionada de um polipeptídeo de pró-GDF, por exemplo, promiostatina; uma porção 15 de peptídeo de um polipeptídeo de pró-GDF; um receptor de GDF; e um domínio relevante de um receptor de GDF; por cento, um domínio de ligação de GDF. A representação visual da molécula alvo pode ser mostrada ou pode ser mantida em uma memória de sistema de computador. O processo 20 começa em um estado de partida, compreendendo a molécula alvo virtual, então move para um estado onde uma base de dados contendo uma ou mais moléculas de teste virtuais foi armazenado em uma memória no sistema de computador. Conforme acima discutido, a memória pode ser qualquer tipo de memória, incluindo RAM ou um dispositivo de armazenamento interno.

O processo então move para um estado onde a habilidade de 25 uma primeira molécula de teste virtual em especificamente interagir com a molécula alvo virtual é determinada, onde a base de dados contendo a molécula de teste virtual, que pode ser uma de uma população de moléculas de teste, são abertos para análise da interação da molécula alvo virtual e molécula de teste virtual, e a análise é feita. Uma determinação de uma interação 30 específica pode ser feita com base nos cálculos realizados pelo software mantido no sistema de computador, ou através de comparação com uma interação específica predeterminada, que pode ser armazenada em uma

memória no sistema de computador e acessada conforme apropriado.

O processo então se move para um estado onde uma interação específica é detectada, a molécula de teste virtual é mostrada, ou é armazenada em uma segunda base de dados no computador. Se apropriado, o processo é repetido para a molécula alvo virtual e uma segunda molécula de teste virtual, uma terceira molécula de teste virtual, e assim por diante, conforme desejado.

Se uma determinação for feita de que uma molécula de teste virtual interage especificamente com a molécula alvo virtual, a molécula de teste virtual identificada é movida da base de dados e pode ser mostrada ao usuário. Este estado notifica o usuário de que a molécula com o nome ou estrutura mostrado interage especificamente com a molécula alvo dentro das restrições que elas entraram. Logo que o nome da molécula de teste identificada é mostrado ao usuário, o processo move para um estado decisivo, onde uma determinação é feita de se mais moléculas de teste virtual existem na base de dados ou se devem ser examinadas. Se não existirem mais moléculas na base de dados, então o processo termina em um estado final. No entanto, se mais moléculas de teste existirem na base de dados, então o processo move para um estado, onde um indicador é movido para a molécula de teste seguinte na base de dados de modo que ela pode ser examinada quanto à atividade de ligação específica. Dessa maneira, a nova molécula é examinada quanto à sua habilidade em interagir especificamente com a molécula alvo virtual.

Tais métodos conforme acima descrito podem ser usados em vários aspectos compreendidos na invenção reivindicada. Desse modo, os métodos podem ser usados para identificar uma porção de peptídeo de um pró-domínio de promiostatina que pode interagir especificamente com miostatina e reduzir ou inibir a habilidade da miostatina em interagir com seu receptor ou de outra maneira afetar a habilidade da miostatina em realizar transdução de sinal. Similarmente, os métodos podem ser usados para identificar pequenas moléculas orgânicas que imitam a ação de um pró-domínio de GDF, desse modo reduzindo ou inibindo a transdução de sinal de miosta-

tina ou de GDF-11. Os métodos podem ser também usados para identificar agentes que interagem especificamente com um receptor de GDF, por exemplo, um Act RIIA, Act RIIB ou outro receptor de GDF, tais agentes sendo úteis como agonistas ou antagonistas de receptor de GDF, que podem modular transdução de sinal de GDF em uma célula. Em adição, os métodos provêem um meio de identificar polipeptídeos de pró-GDF ou receptores de GDF anteriormente desconhecidos, por exemplo, através da identificação de características estruturais conservadas dos polipeptídeos em particular.

Similar a outros membros da superfamília de TGF-9, peptídeos de GDF ativos são expressos como polipeptídeos precursores, que são clivados para uma forma biologicamente ativa, madura. Desse modo, em ainda uma outra modalidade, o fragmento proteolítico de um polipeptídeo de pró-GDF é um peptídeo de GDF maduro, ou uma porção de peptídeo funcional de um peptídeo de GDF maduro, onde, conforme acima discutido, a porção de peptídeo funcional pode ter a atividade de um agonista ou antagonista de GDF. O fragmento proteolítico pode ser um peptídeo de miostatina C-terminal maduro, que inclui por volta dos resíduos de aminoácido 268 a 374 de um polipeptídeo de promiostatina (vide Figura 1; vide também Figura 2), ou um peptídeo de GDF-11 C-terminal maduro, que inclui por volta dos resíduos de aminoácido 299 a 407 de um polipeptídeo de pró-GDF-11. Peptídeos de miostatina maduros de comprimento completo são exemplificados por resíduos de aminoácido por volta de 268 a 375, conforme descrito na SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 6; por resíduos de aminoácido por volta de 267 a 374 conforme descrito na SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 e SEQ ID NO: 20, e por resíduos de aminoácido por volta de 49 a 157 da SEQ ID NO: 27 e resíduos de aminoácido por volta de 28 a 136 da SEQ ID NO: 29. Um peptídeo de GDF-11 maduro de comprimento completo é exemplificado por resíduos de aminoácido por volta de 299 a 407 da SEQ ID NO: 25. Porções de peptídeo funcionais dos peptídeos de GDF maduros são exemplificadas por porções de peptídeo de miostatina maduros ou de GDF-11 maduros que têm uma atividade agonista ou antagonista com relação à atividade de um

peptídeo de GDF maduro. De preferência, a atividade do peptídeo de GDF maduro é uma habilidade em interagir especificamente com seu receptor.

Conforme aqui descrito, um peptídeo de miostatina maduro (referido aqui geralmente como "miostatina") pode induzir a atividade de transdução de sinal de miostatina interagindo especificamente com um receptor de miostatina expresso na superfície de uma célula (vide Exemplo 7). Desse modo, uma porção de peptídeo funcional de miostatina pode ser obtida examinando as porções de peptídeo de um peptídeo de miostatina maduro usando um método conforme aqui descrito (Exemplo 7) ou de outro modo sabido na técnica, e identificando porções de peptídeo funcionais de miostatina que especificamente interagem com um receptor de miostatina, por exemplo, um receptor IIA do tipo activina (Act RIIA) ou receptor Act RIIB expresso em uma célula.

Um pró-domínio de miostatina pode reduzir ou inibir a atividade de transdução de sinal de miostatina. Em uma modalidade, o pró-domínio de miostatina pode interagir especificamente com miostatina, desse modo reduzindo ou inibindo a habilidade do peptídeo de miostatina em interagir especificamente com o seu receptor. Conforme aqui descrito, uma promiostatina precursora também não tem a habilidade em interagir especificamente com um receptor de miostatina, e, desse modo, mutações na promiostatina que reduzem ou inibem a habilidade da promiostatina em ser clivada em miostatina madura provê um meio de reduzir ou inibir a transdução de sinal de miostatina. Desse modo, em uma outra modalidade, a presente invenção provê um polipeptídeo de pró-GDF mutante, o qual contém uma ou mais mutações de aminoácido que rompem a clivagem proteolítica do pró-GDF mutante para um peptídeo de GDF maduro ativo.

Um polipeptídeo de pró-GDF mutante da invenção pode ter uma mutação que afeta a clivagem em um sítio de clivagem proteolítico tal como o sítio de reconhecimento de clivagem proteolítico de consenso Arg-Xaa-Xaa-Arg (SEQ ID NO: 21), que está presente nos polipeptídeos de pró-GDF. Desse modo, a mutação pode ser uma mutação de um resíduo de Arg da SEQ ID NO: 21, de modo que uma promiostatina mutante, por exemplo, não

pode ser clivada em um pró-domínio de miostatina e um peptídeo de miostatina maduro. No entanto, a mutação pode ser também em um sítio que não o sítio de clivagem proteolítico, e pode alterar a habilidade da protease em se ligar ao polipeptídeo de pró-GDF de modo a afetar a proteólise no sítio de clivagem. Um polipeptídeo de pró-GDF da invenção, por exemplo, uma promiostatina mutante ou um pró-GDF-11 mutante pode ter uma atividade negativa dominante com relação à miostatina ou GDF-11, e desse modo, pode ser útil para redução ou inibição da transdução de sinal de miostatina ou GDF-11 em uma célula.

A presente invenção também provê um polinucleotídeo substancialmente purificado que codifica uma porção de peptídeo de um polipeptídeo de promiostatina ou uma promiostatina mutante, ou uma porção de peptídeo de um polipeptídeo de pró-GDF-11 ou pró-GDF-11 mutante, conforme descrito acima. Conforme discutido em mais detalhe abaixo, a invenção também provê polinucleotídeos úteis como agentes para modulação do efeito da miostatina sobre uma célula, a provê ainda um polinucleotídeo codificando um receptor de GDF, ou sua porção de peptídeo funcional. Exemplos de tais polinucleotídeos são providos na descrição que segue. Desse modo, deve ser reconhecido que a descrição que segue é relevante para as várias modalidades da invenção conforme aqui mostrado.

O termo "polinucleotídeo" é usado amplamente aqui para significar uma seqüência de dois ou mais desoxirribonucleotídeos ou ribonucleotídeos que estão ligados juntos por uma ligação fosfodiéster. Desse modo, o termo "polinucleotídeo" inclui RNA e DNA, que pode ser um gene ou uma porção dele, um cDNA, uma seqüência de ácido polidesoxirribonucléico sintético, ou similar, e pode ser de filamento simples ou filamento duplo, bem como um híbrido de DNA/RNA. Ainda, o termo "polinucleotídeo" conforme aqui usado inclui moléculas de ácido nucléico de ocorrência natural, que podem ser isoladas de uma célula, bem como moléculas sintéticas, que podem ser preparadas, por exemplo, através de métodos de síntese química ou através de métodos enzimáticos tal como através de reação de cadeia de polimerase (PCR). Em várias modalidades, um polinucleotídeo da invenção

pode conter análogos de nucleosídeo ou nucleotídeo, ou uma ligação de estrutura principal que não uma ligação fosfodiéster (vide acima).

Em geral, os nucleotídeos compreendendo um polinucleotídeo são desoxirribonucleotídeos de ocorrência natural, tal como adenina, citosina, guanina ou timina, ligados a 2'-desoxirribose, ou ribonucleotídeos tal como adenina, citosina, guanina ou uracila ligada à ribose. No entanto, um polinucleotídeo pode também conter análogos de nucleotídeo, incluindo nucleotídeos sintéticos de ocorrência não-natural ou nucleotídeos de ocorrência natural modificados. Tais análogos de nucleotídeo são bem conhecidos na técnica e comercialmente disponíveis, como são os polinucleotídeos contendo tais análogos e nucleotídeo (Lin e outros, *Nucl. Acids. Res.* 22:5220-5234 (1994); Jellinek e outros, *Biochemistry* 34:11363-11372 (1995); Paganis e outros, *Nature Biotechnol.* 15:68-73 (1997), cada um deles aqui incorporado a título de referência).

A ligação covalente ligando os nucleotídeos de um polinucleotídeo geralmente é uma ligação fosfodiéster. No entanto, a ligação covalente também pode ser qualquer uma de várias outras ligações, incluindo uma ligação tiodiéster, uma ligação fosforotioato, uma ligação do tipo peptídeo ou qualquer outra ligação conhecida daqueles versados na técnica como útil para ligar nucleotídeos para produzir polinucleotídeos sintéticos (vide, por exemplo, Tam e outros, *Nucl. Acids. Res.* 22:977-986 (1994); Ecker e Crooke, *BioTechnology* 13:351360 (1995), cada um deles aqui incorporado a título de referência). A incorporação de análogos de nucleotídeo de ocorrência não-natural ou ligações ligando os nucleotídeos ou análogos pode ser particularmente útil onde o polinucleotídeo tiver que ser exposto a um ambiente que pode conter uma atividade nucleolítica, incluindo, por exemplo, um meio de cultura de tecido ou quando da administração a um indivíduo vivo, uma vez que o polinucleotídeo modificado pode ser menos suscetível à degradação.

Um polinucleotídeo compreendendo nucleotídeos de ocorrência natural e ligações fosfodiéster pode ser quimicamente sintetizado ou pode ser produzido usando métodos de DNA recombinante, usando um polinucle-

otídeo apropriado como um modelo. Em comparação, um polinucleotídeo compreendendo análogos de nucleotídeo ou ligações covalentes outras que não as ligações fosfodiéster geralmente será quimicamente sintetizado, embora uma enzima tal como T7 polimerase possa incorporar certos tipos de 5 análogos de nucleotídeo a um polinucleotídeo e, desse modo, pode ser usada para produzir tal polinucleotídeo recombinantemente a partir de um molde apropriado (Jellinek e outros, *supra*, 1995).

Onde um polinucleotídeo codifica um peptídeo, por exemplo, uma porção de peptídeo de promiostatina ou um agente de peptídeo, a sequência de codificação geralmente está contida em um vetor e está operativamente ligada a elementos de regulagem apropriados, incluindo, se desejado, um promotor ou realçador específico de tecido. O peptídeo codificado pode ainda ser operativamente ligado, por exemplo, à lacuna de peptídeo tal como uma lacuna His-6 ou similar, que pode facilitar a identificação de expressão do agente na célula alvo. Um peptídeo de lacuna de fosfoistidina tal como His-6 pode ser detectado usando um cátion divalente tal como íon de níquel, íon de cobalto ou similar. Lacunas de peptídeo adicionais incluem, por exemplo, um epítopo FLAG, que pode ser detectado usando um anticorpo anti-FLAG (vide, por exemplo, Hopp e outros, *BioTechnology* 6:1204 10 (1988); Patente U.S. No. 5.011.912, cada um deles aqui incorporado a título de referência); um epítopo c-myc, que pode ser detectado usando um anticorpo específico para o epítopo; biotina, que pode ser detectada usando estreptavidina ou avidina; e glutationa S-transferase, que pode ser detectada usando glutationa. Tais lacunas podem prover a vantagem adicional de que 15 elas podem facilitar o isolamento do peptídeo ou agente de peptídeo operativamente ligado, por exemplo, onde for desejado se obter um peptídeo substancialmente purificado correspondendo a um fragmento proteolítico de um polipeptídeo de miostatina.

Conforme aqui usado, o termo "operativamente ligado" ou "operativamente associado" significa que duas ou mais moléculas são posicionadas em relação uma com a outra de modo que elas ajam como uma unidade 20 única e realizem uma função atribuível a uma ou mais moléculas ou uma

combinação delas. Por exemplo, uma seqüência de polinucleotídeo codificando um peptídeo da invenção pode ser operativamente ligada a um elemento de regulagem, caso onde o elemento de regulagem confere seu efeito de regulagem sobre o polinucleotídeo similarmente ao modo que o elemento de regulagem afetaria uma seqüência de polinucleotídeo com a qual ele está normalmente associado em uma célula. Uma primeira seqüência de codificação de polinucleotídeo pode ser também operativamente ligada a uma segunda (ou mais) seqüência de codificação de modo que um polipeptídeo quimérico pode ser expresso a partir das seqüências de codificação operativamente ligadas. O polipeptídeo quimérico pode ser um polipeptídeo de fusão, onde os dois (ou mais) peptídeos codificados são traduzidos em um polipeptídeo único, isto é, são covalentemente ligados através de uma ligação de peptídeo; ou podem ser traduzidos como dois peptídeos diferentes que, quando da tradução podem operativamente se associar um ao outro para formar um complexo estável.

Um polipeptídeo quimérico geralmente demonstra alguma ou todas as características de seus componentes de peptídeo. Desse modo, um polipeptídeo quimérico pode ser particularmente útil na realização dos métodos da invenção, conforme aqui descrito. Por exemplo, em uma modalidade, o método da invenção pode modular transdução de sinal de miostatina em uma célula. Desse modo, onde um componente de peptídeo de um polipeptídeo quimérico codifica um domínio de localização de compartimento de célula e um segundo componente de peptídeo codifica um polipeptídeo Smad negativo dominante, o polipeptídeo quimérico funcional pode ser deslocado para o compartimento de célula designado pelo domínio de localização de compartimento de célula e pode ter a atividade negativa dominante do polipeptídeo Smad, desse modo modulando a transdução de sinal de miostatina na célula.

Os domínios de formação de compartimento da célula são bem conhecidos e incluem, por exemplo, um domínio de localização de membrana de plasma, um sinal de localização nuclear, um sinal de localização de membrana mitocondrial e sinal de localização de retículo endoplasmático, ou

similar (vide, por exemplo, Hancock e outros, EMBO J., 10:4033-4039, 1991; Buss e outros, Mol. Cell. Biol. 8:3960-3963, 1988; Patente U.S. No. 5.776.689, cada um deles aqui incorporado a título de referência). Tal domínio pode ser útil para marcar um agente para um compartimento em particular na célula, 5 ou para marcar o agente para secreção a partir de uma célula. Por exemplo, o domínio de cinase de um receptor de miostatina tal como Act RIIB geralmente está associado à superfície interna da membrana do plasma. Desse modo, um polipeptídeo quimérico compreendendo um domínio de cinase de receptor de miostatina negativo dominante, por exemplo, um receptor Act 10 RIIB negativo dominante, que não tem atividade cinase, pode compreender ainda um domínio de localização de membrana de plasma, desse modo localizando o domínio de cinase de Act RIIB negativo dominante para a membrana celular interna.

Conforme aqui descrito, um peptídeo de sinal de pró-GDF tem 15 atividade de localização celular. Conforme aqui usado, o termo "atividade de localização celular" refere-se à habilidade de um peptídeo de sinal em direcionar a transferência de um peptídeo operativamente ligado a ele para um ou mais compartimentos intracelulares específicos ou direcionar a secreção da molécula da célula. Desse modo, um peptídeo de sinal de pró-GDF pode 20 ser particularmente útil para direcionamento da transferência de um peptídeo ou outro agente operativamente ligado ao peptídeo de sinal para os mesmos compartimentos intracelulares que os GDF naturalmente expressos tendo substancialmente o mesmo peptídeo de sinal. Ainda, o peptídeo de sinal, por exemplo, um peptídeo de sinal de promiostatina compreendendo por volta 25 dos primeiros 15 a 30 aminoácidos de promiostatina, pode direcionar a secreção de um agente operavelmente ligado a partir da célula através do mesmo curso que o pró-DGF de ocorrência natural compreendendo o peptídeo de sinal. Desse modo, agentes particularmente úteis para a realização 30 de um método da invenção incluem um pró-domínio de GDF ou sua porção de peptídeo funcional que está operativamente ligada a um peptídeo de sinal de GDF, de preferência um peptídeo de sinal de promiostatina ou pró-GDF- 11.

Um polinucleotídeo da invenção, incluindo um agente de polinucleotídeo útil na realização de um método da invenção, pode ser contatado diretamente com uma célula alvo. Por exemplo, oligonucleotídeos úteis como moléculas de anti-sentido, ribozimas, ou agentes de triplexação podem ser diretamente contatados com uma célula alvo, com o que entram na célula e realizam a sua função. Um agente polinucleotídeo pode também interagir especificamente com um polipeptídeo, por exemplo, um receptor de miostatina (ou miostatina), desse modo alterando a habilidade da miostatina em interagir especificamente com o receptor. Tais polinucleotídeos, bem como métodos de fabricação e identificação de tais polinucleotídeos, são descritos aqui ou de outro modo conhecido na técnica (vide, por exemplo, O. Connell e outros, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 93:5883-5887, 1996; Tuerk e Gold, Science 249:505-510, 1990; Gold e outros, Ann. Rev. Biochem. 64:763-797, 1995; cada um deles aqui incorporado a título de referência).

Um polinucleotídeo da invenção, que pode codificar uma porção de peptídeo de um polipeptídeo de pró-GDF tal como promiostatina, ou pode codificar um polipeptídeo de promiostatina mutante, ou pode codificar um receptor de GDF ou sua porção de peptídeo funcional, ou pode ser um agente de nucleotídeo útil na realização de um método da invenção, pode ser contatado em um vetor, que pode facilitar a manipulação do polinucleotídeo, incluindo introdução do polinucleotídeo em uma célula alvo. O vetor pode ser um vetor de clonagem, que é útil para manutenção do polinucleotídeo, ou pode ser um vetor de expressão, que contém, em adição ao polinucleotídeo, elementos de regulagem úteis para expressão do polinucleotídeo e, onde o polinucleotídeo codifica um peptídeo, para expressão do peptídeo codificado em uma célula em particular. Um vetor de expressão pode conter os elementos de expressão necessários para se conseguir, por exemplo, transcrição prolongada do polinucleotídeo de codificação, ou os elementos de regulagem podem ser operativamente ligados ao polinucleotídeo antes dele ser clonado no vetor.

Um vetor de expressão (ou o polinucleotídeo) geralmente contém ou codifica uma seqüência de promotor, que pode prover expressão es-

pecífica de estágio de constituição ou, se desejado, induzível ou de tecido específica ou de desenvolvimento do polinucleotídeo de codificação, uma seqüência de reconhecimento de poli-A, e um sítio de reconhecimento de ribossoma ou sítio de entrada de ribossoma interno, ou outros elementos de regulagem tal como um realçador, que pode ser específico de tecido. O vetor pode também conter elementos requeridos para replicação em um sistema de hospedeiro procariótico ou eucariótico ou ambos, conforme desejado. Tais vetores, que incluem vetor de plasmídeo e vetores virais tal como vetores de bacteriófago, baculovírus, retrovírus, lentivírus, adenovírus, vírus vacínia, vírus "semliki Forest" e vírus adeno-associados, são bem conhecidos e podem ser comprados de uma fonte comercial (Promega, Madison WI; Stratagene, La Jolla, CA; GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD) ou podem ser construídos por uma pessoa versada na técnica (vide, por exemplo, Meth. Enzymol. Vol. 185, Goeddel, ed. (Academic Press, Inc., 1990); Jolly, Canc. Gene Ther. 15:1:51-64, 1994; Flotte, J. Bioenerg. Biomemb. 25:37-42, 1993; Kirshenbaum e outros, J. Clin. Invest. 92:381-387, 1993; cada um aqui incorporado a título de referência em sua totalidade).

Um promotor induzível de tetraciclina (tet) pode ser particularmente útil para dirigir a expressão de um polinucleotídeo da invenção, por exemplo, um polinucleotídeo codificando uma forma negativa dominante de miostatina, onde o sítio de processamento proteolítico foi mutado, ou codificando um pró-domínio de miostatina, que pode formar um complexo com um peptídeo de miostatina maduro, ou codificando uma forma negativa dominante de um receptor de GDF. Quando da administração de tetraciclina, ou 20 um análogo de tetraciclina, a um indivíduo contendo um polinucleotídeo operativamente ligado a um promotor induzível tet, expressão do peptídeo codificado é induzida, com o que o peptídeo pode realizar a sua atividade, por exemplo, com o que um agente de peptídeo pode reduzir ou inibir a transdução de sinal de miostatina. Tal método pode ser usado, por exemplo, para 25 induzir hipertrofia muscular em um organismo adulto.

O polinucleotídeo pode ser operativamente ligado ao elemento de regulagem específica de tecido, por exemplo, um elemento de regulagem

específico de célula muscular, de modo que a expressão de um peptídeo codificado é restrita às células musculares em um indivíduo, ou a células musculares em uma população mista de células em cultura, por exemplo, uma cultura de órgão. Elementos de regulagem específica de célula muscular incluindo, por exemplo, o promotor de cinase de creatina muscular (Sternberg e outros, Mol. Cell. Biol. 8:2896-2909, 1988, que é incorporado aqui a título de referência) e o realçador/promotor de cadeia leve de miosina (Donoghue e outros, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 88:5847-5851, 1991, que é aqui incorporado a título de referência em sua totalidade) são bem conhecidos na técnica.

Vetores de expressão viral podem ser particularmente úteis para introdução de um polinucleotídeo em uma célula, particularmente uma célula em um indivíduo. Vetores virais provêm a vantagem de que eles podem infectar células hospedeiro com eficiência relativamente alta e podem infectar tipos de célula específicos. Por exemplo, um polinucleotídeo codificando um pró-domínio de miostatina ou sua porção de peptídeo funcional pode ser clonado em um vetor de baculovírus, o qual pode então ser usado para infectar uma célula hospedeiro de inseto, desse modo provendo um meio para produzir grandes quantidades de pró-domínio codificado. O vetor viral pode ser também derivado de um vírus que infecta células de um organismo de interesse, por exemplo, células hospedeiro de vertebrado tal como células hospedeiro de mamífero, ave ou peixe. Vetores virais podem ser particularmente úteis para introdução de um polinucleotídeo útil na realização de um método da invenção em uma célula alvo. Vetores virais foram desenvolvidos para uso em sistemas hospedeiro em particular, particularmente sistemas de mamífero e incluem, por exemplo, vetores retrovirais, outros vetores lentivírus tal como aqueles baseados no vírus da imunodeficiência humana (HIV), vetores adenovírus, vetores de vírus adeno-associado, vetores de vírus do herpes, vetores do vírus vaccínia, e similar (vide Miller e Rosman, BioTechniques 7:980-990, 1992; Anderson e outros, Nature 392:25-30 Suppl., 1998; Verma e Somia, Nature 389:239-242, 1997; Wilson, New Engl. J. Med. 334:1185-1187 (1996), cada um deles aqui incorporado a título de referência.

cia).

Quando retrovírus, por exemplo, são usados para transferência de vírus, retrovírus competentes em replicação teoricamente podem ser desenvolver devido à recombinação de vetor retroviral e seqüências de gene viral no tipo de célula de embalagem utilizado para produzir o vetor retroviral. 5 Tipos de célula de embalagem onde a produção de vírus de replicação competente através de recombinação foi reduzida ou eliminada podem ser usados para minimizar a probabilidade de que um retrovírus de replicação competente será produzido. Todos os sobrenadantes do vetor retroviral usados 10 para infectar células são avaliados quanto a vírus de replicação competente através de ensaios padrão tal como ensaios PCR ou transcriptase reversa. Vetores retrovirais permitem a integração de um gene heterólogo em um genoma de célula hospedeiro, o que permite que o gene seja passado para células filhas seguindo a divisão celular.

15 Um polinucleotídeo, que pode estar contido em um vetor, pode ser introduzido em uma célula através de qualquer um de uma variedade de métodos conhecidos na técnica (Sambrook e outros, Molecular Cloning: A laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); Ausubel e outros, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1987, e suplementos durante 1995), cada um deles aqui incorporado a título de referência). Tais métodos incluem, por exemplo, transfecção, 20 lipofecção, microinjeção, eletroforação e, com vetores virais, infecção; e podem incluir o uso de lipossomas, microemulsões ou similar, que pode facilitar a introdução do polinucleotídeo na célula e pode proteger o polinucleotídeo 25 de degradação antes da sua introdução na célula. A seleção de um método em particular vai depender, por exemplo, da célula na qual o polinucleotídeo deve ser introduzido, bem como de se a célula é isolada na cultura, ou está em um tecido ou órgão em cultura ou *in situ*.

30 Introdução de um polinucleotídeo em uma célula através de infecção com um vetor viral é particularmente vantajosa pelo fato de que ela pode eficientemente introduzir a molécula de ácido nucléico em uma célula *ex vivo* ou *in vivo* (vide, por exemplo, Patente U.S. No. 5.399.346, que é aqui

incorporada a título de referência). Além disso, vírus são muito especializados e podem ser selecionados como vetores baseado em uma habilidade em infectar e propagar em um ou alguns tipos de célula específicos. Desse modo, sua especificidade natural pode ser usada para marcar a molécula de 5 ácido nucléico contida no vetor para tipos de célula específicos. Desse modo, um vetor baseado em um HIV pode ser usado para infectar células T, um vetor baseado em um adenovírus pode ser usado, por exemplo, para infectar células epiteliais respiratórias, um vetor baseado em um herpevírus pode ser usado para infectar células neuronais e similar. Outros vetores, tal como ví- 10 rus adeno-associados, podem ter um faixa de célula hospedeiro maior e, desse modo, podem ser usados para infectar vários tipos de célula, embora vetores virais ou não-virais possam ser também modificados com receptores específicos ou ligantes para alterar a especificidade alvo através de casos mediados por receptor.

15 A presente invenção também provê anticorpos que especificamente se ligam a uma porção de peptídeo de um polipeptídeo de promiostatina ou um polipeptídeo de promiostatina mutante. Anticorpos particularmente úteis da invenção incluem anticorpos que se ligam especificamente a um pró-domínio de miostatina, ou uma porção de peptídeo funcional dele, e anti- 20 anticorpos que se ligam a um polipeptídeo de promiostatina e reduzem ou inibem a clivagem proteolítica da promiostatina para um peptídeo de miostatina maduro. Em adição, um anticorpo da invenção pode ser um anticorpo que especificamente se liga a um receptor de GDF, ou porção de peptídeo funcional dele, conforme descrito abaixo. Métodos de preparação e isolamento 25 de um anticorpo da invenção são descritos em mais detalhes abaixo, cujo relatório é aqui incorporado a título de referência.

A miostatina é essencial para regulagem apropriada de massa de muscular esqueletal. Comparados com camundongos do tipo selvagem, [camundongos mutantes para miostatina (knock-out mice), que não têm miostatina], têm duas a três vezes a quantidade de músculo devido a uma combinação de hiperplasia e hipertrofia. Conforme aqui descrito, camundongos mutantes para miostatina (knock-out mice) também têm uma redução

drástica no acúmulo de gordura devido, em parte, a um estado anabólico maior de tecido de músculo esquelético pelo corpo. Por outro lado, superexpressão de miostatina em camundongos nus induziu uma síndrome de enfraquecimento que lembra um estado de caquexia observado em pacientes 5 humanos sofrendo de doenças crônicas tal como câncer ou AIDS. Conforme ainda descrito aqui, a atividade da miostatina pode ser mediada através de uma transdução de sinal tendo as características do curso de transdução de sinal Smad. Desse modo, a invenção provê métodos de modulação de um efeito de miostatina sobre uma célula através de contato da célula com um 10 agente que afeta a transdução de sinal de miostatina na célula.

Conforme aqui usado, o termo "modula", quando usado em referência a um efeito de miostatina sobre uma célula, significa que a transdução de sinal da miostatina na célula é ou aumentada ou reduzida ou inibida. Os termos "aumenta" e "reduz ou inibe" são usados em referência a um nível de 15 base de atividade de transdução de sinal de miostatina, que pode ser o nível de atividade do curso de transdução de sinal na ausência de miostatina, ou o nível de atividade em uma célula normal na presença de miostatina. Por exemplo, o curso de transdução de sinal de miostatina exibe uma atividade particular em uma célula muscular contatada com miostatina, e, quando de 20 mais contato da célula muscular com um pró-domínio de miostatina, a atividade de transdução de sinal de miostatina pode ser reduzida ou inibida. Desse modo, um pró-domínio de miostatina é um agente útil para reduzir ou inibir a transdução de sinal de miostatina. Similarmente, um pró-domínio de outro membro da família de GDF tal como pró-domínio de GDF-11, ou um 25 outro membro da família de TGF-9 tal como um pró-domínio de activina, pró-domínio de MIS, ou similar, pode ser útil para redução da transdução de sinal de miostatina. Os termos "reduz e inibe" são usados juntos aqui porque é reconhecido que, em alguns casos, o nível de transdução de sinal de miostatina pode ser reduzido abaixo de um nível que pode ser detectado através 30 de um ensaio particular. Desse modo, ele pode não ser determinável usando tal ensaio de se um nível baixo de transdução de sinal de miostatina permanece, ou se a transdução de sinal está completamente inibida.

Conforme aqui usado, o termo "transdução de sinal de miostatina" refere-se a séries de casos, geralmente uma série de interações de proteína-proteína, que acontecem em uma célula devido à interação específica de miostatina com um receptor de miostatina expresso na superfície da célula. Desse modo, transdução de sinal de miostatina pode ser detectada, por exemplo, através de detecção de uma interação específica de miostatina com seu receptor em uma célula, através de detecção de fosforilação de um ou mais polipeptídeos envolvidos em um curso de transdução de sinal de miostatina na célula, através da detecção da expressão de um ou mais genes que são especificamente induzidos devido à transdução de sinal de miostatina, ou através de detecção de uma mudança fenotípica que acontece em resposta à transdução de sinal de miostatina (vide Exemplos). Conforme aqui descrito, um agente útil em um método da invenção pode agir como um agonista para estimular a transdução de sinal de miostatina ou como um antagonista para reduzir ou inibir a transdução de sinal de miostatina.

Os métodos da presente invenção são exemplificados aqui em geral com relação à miostatina. Deve ser reconhecido, no entanto, que os métodos da invenção podem compreender mais amplamente modulação de um efeito de outros peptídeos de GDF, por exemplo, GDF-11, em uma célula através de contato da célula com um agente que afete a transdução de sinal devido ao GDF na célula. Métodos de prática do escopo completo da invenção serão prontamente conhecidos em vista do presente relatório, que inclui, por exemplo, métodos de identificação de receptores de GDF, métodos de identificação de agentes que modulam a transdução de sinal devido a uma interação específica do GDF com seu receptor e similar.

Um curso de transdução de sinal de miostatina é exemplificado aqui pelo curso Smad, que é iniciado quando a miostatina especificamente interage com o domínio extracelular de um receptor do II de activina e propaga através de interações de polipeptídeos intracelulares, incluindo proteínas Smad, na célula. Em geral, a transdução de sinal de miostatina está associada à fosforilação ou desfosforilação de polipeptídeos intracelulares específicos tal como polipeptídeos Smad. Desse modo, a transdução de sinal

de miostatina em uma célula pode ser detectada através da detecção de um nível maior de fosforilação de um ou mais polipeptídeos Smad na presença de miostatina conforme comparado com o nível de fosforilação dos polipeptídeos na ausência de miostatina. Um método da invenção provê um meio 5 para aumentar ou diminuir a transdução de sinal de miostatina e, desse modo, o nível de fosforilação de um polipeptídeo Smad envolvido em um curso de transdução de sinal de miostatina será aumentado acima de um nível normal ou diminuído abaixo de um nível esperado na presença de miostatina, respectivamente.

10 Um método da invenção pode ser realizado, por exemplo, através de contato sob condições adequadas de uma célula alvo e um agente que afeta a transdução de sinal de miostatina na célula. Condições adequadas podem ser providas pondo a célula, que pode ser uma célula isolada ou pode ser um componente de um tecido ou órgão, em um meio de cultura 15 apropriado, ou através de contato da célula *in situ* em um organismo. Por exemplo, um meio contendo a célula pode ser contatado com um agente que afeta a habilidade da miostatina em especificamente interagir com um receptor de miostatina expresso na célula, ou com um agente que afeta um curso de transdução de sinal de miostatina na célula. Em geral, a célula é um 20 componente de um tecido ou órgão em um indivíduo, caso onde contato da célula pode compreender administrar o agente ao indivíduo. No entanto, a célula pode também ser manipulada na cultura, então pode ser mantida na cultura, administrada a um indivíduo ou usada para produzir um animal não-humano transgênico.

25 Um agente útil em um método da invenção pode ser qualquer tipo de molécula, por exemplo, um polinucleotídeo, um peptídeo, um peptidomimético, peptóides tal como peptóides vinillogos, uma molécula orgânica pequena, ou similar, e pode agir em qualquer uma de várias maneiras para realizar a transdução de sinal de miostatina. O agente pode agir extracelularmente ligando miostatina ou um receptor de miostatina tal como um receptor de activina, desse modo alterando a habilidade da miostatina em especificamente interagir com seu receptor, ou pode agir intracelularmente pa-

ra alterar a transdução de sinal de miostatina na célula. Em adição, o agente pode ser um agonista, que imita ou aumenta o efeito da miostatina em uma célula, por exemplo, a habilidade da miostatina em especificamente interagir com seu receptor, desse modo aumentando a transdução de sinal de miostatina na célula; ou pode ser um antagonista, que pode reduzir ou inibir o efeito da miostatina em uma célula, desse modo reduzindo ou inibindo a transdução de sinal de miostatina na célula.

Conforme aqui usado, o termo "interação específica" ou "se liga especificamente" ou similar significa que duas moléculas formam um complexo que é relativamente estável sob condições fisiológicas. O termo é usado aqui em referência a várias interações, incluindo, por exemplo, a interação de miostatina e receptor de miostatina, a interação dos componentes intracelulares de um curso de transdução de sinal de miostatina, a interação de um anticorpo e seu antígeno, e a interação de um pró-domínio de miostatina com miostatina. Uma interação específica pode ser caracterizada por uma constante de dissociação de pelo menos cerca de 1×10^{-6} M, geralmente pelo menos cerca de 1×10^{-7} M, geralmente pelo menos cerca de 1×10^{-8} M, e particularmente pelo menos cerca de 1×10^{-9} M ou 1×10^{-10} M ou mais. Uma interação específica geralmente é estável sob condições fisiológicas, incluindo, por exemplo, condições que acontecem em um indivíduo vivo tal como um humano ou outro vertebrado ou invertebrado, bem como condições que acontecem em uma cultura de célula tal como usado para manter células mamíferas ou células de um outro organismo vertebrado ou um organismo invertebrado. Em adição, uma interação específica tal como a interação extracelular de um pró-domínio de miostatina e miostatina geralmente é estável sob condições tal como aquelas usadas para aquacultura de um organismo marinho comercialmente valioso. Métodos para determinação de se as moléculas interagem especificamente são bem conhecidos e incluem, por exemplo, diálise de equilíbrio, ressonância de plasmon de superfície e similar.

Um agente que altera uma interação específica de miostatina com seu receptor pode agir, por exemplo, se ligando à miostatina de modo

que ela não possa interagir especificamente com seu receptor celular, competindo com miostatina quanto à ligação com seu receptor, ou de outro modo desviando a necessidade de que a miostatina especificamente interaja com seu receptor a fim de induzir transdução de sinal de miostatina. Um receptor de miostatina truncado tal como um domínio extracelular solúvel de um receptor de miostatina é um exemplo de um agente que pode se ligar à miostatina, desse modo, seqüestrando a miostatina e reduzindo ou inibindo a sua habilidade em interagir especificamente com um receptor de miostatina de superfície de célula. Um pró-domínio de miostatina ou uma porção de peptídeo funcional dele é um outro exemplo de um agente que pode ser ligar à miostatina, desse modo reduzindo ou inibindo a habilidade da miostatina em interagir especificamente com um receptor de miostatina de superfície de célula. Tais antagonistas de miostatina são úteis na prática de um método da invenção, particularmente para redução ou inibição de transdução de sinal de miostatina em uma célula.

Folistatina é um outro exemplo de um agente que pode ser ligar à miostatina, desse modo reduzindo ou inibindo a habilidade da miostatina em interagir especificamente com seu receptor. A folistatina pode se ligar a e inibir a atividade de vários membros da família de TGF- β , incluindo miostatina (GDF-8; Patente U.S. No. 6.004.937) e GDF-11 (Gamer e outros, Devel. Biol. 208:222-232, 1999) e, desse modo, pode ser usada para realizar um método conforme descrito. Embora o uso de folistatina para modulação dos efeitos da miostatina ter sido anteriormente descrito (Patente U.S. No. 6.004.937), era sabido, antes do presente relatório, que a folistatina reduz ou inibe a habilidade da miostatina em interagir especificamente com um receptor de miostatina tal como Act RIIB.

Um agente útil em um método da invenção pode também interagir com um receptor de miostatina celular, desse modo competindo com a miostatina pelo receptor. Tal agente pode ser, por exemplo, um anticorpo que se liga especificamente a um receptor de miostatina de superfície de célula, incluindo todo ou uma porção do domínio de ligação de miostatina, desse modo prevenindo a miostatina de interagir especificamente com o re-

ceptor. Tal anticorpo de receptor antimiostatina pode ser selecionado quanto à sua habilidade em especificamente se ligar ao receptor sem ativar a transdução de sinal de miostatina e, desse modo, pode ser útil como um antagonista de miostatina para redução ou inibição de transdução de sinal de miostatina; ou pode ser selecionado quanto à sua habilidade em especificamente se ligar ao receptor e ativar a transdução de sinal de miostatina, desse modo agindo como um agonista de miostatina. O anticorpo pode ser produzido usando um receptor de miostatina, ou o domínio extracelular do receptor, como um imunógeno, ou pode ser um anticorpo anti-idiotípico, que é produzido contra um anticorpo antimiostatina e imita a miostatina. Anticorpos de receptor anti-GDF são discutidos em mais detalhes abaixo.

Um agente útil em um método da invenção podem ser também um agente que reduz ou inibe a clivagem proteolítica de um polipeptídeo de pró-GDF em um peptídeo de GDF maduro ativo, desse modo reduzindo ou inibindo a transdução de sinal de GDF. Tal agente pode ser um inibidor de protease, particularmente um que inibe a atividade de uma protease que reconhece e cliva um sítio de reconhecimento proteolítico Arg-Xaa-Xaa-Arg (SEQ ID NO: 21). Onde o pró-GDF é promiostatina, um anticorpo antimiostatina que reduz ou inibe a ligação específica de uma protease ao sítio de clivagem proteolítico Arg-Xaa-Xaa-Arg (SEQ ID NO: 21) na miostatina pode também ser usado para reduzir ou inibir a proteólise de promiostatina, desse modo reduzindo a quantidade de miostatina madura produzida. Tal anticorpo pode ser ligar ao sítio de clivagem proteolítica, ou pode ser ligar a algum outro sítio no polipeptídeo de pró-GDF de modo que a ligação de e clivagem através da protease é reduzida ou inibida.

Em adição, um agente útil em um método da invenção pode ser um receptor de miostatina mutante, que, por exemplo, não tem atividade de transdução de sinal de miostatina em resposta à ligação de miostatina, ou tem atividade de transdução de sinal de miostatina constitutiva. Por exemplo, um receptor de miostatina mutante pode ter uma mutação por ponto, uma deleção ou similar em seu domínio cinase de modo que o receptor não tem atividade de cinase. Tal receptor de miostatina mutante negativo dominante

não tem a habilidade em transmitir transdução de sinal de miostatina apesar do fato de que ele pode se ligar especificamente à miostatina.

Um agente útil no método da invenção podem também modular o nível ou atividade de um polipeptídeo intracelular envolvido em um curso de transdução de sinal de miostatina. Conforme aqui descrito, regulagem de crescimento do músculo pelo miostatina pode envolver componentes de um curso de transdução de sinal que é ativada pelos receptores de activina do tipo II (vide Exemplos 7 e 9; vide, também, Exemplo 14). A miostatina especificamente interage com os receptores de activina do tipo IIC (Act RIIB) expressos em células COS em cultura (Exemplo 7). A baixa afinidade de ligação indica que a miostatina que se liga a Act RIIB *in vivo* pode envolver outros fatores, similares à TGF- β , que têm afinidade显著mente maior para o receptor do tipo II quando o receptor do tipo I está também presente (Attisano e outros, Cell 75:671-680, 1993), ou a outros sistemas que requerem outras moléculas para mostrar o ligante ao receptor de sinalização (Massague, *supra*, 1998; Wang e outros, Cell 67:795-805, 1991).

A interação específica de miostatina com Act RIIB indica que a transdução de sinal de miostatina pode envolver componentes do curso de transdução de sinal Smad. Desse modo, o curso de transdução de sinal Smad provêm um alvo para modulação do efeito da miostatina sobre uma célula, e agentes que afetam o curso Smad podem ser úteis para modulação da transdução de sinal de miostatina em uma célula.

Agentes úteis para modulação do nível ou atividade de componentes de polipeptídeo intracelular de uma transdução de sinal de GDF incluem agonistas, que podem aumentar a atividade de transdução de sinal, e antagonistas, que podem reduzir ou inibir a atividade de transdução de sinal. Com relação à miostatina, por exemplo, agentes que podem aumentar a atividade de transdução de sinal de miostatina são exemplificados pelos inibidores de fosfatase, que podem reduzir ou inibir a desfosforilação de polipeptídeos Smad, desse modo prolongando a atividade de transdução de sinal de Smad. Polipeptídeos Smad 6 e Smad 7 negativos dominantes, que podem negar o efeito de inibição de Smad 6 e Smad 7 sobre a transdução de

sinal de miostatina, são exemplos adicionais de agentes que podem aumentar a atividade de transdução de sinal de miostatina aumentando a transdução de sinal de Smad.

Agentes antagonistas que podem reduzir ou inibir a atividade de transdução de sinal de miostatina são exemplificados por polipeptídeos Smad negativos dominantes tal como Smad 2, Smad 3 ou Smad 4 negativo dominante, onde os sítios de fosforilação C-terminal foram mutados. Os polipeptídeos Smad de inibição tal como Smad 6 e Smad 7, que inibem a ativação de Smad 2 e Smad 3; e um polipeptídeo c-ski, que liga polipeptídeos Smad e inibe transdução de sinal, são exemplos adicionais de antagonistas úteis para redução ou inibição de transdução de sinal de miostatina através da diminuição da transdução de sinal de Smad.

Onde o agente que age intracelularmente é um peptídeo, ele pode ser contatado com a célula diretamente, ou um polinucleotídeo codificando o peptídeo (ou polipeptídeo) pode ser introduzido na célula e o peptídeo pode ser expresso na célula. É reconhecido que alguns dos peptídeos úteis em um método da invenção são relativamente grande e, desse modo, podem não atravessar imediatamente uma membrana celular. No entanto, vários métodos são conhecidos para introdução de um peptídeo em uma célula. A seleção de um método para introdução de tal peptídeo em uma célula vai depender, em parte, das características da célula alvo, na qual o polipeptídeo deve ser provido. Por exemplo, onde as células alvo, ou alguns tipos de célula incluindo as células alvo, expressam um receptor, que, quando da ligação a um ligante em particular, é internalizado na célula, o agente de peptídeo pode ser operativamente associado ao ligante. Quando da ligação ao receptor, o peptídeo é transferido para a célula através de endocitose mediada por receptor. O agente de peptídeo pode também ser encapsulado em um lipossoma ou formulado em um complexo de lipídeo, que pode facilitar a entrada do peptídeo na célula, e pode ainda ser modificado para expressar um receptor (ou ligante), como acima. O agente de peptídeo pode também ser introduzido em uma célula construindo o peptídeo para conter um domínio de transdução de proteína tal como o domínio de transdução da

proteína TAT do vírus de imunodeficiência humana, que facilita a transferência do peptídeo para a célula (vide Schwarze e outros, *Science* 285:1569-1572 (1999), que é aqui incorporado a título de referência; vide, também, Derossi e outros, *J. Biol. Chem.* 271:18188 (1996)).

5 A célula alvo pode ser também contatada com um polinucleotídeo codificando o agente de peptídeo, que pode ser expresso na célula. O agente de peptídeo expresso pode ser um receptor de GDF mutante ou uma porção de peptídeo dele. Exemplo de um receptor de GDF mutante inclui uma forma deficiente em cinase de um receptor de miostatina tal como um
 10 Act RIIA ou Acr RIIB negativo dominante, que pode, mas não precisa, ter a habilidade em especificamente se ligar a um ligante (por exemplo, miostatina); e um receptor de miostatina ou outro de GDF truncado, tal como uma forma solúvel de um receptor de miostatina, que se liga à miostatina, desse modo seqüestrando-a de interagir especificamente com um receptor de miostatina celular; uma forma negativa-dominante de um polipeptídeo Smad tal como um Smad 3 negativo dominante, onde os sítios de fosforilação C-terminal foram mutados (Liu e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 94:10669-10674, 1997); um polipeptídeo Smad 7, que inibe a ativação de Smad 2 e Smad 3 (Heldin e outros, *Nature* 390:465-471, 1997); ou um polipeptídeo c-ski, que pode ser ligar a um polipeptídeo Smad e inibir a transdução de sinal
 15 pelo Smad (Sutrave e outros, *Genes Devel.* 4:1462-1472, 1990).
 20

A expressão de um agente de peptídeo c-ski em uma célula pode ser particularmente útil para modulação de transdução de sinal de miostatina. Camundongos não possuindo c-ski mostram uma redução grave na
 25 massa do muscular esquelético (Berk e outros, *Genes Devel.* 11:2029-2039, 1997), enquanto que camundongos transgênicos que superexpressam c-ski no músculo mostram hipertrofia muscular grave (Sutrave e outros, *supra*, 1990). c-ski interage com e bloqueia a atividade de certas proteínas Smad, incluindo Smad 2, Smad 3 e Smad 4, que fazem a mediação da sinalização
 30 de receptores de TGF- β e do activina do tipo II (Luo e outros, *Genes Devel.* 13:2196-21106, 1999; Stroschein e outros, *Science* 286:771-774, 1999; Sun e outros, *Mol. Cell.* 4:499-509, 1999a, Sun e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci.,*

USA 96:112442-12447, 1999b; Akiyoshi e outros, J. Biol. Chem. 274:35269, 1999). Desse modo, em vista da presente descrição de que a atividade da miostatina pode ser mediada através de ligação de Act RIIB, será reconhecido que a atividade da miostatina, ou de qualquer GDF que utilize um curso 5 Smad, pode ser modulada aumentando ou diminuindo a expressão c-ski em uma célula alvo.

Um agente útil em um método da invenção pode ser um polinucleotídeo, que pode ser contatado com ou introduzido em uma célula conforme acima descrito. Em geral, mas não necessariamente, o polinucleotídeo 10 é introduzido na célula, onde ele realiza a sua função diretamente, ou seguindo a transcrição ou tradução ou ambos. Por exemplo, conforme acima discutido, o polinucleotídeo polimérico pode codificar um agente peptídeo, que é expresso na célula e modula a atividade da miostatina. Tal peptídeo expresso pode ser, por exemplo, um polipeptídeo de promiostatina mutante, 15 que não pode ser clivado em miostatina ativa; ou pode ser um receptor de miostatina mutante, por exemplo, um domínio extracelular de receptor de miostatina truncado; um domínio extracelular de receptor de miostatina operativamente associado a um domínio de ancoragem de membrana; ou um receptor de miostatina mutante sem atividade de cinase de proteína. Métodos 20 para introdução de um polinucleotídeo em uma célula são exemplificados abaixo ou de outra maneira conhecidos na técnica.

Um agente de polinucleotídeo útil em um método da invenção pode ser também, ou pode codificar, uma molécula de anti-sentido, uma ribozima ou um agente de triplexação. Por exemplo, o polinucleotídeo pode 25 ser (ou pode codificar) uma seqüência de nucleotídeo de anti-sentido tal como uma seqüência de nucleotídeo c-ski de anti-sentido, que pode agir como um agonista para aumentar a transdução de sinal de miostatina em uma célula; ou uma seqüência de nucleotídeo Smad de anti-sentido, que pode agir ou como um agonista para aumentar a transdução de sinal de miostatina ou 30 como antagonista para reduzir ou inibir a transdução de sinal de miostatina, dependendo da seqüência de nucleotídeo de anti-sentido Smad em particular. Tais polinucleotídeos podem ser contatados diretamente com a célula

alvo e, quando da absorção pela célula, podem afetar a sua atividade anti-sentido, de ribozima ou de triplexação; ou podem ser codificados por um polinucleotídeo que é introduzido em uma célula, com o que o polinucleotídeo é expresso para produzir, por exemplo, uma molécula de RNA de anti-sentido ou ribozima, que realiza a sua atividade.

Um agente anti-sentido, ribozima ou de triplexação é complementar a uma seqüência alvo, que pode ser uma seqüência de DNA ou RNA, por exemplo, um RNA mensageiro, e pode ser uma seqüência de codificação, uma seqüência de nucleotídeo compreendendo uma junção intron-exon, uma seqüência de regulagem tal como uma seqüência Shine-Delgarno, ou similar. O grau de complementariedade é tal que o polinucleotídeo, por exemplo, um polinucleotídeo de anti-sentido, pode interagir especificamente com a seqüência alvo em uma célula. Dependendo do comprimento total do polinucleotídeo de anti-sentido ou outro, um ou mais desencontros com relação à seqüência alvo podem ser tolerados sem perder a especificidade do polinucleotídeo quanto à sua seqüência alvo. Desse modo, poucos se algum desencontro seriam tolerados em uma molécula de anti-sentido consistindo, por exemplo, em 20 nucleotídeos, enquanto que vários desencontros não afetarão a eficiência de hibridização de uma molécula de anti-sentido que é complementar, por exemplo, ao comprimento completo de um mRNA alvo codificando um polipeptídeo celular. O número de desencontros que pode ser tolerado pode ser estimado, por exemplo, usando fórmulas bem conhecidas na técnica para determinar a cinética de hibridização (vide Sambrook e outros, *supra*, 1989) ou pode ser determinado empiricamente usando métodos conforme aqui descrito ou de outra maneira conhecidos na técnica, particularmente através da determinação de que a presença de polinucleotídeo de anti-sentido, ribozima ou agente de triplexação em uma célula diminui o nível da seqüência alvo ou a expressão de um polipeptídeo codificado pela seqüência alvo na célula.

Um polinucleotídeo útil como uma molécula de anti-sentido, uma ribozima ou um agente de triplexação pode inibir a tradução ou clivar a molécula de ácido nucléico, desse modo modulando a transdução de sinal de

miostatina em uma célula. Uma molécula de anti-sentido, por exemplo, pode ser ligar a um mRNA para formar uma molécula de filamento duplo que não pode ser traduzida em uma célula. Oligonucleotídeos de anti-sentido são facilmente sintetizados e podem hibridizar especificamente com uma seqüência alvo, embora moléculas de anti-sentido mais longas possam ser expressas a partir de um polinucleotídeo introduzido na célula alvo. Seqüências de nucleotídeo específicas úteis como moléculas de anti-sentido podem ser identificadas usando métodos bem conhecidos, por exemplo, métodos de movimento de gene (vide, por exemplo, Seimiya e outros, *J. Biol. Chem.* 272:4631-4636 (1997), que é aqui incorporado a título de referência). Onde a molécula de anti-sentido é contatada diretamente com uma célula alvo, ela pode estar operativamente associada a um grupo quimicamente reativo tal como EDTA ligada a ferro, que cliva um RNA alvo no sítio de hibridização. Um agente de triplexação, em comparação, pode parar a transcrição (Maher e outros, *Antisense Res. Devel.* 1:227 (1991); Helene, *Anticancer Drug Design* 6:569 (1991)). Desse modo, um agente de triplexação pode ser planejado para reconhecer, por exemplo, uma seqüência de um elemento de regulagem do gene Smad, desse modo reduzindo ou inibindo a expressão de um polipeptídeo de Smad na célula, desse modo modulando a transdução de sinal de miostatina em uma célula alvo.

A presente invenção também provê um método de identificação de um agente que pode alterar o efeito de um GDF tal como miostatina em uma célula, particularmente agentes que podem alterar a habilidade do GDF em interagir especificamente com o seu receptor celular. Tais agentes podem agir aumentando ou diminuindo a habilidade do GDF em interagir especificamente com seu receptor e, desse modo, são úteis para aumentar ou diminuir a transdução de sinal de GDF, respectivamente. Um método de avaliação da invenção é exemplificado aqui usando um receptor de miostatina, por exemplo, um receptor de activina do tipo II tal como Act RIIA ou Act RIIB.

Um método de avaliação da invenção pode ser realizado, por exemplo, através de contato sob condições adequadas da miostatina, ou

uma porção de peptídeo funcional dela, um receptor de miostatina tal como Act RIIA ou Act RIIB, e um agente a ser testado. A miostatina, o receptor e o agente podem ser contatados em qualquer ordem conforme desejado. Desse modo, o método de avaliação pode ser usado para identificar agentes que 5 podem competitivamente ou não-competitivamente inibir a ligação de miostatina ao receptor, agentes que podem fazer a mediação ou aumentar a ligação de miostatina ao receptor, agentes que podem induzir dissociação de miostatina especificamente ligada ao receptor, e agentes que de outro modo afetam a habilidade da miostatina em induzir transdução de sinal, tais agentes tendo atividade agonista ou antagonista. Reações de controle apropriadas 10 são realizadas para confirmar que a ação do agente é específica com relação à miostatina ou outro receptor de GDF.

Condições adequadas para realização de um método de avaliação da invenção podem ser quaisquer condições que permitam que a miostatina especificamente interaja com seu receptor, incluindo métodos conforme aqui descrito (vide Exemplos 7 e 9) ou de outro modo conhecidos na técnica. Desse modo, condições adequadas para realização do ensaio de avaliação podem ser, por exemplo, condições *in vitro* usando um receptor de miostatina substancialmente purificado; condições de célula, utilizando uma 15 célula que normalmente expressa um receptor de miostatina, por exemplo, um adipócito ou uma célula muscular, ou uma célula que foi geneticamente modificada para expressar um receptor de miostatina funcional em sua superfície; ou condições *in situ* conforme acontece em um organismo.

Um método de avaliação da invenção pode ser também realizado 20 usando os métodos de modelagem molecular conforme acima descrito. A utilização de um método de modelagem molecular provê um meio conveniente, de custo eficaz, para identificar esses agentes, dentre uma grande população tal como uma biblioteca combinatória de agentes potenciais, que 25 são mais prováveis de interagir especificamente com um receptor de GDF, desse modo reduzindo o número de agentes potenciais que precisam ser 30 avaliados usando um ensaio biológico. Quando da identificação de agentes que especificamente interagem com um receptor de GDF tal como Acr RIIB

usando um método de modelagem molecular, os agentes selecionados podem ser examinados quanto à sua habilidade em modular um efeito de um GDF tal como miostatina sobre uma célula usando os métodos descritos aqui.

5 A habilidade de um agente de teste em modular um efeito da miostatina pode ser detectada usando métodos conforme descrito aqui (vide Exemplos 7 e 9) ou de outro modo conhecidos na técnica. O termo "agente de teste" ou "molécula de teste" é usado amplamente aqui para significar qualquer agente que está sendo examinado quanto à atividade agonista ou 10 antagonista em um método da invenção. Embora o método seja geralmente usado como um ensaio de avaliação para identificar moléculas anteriormente desconhecidas que podem agir como agentes agonistas ou antagonistas conforme aqui descrito, os métodos podem ser também usados para confirmar que um agente sabido ter uma atividade em particular de fato tem a atividade, por exemplo, na padronização da atividade do agente.

15

Um método da invenção pode ser realizado, por exemplo, através de contato da miostatina com uma célula que foi geneticamente modificada para expressar um receptor de Act RIIB, de determinando o efeito de um agente, por exemplo, um Act RIIB negativo dominante, examinando a 20 fosforilação de um polipeptídeo Smad envolvido no curso de transdução de sinal de miostatina. Se desejado, a célula pode ser ainda geneticamente modificada para conter uma seqüência de nucleotídeo repórter, cuja expressão é dependente do curso de transdução de sinal de miostatina, por exemplo, da ativação do curso de Smad e o efeito do agente de teste pode ser 25 determinado comparando a expressão da seqüência de nucleotídeo repórter na presença ou ausência do agente, miostatina, ou ambos. Expressão da seqüência de nucleotídeo repórter pode ser detectada, por exemplo, através da detecção de um transcrito de RNA da seqüência de nucleotídeo repórter, ou através de detecção de um polipeptídeo codificado pela seqüência de 30 nucleotídeo repórter. Um polipeptídeo repórter pode ser, por exemplo, um polipeptídeo β -lactamase, cloranfenicol acetiltransferase, adenosina desaminase, aminoglicosídeo fosfotransferase, diidrofolato redutase, higromicina-

B fosfotransferase, timidina cinase, β -galactosidase, luciferase ou xantina guanina fosforibosiltransferase ou similar, e pode ser detectado, por exemplo, detectando a radioatividade, luminescência, quimioluminescência, fluorescência, atividade enzimática, ou ligação específica devido ao polipeptídeo

5 repórter.

Um método de avaliação da invenção provê a vantagem de que ele pode ser adaptado para análise de grande quantidade e, desse modo, pode ser usado para avaliar bibliotecas combinatórias de agentes de teste a fim de identificar aqueles agentes que podem modular um efeito da miostatina

10 em uma célula, incluindo aqueles agentes que podem alterar uma interação específica de miostatina e um receptor de miostatina. Métodos para preparação de uma biblioteca combinatória de moléculas que pode ser testada quanto a uma atividade desejada são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, métodos de fabricação de uma biblioteca de mostra de fago de

15 peptídeos, que podem ser peptídeos inibidos (vide, por exemplo, Patente U.S. No. 5.622.699; Patente U.S. No. 5.206.347; Scott and Smith, *Science* 249:386-390, 1992; Markland e outros, *Gene* 109:13-19, 1991; cada um deles aqui incorporado a título de referência); uma biblioteca de peptídeo (Patente U.S. No. 5.264.563, que é aqui incorporada a título de referência); uma

20 biblioteca peptidomimética (Blondelle e outros, *Trends Anal. Chem.* 14:83-92; uma biblioteca de ácido nucléico (O. Connell e outros, *supra*, 1996; Tuerk and Gold, *supra*, 1990; Gold e outros, *supra*, 1995; cada um deles aqui incorporado a título de referência); uma biblioteca de oligossacarídeo (York e outros, *Carbohydr. Res.* 285:99-128, 1996; Liang e outros, *Science* 274:1520-

25 1522, 1996; Ding e outros, *Adv. Expt. Med. Biol.* 376:261-269, 1995, cada um deles aqui incorporado a título de referência); uma biblioteca de lipoproteína (de Kruif e outros, *FEBS Lett.* 399:232-236, 1996, que é aqui incorporada a título de referência); um biblioteca de glicoproteína ou glicolipídeo (Karaoglu e outros, *J. Cell Biol.* 130:567-577, 1995, que é aqui incorporada a

30 título de referência); ou uma biblioteca química contendo, por exemplo, drogas ou outros agentes farmacêuticos (Gordon e outros, *J. Med. Chem.* 37:1385-1401, 1994; Ecker e Crooke, *Bio/Technology* 13:351-360, 1995;

cada um deles aqui incorporado a título de referência). Os polinucleotídeos podem ser particularmente úteis como agentes que podem modular uma interação específica de miostatina e seu receptor porque moléculas de ácido nucléico tendo especificidade de ligação a alvos celulares, incluindo polipeptídeos celulares, existem naturalmente, e porque as moléculas sintéticas tendo tal especificidade podem ser imediatamente preparadas e identificadas (vide, por exemplo, Patente U.S. No. 5.750.342, que é aqui incorporada a título de referência).

Em vista do presente relatório, será reconhecido que vários sistemas de modelo animal podem ser usados como ferramentas de pesquisa para identificar agentes úteis para prática de um método da invenção. Por exemplo, camundongos transgênicos ou outros animais experimentais podem ser preparados usando os vários construtos inibidores de miostatina descritos aqui, e o organismo não-humano transgênico pode ser examinado diretamente para determinar o efeito produzido pela expressão de vários níveis de um agente particular no organismo. Em adição, o organismo transgênico, por exemplo, um camundongo transgênico, pode ser cruzado com outro camundongo, por exemplo, com camundongo mutante amarelo letal ob/ob, db/db ou agouti, para determinar os níveis de expressão ótimos de um inibidor de miostatina útil para tratamento ou prevenção de um distúrbio tal como obesidade, diabetes do tipo II, ou similar. Desse modo, a presente invenção provê organismos não-humanos transgênicos, particularmente organismos transgênicos contendo um polinucleotídeo codificando um pró-domínio de miostatina, que pode incluir o peptídeo de sinal de miostatina, ou um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo de promiostatina mutante.

Vários métodos são conhecidos para a produção de um animal transgênico. Em um método, um embrião no estágio pró-nuclear (um "embrião de uma célula") é colhido de uma fêmea e o transgene é microinjetado no embrião, caso onde o transgene será cromossomicamente integrado às células germinativas e células somáticas do animal maduro resultante. Em um outro método, células tronco embrionárias são isoladas e o transgene é incorporado às células tronco através de eletroforação, transfecção de plas-

mídeo ou microinjeção; as células tronco são então reintroduzidas no embrião, onde elas colonizam e contribuem para o tipo de germinação. Métodos para microinjeção de polinucleotídeos em espécies de mamífero são descritos, por exemplo, na Patente U.S. No. 4.873.191, que é aqui incorporada a 5 título de referência. Em ainda um outro método, células embriônicas são infectadas com um retrovírus contendo o transgene, com o que as células germinativas do embrião têm o transgene cromossomicamente integrado nelas.

Quando os animais a serem tornados transgênicos forem aves, 10 microinjeção no pró-núcleo do ovo fertilizado é problemática porque ovos de aves fertilizados geralmente sofrem divisão celular durante as primeiras vinte horas no oviduto e, desse modo, o pró-núcleo é inacessível. Desse modo, o método de infecção de retrovírus é preferido para tornar espécies de aves transgênicas (vide Patente U.S. No. 5.162.215, que é aqui incorporada a 15 título de referência). Se microinjeção tiver que ser usada com espécies de ave, no entanto, o embrião pode ser obtido de uma galinha sacrificada aproximadamente 2,5 horas após a postura do ovo anteriormente posto, o transgene é microinjetado no citoplasma do disco germinal e o embrião é 20 culturado em uma casca hospedeiro até a maturidade (Love e outros, Biotechnology 12, 1994). Quando os animais a serem tornados transgênicos são bovinos ou porcos, microinjeção pode ser dificultada pela opacidade dos óvulos, desse modo tornado difícil de identificar os núcleos através de microscopia de interferência-contraste diferencial tradicional. Para superar este 25 problema, os óvulos primeiro podem ser centrifugados para separar os pró-núcleos para melhor visualização.

Os animais transgênicos não-humanos da invenção podem ser bovinos, porcos, ovinos, aves ou outros animais. O transgene pode ser introduzido em célula alvo embrionárias em vários estágios de desenvolvimento, e métodos diferentes são selecionados dependendo do estágio de desenvolvimento da célula alvo embrionária. O zigoto é o melhor alvo para microinjeção. O uso dos zigotos como um alvo para transferência de gene tem uma vantagem principal pelo fato de que o DNA injetado pode incorporar ao 30

gene hospedeiro antes da primeira clivagem (Brinster e outros, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82:4438-4442, 1985). Como consequência, todas as células do animal não-humano transgênico carregam o transgene incorporado, desse modo contribuindo para a transmissão eficiente do transgene para a prole do criador, uma vez que 50% das células germinativas vão abrigar o transgene.

Um animal transgênico pode ser produzido através de cruzamento de dois animais quiméricos, cada um deles inclui material genético exógeno dentro das células usadas na reprodução. Vinte e cinco por cento da prole resultante serão animais transgênicos que são homozigotos para o material genético exógeno, 50% dos animais resultantes serão heterozigotos, e os restantes 25% não terão o material genético exógeno e terão um fenótipo do tipo selvagem.

No método de microinjeção, o transgene é digerido e purificado livre de qualquer DNA de vetor, por exemplo, através de eletroforese de gel. O transgene pode incluir um promotor operativamente associado, o qual interage com proteínas celulares envolvidas em transcrição, e provê expressão constitutiva, expressão específica de tecido, expressão específica de estágio de desenvolvimento, ou similar. Tais promotores incluem aqueles de citomegalovírus (CMV), vírus de leucemia Moloney (MLV), e vírus do herpes, bem como aqueles de genes codificando metalotioneína, actina esquelética, fosfenopiruvato carboxilase (PEPCK), fosfoglicerato (PGK), diidrofolato redutase (DHFR) e timidina cinase (TK). Promotores de repetições terminais longas virais (LTRs) tal como vírus LTR de sarcoma Rous podem ser também empregados. Quando os animais a serem tornados transgênicos são aves, os promotores preferidos incluem aqueles para o gene β -globina de galinha, gene lisozima de galinha e vírus de leucose de ave. Construtos úteis na transfecção de plasmídeo de células tronco embrionárias empregarão elementos de regulagem adicionais, incluindo, por exemplo, elementos de aumento para estimular a transcrição, aceitadores de união, sinais de terminação e poliadenilação, sítios de ligação de ribossoma para permitir tradução, e similar.

No método de infecção retroviral, o embrião não-humano em desenvolvimento pode ser posto em cultura *in vitro* para o estágio de blastó-cito. Durante este tempo, os blastômeros podem ser alvos para infecção retroviral (Jaenich, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 73:1260-1264, 1976). Infecção eficiente dos blastômeros é obtida através de tratamento enzimático para remover a zona translúcida (Hogan e outros, *Manipulating the Mouse Embryo* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986). O sistema de vetor viral usado para introduzir o transgene é tipicamente um retrovírus com defeito de replicação carregando o transgene (Jahner e outros, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82:6927-6931, 1985; Van der Putten e outros, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82:6148-6152, 1985). Transfecção é facilmente e eficientemente obtida através de cultura dos blastômeros em uma monocamada de células produtoras de vírus (Van der Putten e outros, *supra*, 1985; Stewart e outros, EMBO J. 6:383-388, 1987). Alternativamente, infecção pode ser realizada em um estágio posterior. Vírus ou células produtoras de vírus podem ser injetados no blastocele (Jahner e outros, *Nature* 298:623-628, 1982). A maior parte dos criadores será mosaico para o transgene uma vez que incorporação acontece apenas em um subconjunto das células que formavam o animal não-humano transgênico. Ainda, o criador pode conter várias inserções retrovirais do transgene em posições diferentes no genoma, as quais geralmente vão segregar na prole. Em adição, é também possível introduzir transgenes na linha germinativa, embora com eficiência baixa, através de infecção retroviral intrauterina do embrião no meio da gestação (Jahner e outros, *supra*, 1982).

Célula tronco embrionária (ES) pode ser também marcada para introdução do transgene. Células ES são obtidas de embriões de pré-implante culturados *in vivo* e fundidos com embriões (Evans e outros, *Nature* 292:154-156, 1981; Bradley e outros, *Nature* 309:255-258, 1984; Gossler e outros, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 83:9065-9069, 1986; Robertson e outros, *Nature* 322:445-448, 1986). Os transgenes podem ser eficientemente introduzidos nas células ES através de transfecção de DNA ou através de transdução mediada por retrovírus. Tais células ES transformadas podem desse

modo ser combinadas com blastócitos de um animal não-humano. As células ES em seguida colonizam o embrião e contribuem para a linha germinativa do animal quimérico resultante (vide Jaenisch, *Science* 240:1468-1474, 1988).

5 Conforme aqui descrito, a miostatina pode exercer a sua atividade, pelo menos em parte, através do curso de transdução de sinal de Smad, e a expressão da miostatina pode ser associada a várias condições patológicas. Desse modo, a presente invenção provê novos alvos para o tratamento de vários condições patológicas associadas à miostatina, incluindo condições metabólicas tal como obesidade e diabetes do tipo II. Desse modo, a presente invenção provê métodos para aliviar a gravidade de uma condição patológica em um indivíduo, onde a condição patológica é caracterizada pelo menos em parte por uma quantidade, desenvolvimento ou atividade metabólica anormal de tecido muscular ou adiposo, através da modulação da transdução de sinal de miostatina em uma célula muscular ou célula de tecido adiposo no indivíduo.

10 15

20 A miostatina funciona como um regulador negativo de crescimento muscular (McPherron e outros, *supra*, 1997). Camundongos mutantes para miostatina (knock-out mice) pesavam aproximadamente 25% a 30% mais do que os filhotes do tipo selvagem, e este aumento no peso do corpo nos camundongos examinados resultou totalmente de um aumento drástico no peso do tecido muscular esquelético. Em camundongos sem miostatina, os músculos esqueléticos pesavam cerca de 2 a 3 vezes mais que os músculos correspondentes dos filhotes do tipo selvagem. Este peso muscular maior nos camundongos nocauteados homozigotos resultou de uma combinação de hiperplasia e hipertrofia.

25

30 Conforme aqui descrito, camundongos mutantes para miostatina (knock-out mice) heterozigotos também têm massa muscular esquelética maior, embora em um grau menor do que aquele observado em camundongos mutantes homozigotos, desse modo demonstrando que a miostatina age de uma maneira dependente da dose *in vivo* (vide Exemplo 1). Ainda, superexpressão de miostatina em animais teve o efeito oposto com relação ao

crescimento muscular. Por exemplo, camundongos nus carregando tumores expressando miostatina desenvolveram uma síndrome de enfraquecimento caracterizada por uma perda dramática de músculo e peso de gordura (vide Exemplo 8). Esta síndrome nos camundongos nus lembrava o estado de 5 caquexia que acontece em paciente com doenças crônicas tal como câncer ou AIDS.

Os níveis de material imunorreativo à miostatina no soro estavam relacionados ao estado de pacientes com relação à fraqueza muscular (Gonzalez-Kadavid e outros, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 95:14938-14943, 10 1998, que é aqui incorporado a título de referência). Desse modo, pacientes com AIDS, que também mostraram sinais de caquexia conforme medido através de perda de peso do corpo total, tinham níveis ligeiramente altos de material imunorreativo à miostatina no soro comparado ou com homens normais sem AIDS ou com pacientes com AIDS que não tinham perda de 15 peso. No entanto, a interpretação desses resultados foi complicada porque o material imunorreativo à miostatina detectado nas amostras de soro não tinha a mobilidade em géis SDS que era esperada para miostatina processada autêntica.

Conforme aqui descrito, a miostatina não apenas afeta a massa 20 muscular, mas também afeta o metabolismo geral de um organismo. Por exemplo, a miostatina é expressa em tecido adiposo, e camundongos deficientes em miostatina têm uma redução drástica no acúmulo de gordura conforme o animal envelhece (vide Exemplos II e III). Embora nenhum mecanismo quanto à ação da miostatina seja proposto aqui, o efeito da miostatina 25 pode ser efeito direto da miostatina sobre o tecido adiposo, ou pode ser um efeito indireto causado pela perda de atividade de miostatina no tecido muscular esquelético. Não importando o mecanismo, o efeito anabólico geral sobre o tecido muscular que resulta em resposta à atividade de miostatina menor pode alterar o metabolismo geral do organismo e afetar o armazenamento 30 de energia na forma de gordura, conforme demonstrado através da introdução de uma mutação de miostatina em um tipo de camundongo obeso (camundongos agouti amarelo letal (A^y) que supriu o acúmulo de gordura

em cinco vezes. Metabolismo de glicose anormal também foi parcialmente suprimido em camundongos agouti contendo a mutação de miostatina. Esses resultados mostram que métodos de inibição de miostatina podem ser usados para tratar ou prevenir doenças metabólicas tal como obesidade e

5 diabetes do tipo II.

Os métodos da invenção são úteis, por exemplo, para alívio da gravidade de várias condições patológicas, incluindo, por exemplo, a caquexia associada a doenças crônicas tal como câncer (vide Norton e outros, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 7:289-372, 1987), bem como condições tal como

10 diabetes do tipo II, obesidade e outros distúrbios metabólicos. Conforme aqui usado, o termo "condição patológica" refere-se a um distúrbio que é caracterizado, pelo menos em parte, por uma quantidade, desenvolvimento ou atividade metabólica anormal de tecido muscular ou adiposo. Tais condições patológicas, que incluem, por exemplo, obesidade; condições associadas à

15 obesidade, por exemplo, aterosclerose, hipertensão, e infarto do miocárdio; distúrbios de enfraquecimento muscular tal como distrofia muscular, doenças neuromusculares, caquexia, e anorexia; e distúrbios metabólicos, tal como diabetes do tipo II, que geralmente, mas não necessariamente, estão associados à obesidade, são particularmente receptivos a tratamento usando um

20 método da invenção.

Conforme aqui usado, o termo "anormal" quando usado em referência à quantidade, desenvolvimento ou atividade metabólica de tecido muscular ou adiposo, é usado em um sentido relativo em comparação com uma quantidade, desenvolvimento ou atividade metabólica que um médico

25 versado ou outro profissional relevante reconheceria como sendo normal ou ideal. Tais valores normais ou ideais são conhecidos dos metidos e são baseados em valores médios geralmente observados ou desejados em um indivíduo saudável em uma população correspondente. Por exemplo, o médico saberia que a obesidade está associada a um peso do corpo que está

30 cerca de vinte por cento acima de uma faixa de peso ideal para uma pessoa de uma altura e tipo de corpo em particular. No entanto, o médico reconheceria que uma construção de corpo não é necessariamente obesa simples-

mente em virtude de ter um peso do corpo que está vinte por cento ou mais acima do peso esperado para uma pessoa da mesma altura e tipo de corpo em uma outra população correspondente. Similarmente, o versado saberia que um paciente apresentando o que parece ser atividade muscular anormalmente menor poderia ser identificado como tendo desenvolvimento muscular anormal, por exemplo, submetendo o paciente a vários testes de força e comparando os resultados com aqueles esperados para um indivíduo saudável médio em uma população correspondente.

Um método da invenção pode aliviar a gravidade de uma condição patológica que é caracterizada, pelo menos em parte, por uma quantidade, desenvolvimento ou atividade metabólica anormal no tecido muscular ou adiposo, através de modulação da transdução de sinal de miostatina em uma célula de tecido muscular ou adiposo associada à etiologia da condição. Conforme aqui usado, o termo "aliviar" quando usado em referência à gravidade de uma condição patológica, significa que sinais ou sintomas associados à condição são diminuídos. Os sinais ou sintomas a serem monitorados serão característicos de uma condição patológica em particular e serão bem conhecidos do médico versado, bem como serão os métodos para monitoramento dos sinais e condições. Por exemplo, onde a condição patológica foi diabetes do tipo II, o médico versado pode monitorar os níveis de glicose, taxas de liberação de glicose, e similar no indivíduo. Onde a condição patológica for obesidade ou caquexia, o clínico pode simplesmente monitorar o peso do corpo do indivíduo.

O agente a ser administrado ao indivíduo é administrado sob condições que facilitam contato do agente com a célula alvo e, se apropriado, entra na célula. A entrada de um agente polinucleotídeo em uma célula, por exemplo, pode ser facilitada através da incorporação do polinucleotídeo a um vetor viral que pode infectar as células. Se um vetor viral específico para o tipo de célula não estiver disponível, o vetor pode ser modificado para expressar um receptor (ou ligante) específico para um ligante (ou receptor) expresso em uma célula alvo, ou pode ser encapsulado dentro de um lipossoma, que pode ser também modificado para incluir tal ligante (ou receptor).

Um agente de peptídeo pode ser introduzido em uma célula através de vários métodos, incluindo, por exemplo, construindo o peptídeo para conter um domínio de transdução de proteína tal como o domínio de transdução de proteína TAT do vírus da imunodeficiência humana, que pode facilitar a transferência do peptídeo para a célula (vide Schwarze e outros, *supra*, 1999; Derossi e outros, *supra*, 1996).

A presença do agente na célula alvo pode ser identificada diretamente, por exemplo, operativamente ligando um rótulo detectável ao agente, usando um anticorpo específico para o agente, particularmente um agente de peptídeo, ou detectando um efeito a jusante devido, por exemplo, à fosforilação menor do agente de um polipeptídeo Smad na célula. Um agente pode ser rotulado de modo a ser detectável usando métodos bem conhecidos na técnica (Hermanson, "Bioconjugate Techniques" (Academic Press, 1996), que é aqui incorporado a título de referência; vide, também, Harlow e Lane, *supra*, 1988). Por exemplo, um agente de peptídeo ou polinucleotídeo pode ser rotulado com várias porções detectáveis incluindo um radiorrótulo, uma enzima tal como fosfatase alcalina, biotina, um fluorímero, e similar. Onde o agente estiver contido em um kit, os reagentes para rotulagem do agente podem ser também incluídos no kit, ou os reagentes podem ser comprados separadamente de uma fonte comercial.

Um agente útil em um método da invenção pode ser administrado ao sítio da condição patológica, ou pode ser administrado através de qualquer método que proveja as células alvo com o polinucleotídeo ou peptídeo. Conforme aqui usado, o termo "células alvo" significa células musculares ou adipócitos que devem ser contatados com o agente. Para administração a um indivíduo vivo, o agente geralmente é formulado em uma composição farmacêutica adequada para administração ao indivíduo. Desse modo, a invenção provê composições farmacêuticas contendo um agente, que é útil para modulação de transdução de sinal de miostatina em uma célula, em um carreador farmaceuticamente aceitável. Desse modo, os agentes são úteis como medicamentos para tratamento de um indivíduo sofrendo de uma condição patológica conforme aqui definido.

Carreadores farmaceuticamente aceitáveis são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, soluções aquosas tal como água ou solução salina fisiologicamente tamponada ou outros solventes ou veículos tal como glicóis, glicerol, óleos tal como óleo de oliva ou ésteres orgânicos injetáveis. Um carreador farmaceuticamente aceitável pode conter compostos fisiologicamente aceitáveis que agem, por exemplo, para estabilizar ou aumentar a absorção do conjugado. Tais compostos fisiologicamente aceitáveis incluem, por exemplo, carboidratos, tal como glicose, sacarose ou dextrans, antioxidantes, tal como ácido ascórbico ou glutathiona, agentes de quelação, proteínas de baixo peso molecular ou outros estabilizantes ou excipientes. Uma pessoa versada na técnica saberia que a escolha de um carreador farmaceuticamente aceitável, incluindo um composto fisiologicamente aceitável, depende, por exemplo, das características físico-químicas do agente terapêutico e da via de administração da composição, que pode ser, por exemplo, oralmente ou parenteralmente tal como intravenosamente, e através de injeção, entubação, ou outro método do tipo conhecido na técnica. A composição farmacêutica pode também conter um segundo reagente tal como um reagente de diagnóstico, substância nutricional, toxina ou agente terapêutico, por exemplo, um agente quimioterapêutico para câncer.

O agente pode ser incorporado dentro de um material de encapsulação tal como em uma emulsão óleo-em-água, uma microemulsão, micela, micela mista, lipossoma, microesfera ou outra matriz de polímero (vide, por exemplo, Gregoriadis, Liposome Technology, Vol. 1 (CRC Press, Boca Raton, FL 1984); Fraley e outros, Trends Biochem. Sci. 6:77 (1981), cada um deles aqui incorporado a título de referência). Lipossomas, por exemplo, que consistem em fosfolipídeos ou outros lipídeos, são carreadores não-tóxicos, fisiologicamente aceitáveis e metabolizáveis que são relativamente simples de se fazer e administrar. Lipossomas "secretos" (vide, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 5.882.679; 5.395.619; e 5.225.212, cada uma delas aqui incorporada a título de referência) são um exemplo de tais materiais de encapsulação particularmente úteis para preparação de uma composição farmacêutica útil para prática de um método da invenção, e outros lipossomas

"mascarados" similarmente podem ser usados, tais lipossomas prolongando o tempo que o agente terapêutico permanece na circulação. Lipossomas catiônicos, por exemplo, podem ser também modificados com receptores ou ligantes específico (Morisha e outros, *J. Clin. Invest.*, 91:2580-2585 (1993), 5 que é aqui incorporado a título de referência). Em adição, um agente de polinucleotídeo pode ser introduzido em uma célula usando, por exemplo, complexos de DNA de adenovírus-polilisina (vide, por exemplo, Michael e outros, *J. Biol. Chem.* 268:6866-6869 (1993), que é incorporado aqui a título de referência).

10 A via de administração de uma composição farmacêutica contendo um agente que altera a transdução de sinal de miostatina vai depender, em parte, da estrutura química da molécula. Polipeptídeos e polinucleotídeos, por exemplo, não são particularmente úteis quando administrados oralmente porque eles podem degradar no trato digestivo. No entanto, métodos para quimicamente modificar os polipeptídeos, por exemplo, para torná-los menos suscetíveis à degradação por proteases endógenas ou mais absorvíveis pelo trato alimentar são bem conhecidos (vide, por exemplo, Blondelle e outros, *supra*, 1995; Ecker e Crook, *supra*, 1995). Em adição, um agente de peptídeo pode ser preparado usando D-aminoácidos, ou pode conter 15 um ou mais domínios à base de peptidomiméticos, que são moléculas orgânicas que imitam a estrutura do domínio de peptídeo; ou à base de um peptídeo tal como um peptóide vinilógo.

20

Uma composição farmacêutica conforme aqui descrito pode ser administrada a um indivíduo através de várias vias, incluindo, por exemplo, 25 oralmente ou parenteralmente, tal como intravenosamente, intramuscularmente, subcutaneamente, intraorbitalmente, intracapsularmente, intraperitonealmente, intraretalmente, intracisternalmente ou através de absorção passiva ou facilitada pela pele usando, por exemplo, um emplastro para pele ou iontoforese transdérmica, respectivamente. Ainda, a composição farmacêutica pode ser administrada através de injeção, intubação, oralmente ou topicalmente, a última delas pode ser passiva, por exemplo, através de aplicação direta de um ungüento, ou ativa, por exemplo, usando um spray nasal ou

inalante, caso onde um componente da composição é um propelente apropriado. Uma composição farmacêutica pode também ser administrada ao sítio de uma condição patológica, por exemplo, intravenosamente ou intra-arterialmente a um vaso sanguíneo que alimenta um tumor.

5 A quantidade total de um agente a ser administrado na prática de um método da invenção pode ser administrada a um indivíduo como uma dose única, ou como um bolo ou através de infusão durante um período de tempo relativamente curto, ou pode ser administrada usando um protocolo de tratamento fracionado, onde doses múltiplas são administradas durante 10 um período de tempo prolongado. Uma pessoa versada na técnica saberia que a quantidade da composição farmacêutica para tratar uma condição patológica em um indivíduo depende de muitos fatores incluindo a idade e a saúde geral do indivíduo bem como a via de administração e o número de tratamentos a serem administrados. Em vista desses fatores, a pessoa versada na técnica ajustaria a dose particular conforme necessário. Em geral, a 15 formulação da composição farmacêutica e as vias e freqüência de administração são determinadas, inicialmente, usando testes clínicos de Fase I e Fase II.

A composição farmacêutica pode ser formulada para formulação 20 oral, tal como um comprimido, ou uma forma de solução ou suspensão; ou pode compreender uma mistura com carreador ou excipiente orgânico ou inorgânico adequada para aplicações enterais ou parenterais, e pode ser composta, por exemplo, com os carreadores não-tóxicos, farmaceuticamente aceitáveis comuns para comprimidos, peletes, cápsulas, supositórios, soluções, emulsões, suspensões ou outra forma adequada para uso. Os carreadores, em adição àqueles descritos acima, podem incluir glicose, lactose, manose, goma acácia, gelatina, manitol, pasta de amido, trisilicato de magnésio, talco, amido de milho, queratina, sílica coloidal, amido de batata, uréia, triglicerídeos de comprimento de cadeia médio, dextrans e outros carreadores adequados para uso na fabricação de preparações, na forma sólida, semi-sólida ou líquida. Em adição, agentes auxiliares, de estabilização, espessamento ou corantes e perfumes podem ser usados, por exemplo, um 25 30

agente de estabilização seco tal como triulose (vide, por exemplo, Patente U.S. No. 5.314.695).

A presente invenção também provê um método de modulação do crescimento de tecido muscular ou tecido adiposo em um indivíduo. Conforme aqui descrito, receptores de GDF tal como Act RIIA e Act RIIB estão envolvidos na mediação dos efeitos de um GDF tal como miostatina, que está envolvida na formação de tecido muscular e tecido adiposo. Desse modo, em uma modalidade, um método de modulação de crescimento de tecido muscular ou tecido adiposo inclui realizar transdução de sinal a partir de um receptor de GDF, tal como um receptor de activina, por exemplo, Act RIIA ou Act RIIB. Tal método pode ser realizado através de contato de células do tecido, ou expressando nas células, um receptor de GDF mutante, que tem atividade negativa, atividade constitutiva dominante ou similar.

Em uma outra modalidade, um método de modulação de crescimento de tecido muscular ou tecido adiposo em um organismo é realizado administrando ao organismo um agente que afeta a transdução de sinal de miostatina. De preferência, o agente é ou codifica um pró-domínio de miostatina ou um polipeptídeo de promiostatina mutante, qualquer um deles pode incluir um peptídeo de sinal de miostatina. Conforme aqui usado, o termo "crescimento" é usado em um sentido relativo ao referir-se à massa de tecido muscular ou massa de tecido adiposo em um organismo que foi submetido a um método da invenção comparado com um organismo correspondente que não foi submetido a um método da invenção. Desse modo, onde um método da invenção é realizado de modo que a transdução de sinal de miostatina foi reduzida ou inibida, será reconhecido que o crescimento de tecido muscular no organismo resultaria em uma massa muscular maior no organismo comparado com a massa muscular de um organismo correspondente (ou população de organismos) onde a transdução de sinal de miostatina não foi tão afetada.

Um método da invenção pode ser útil para aumento da massa muscular ou redução do teor de gordura de um organismo ou ambos. Por exemplo, onde tal método for realizado em um organismo que é útil como

uma fonte de alimento, o teor de proteína do alimento pode ser aumentado, o nível de colesterol pode ser diminuído, e a qualidade do gênero alimentício pode ser aperfeiçoada. Um método da invenção pode ser também útil para diminuir o crescimento do tecido muscular em um organismo, por exemplo, 5 um organismo que é prejudicial para um ambiente, de modo que o organismo é menos capaz de competir no ambiente. Desse modo, um método da invenção pode ser realizado em qualquer organismo eucariótico que expresse miostatina, incluindo um organismo vertebrado, por exemplo, organismo mamífero, ave ou peixe, ou pode ser um organismo invertebrado, por exemplo, 10 um molusco, equinodermo, gastrópodo ou quelópodo.

O agente pode ser qualquer agente que altere a transdução de sinal de miostatina, conforme aqui descrito, e pode ser administrado ao organismo de qualquer maneira conveniente. Por exemplo, onde o organismo a ser tratado for peixe, camarão, moluscos ou similar, que são criados em 15 aquacultura, o agente pode ser adicionado à água onde os organismos são mantidos ou pode ser incluído na sua comida, particularmente onde o agente for um peptídeo solúvel ou uma molécula orgânica pequena.

Onde o agente usado em um método da invenção for um polinucleotídeo que codifica um agente de peptídeo, um agente de anti-sentido, ou 20 similar, células germinativas de um organismo não-humano contendo o polinucleotídeo podem ser selecionadas e organismos transgênicos expressando o agente podem ser produzidos. De preferência, o polinucleotídeo está sob o controle de um elemento de regulagem induzível, de modo que o agente codificado pelo polinucleotídeo pode ser expresso de cada vez e por 25 uma duração conforme desejado. Desse modo, a presente invenção provê organismos não-humanos transgênicos, bem como produtos alimentícios produzidos por esses organismos. Tais produtos alimentícios têm valor nutricional alto por causa do aumento no tecido muscular. Os animais não-humanos transgênicos pode ser de qualquer espécie conforme aqui descrito, 30 incluindo organismos vertebrados tal como gado, porcos, ovelhas, galinha, peru e peixe, e espécie invertebrada tal como camarão, lagosta, caranguejo, lula, ostras e abalone.

A regulagem dos membros da família dos TGF-9 e suas interações específicas com receptores de superfície celular está começando a ser esclarecida. Desse modo, co-expressão do pró-domínio de um membro da família dos TGF-9 com uma região madura de um outro membro da família dos TGF-9 está associada à dimerização intracelular e secreção de homodímeros biologicamente ativos acontece (Gray e outros, *Science* 247:1328, 1990). Por exemplo, uso do pró-domínio BMP-2 com a região madura BMP-4 levou a uma expressão drasticamente aperfeiçoada de BMP-4 maduro (Hammonds e outros (*Mol. Endocrinol.* 5:149, 1991). Para a maior parte dos membros da família que foram estudados, as espécies homodiméricas são biologicamente ativas, enquanto que para outros membros da família tal como as inhibinas (Ling e outros, *Nature* 321:779, 1986) e os TGF-9 (Cheifetz e outros, *Cell* 48:409, 1987), heterodímeros foram também detectados e parecem ter propriedades biológicas diferentes dos respectivos homodímeros.

Estudos de interação de receptor-ligante revelaram uma grande quantidade de informação de como as células respondem a estímulos externos, e levaram ao desenvolvimento de compostos terapeuticamente importantes tal como eritropoietina, os fatores de estimulação de colônia, e PDGF. Desse modo, esforços contínuos têm sido feitos na identificação de receptores que fazem a mediação da ação dos membros da família dos TGF-9. Conforme aqui descrito, a miostatina especificamente interage com um receptor de activina do tipo II. A identificação desta interação provê alvos para identificar antagonistas e agonistas úteis para propósitos terapêuticos agrícolas e humanos, por exemplo, para tratamento de várias condições patológicas tal como obesidade, diabetes do tipo II e caquexia. A identificação desta interação específica também provê um meio para identificar outros receptores de miostatina, bem como os receptores específicos de outros fatores de diferenciação de crescimento. Desse modo, a presente invenção provê receptores de GDF, que especificamente interagem com um GDF ou combinação de GDFs, por exemplo, com miostatina, GDF-11 ou ambos.

Um receptor de GDF da invenção é exemplificado aqui por um receptor de miostatina, particularmente um receptor de activina no tipo II,

que interage especificamente com miostatina e com GDF-11. No entanto, receptores de miostatina que especificamente interagem com miostatina, mas não com GDF-11, também são compreendidos na presente invenção, como são os receptores de GDF-11 que especificamente interagem com 5 GDF-11 mas não com miostatina, e similar. Para conveniência de discussão, os receptores da invenção são referidos aqui geralmente como "receptor de GDF" e são exemplificados por um receptor de miostatina, que é um receptor que especificamente interage pelo menos com miostatina. Desse modo, embora seja feita referência em geral a uma interação específica de miostatina com um receptor de miostatina, será reconhecido que o presente relatório 10 compreende mais amplamente qualquer receptor de GDF, incluindo um receptor de GDF-11, que interage especificamente pelo menos com GDF-11.

Uma linha de célula recombinante que expressa um polipeptídeo de receptor de GDF também é provida, como são os anticorpos que se ligam 15 especificamente ao receptor, polinucleotídeos substancialmente purificados que codificam o receptor, e polipeptídeos de receptor de GDF substancialmente purificados. Porções de peptídeo de um receptor de GDF são também providas, incluindo, por exemplo, domínios extracelulares solúveis de um receptor de GDF tal como um receptor de miostatina, que, conforme aqui 20 descrito, pode alterar a interação específica de miostatina com um receptor de miostatina celular; um domínio de cinase intracelular constitutivamente ativo de um receptor de GDF, que pode induzir, estimular ou de outro modo manter a transdução de sinal de GDF em uma célula; ou outra porção truncada de um receptor de GDF tendo uma habilidade em modular transdução 25 de sinal de miostatina ou outro GDF.

A invenção também provê métodos para identificação de um polipeptídeo de receptor de GDF, incluindo métodos de avaliação de bibliotecas genômicas ou de cDNA, que podem ser bibliotecas de expressa, usando sondas de nucleotídeo ou sondas de anticorpo; métodos de avaliação de 30 células que são responsivas a e, desse modo, expressam o receptor, usando, por exemplo, um GDF tal como miostatina ou uma porção de peptídeo funcional dela; ensaios de dois híbridos, conforme acima descrito, usando,

por exemplo, o peptídeo de GDF como um componente de um híbrido e peptídeo expresso a partir de uma biblioteca de cDNA, que é preparada a partir de células expressando um receptor para GDF, como componentes do segundo híbrido, e similar.

5 Conforme acima descrito, agentes que especificamente interagem com um receptor de GDF, por exemplo, um receptor de miostatina tal como um Act RIIB podem ser identificados usando o receptor para avaliar tais agentes. Por outro lado, um agente que foi identificado como tendo a habilidade em especificamente interagir com um receptor de miostatina tal como o receptor Act RIIB, pode ser usado para avaliar receptores de miostatina adicionais ou outros receptores de GDF. Tal método pode incluir componentes de incubação tal como o agente (ou miostatina ou outro GDF) e uma célula expressando um receptor de GDF, que pode ser um receptor ligado à membrana truncado ou um receptor solúvel, sob condições suficientes para permitir que o agente (ou GDF) interaja especificamente com o receptor; medição do agente (ou GDF) ligado ao receptor; e isolamento do receptor. Um método de modelagem molecular conforme descrito acima pode ser também útil como um método de avaliação para identificação de um receptor de GDF, ou uma porção de peptídeo funcional dele.

10

15

20 Animais transgênicos não-humanos que têm um fenótipo caracterizado por expressão de um receptor de GDF são também providos, o fenótipo sendo conferido por um transgene contido nas células somáticas e germinativas do animal. O transgene compreende um polinucleotídeo codificando o receptor de GDF, por exemplo, receptor de miostatina, polipeptídeo.

25 Métodos de produção de tais animais transgênicos são descritos aqui ou de outra maneira conhecidos na técnica.

30 A presente invenção provê um polinucleotídeo substancialmente purificado codificando todo ou uma porção de peptídeo de um receptor de GDF. Embora um receptor de GDF seja exemplificado aqui por um receptor de activina do tipo II, polinucleotídeos codificando receptores de activina do tipo II foram anteriormente descritos (Patente U.S. No. 5.885.794). Desse modo, deve ser reconhecido que tais receptores de activina do tipo II não

são compreendidos pela presente invenção (Massauge, *supra*, 1998; Heldin e outros, *supra*, 1997). Similarmente, os receptores de activina do tipo II, incluindo Act RIIB; receptores de TGF- β , incluindo TGF- β RI e TGF- β RII; e receptores de BMP, incluindo BMP RIA, BMP RIB e BMP RII, foram descriptos e são bem conhecidos na técnica (Massauge, *supra*, 1998; Heldin e outros, *supra*, 1997) e, desse modo, não são compreendidos nos receptores de GDF da invenção.

Um polinucleotídeo da invenção pode codificar um polipeptídeo tendo uma atividade de receptor de miostatina, por exemplo, atividade de ligação de miostatina, ou pode codificar um receptor de miostatina mutante, por exemplo, um receptor de miostatina mutante tendo uma mutação em um domínio cinase, de modo que o mutante age como um receptor de miostatina negativo dominante (vide acima). Desse modo, um polinucleotídeo da invenção pode ser um polinucleotídeo ocorrência natural, sintético, ou intencionalmente manipulado. Por exemplo, porções da seqüência de mRNA podem ser alteradas devido a padrões de união de RNA alternada ou o uso de promotores alternados para transcrição de RNA. Como um outro exemplo, o polinucleotídeo pode ser submetido à mutagênese direcionada ao sítio. O polinucleotídeo pode também ser seqüência de nucleotídeo de anti-sentido. Polinucleotídeos de receptor de GDF da invenção incluem seqüências que são degeneradas como resultado do código genético. Existem 20 aminoácidos naturais, a maior parte deles são especificados por mais de um códon. Desse modo, todas as seqüências de nucleotídeo degeneradas estão incluídas na invenção, contanto que a seqüência de aminoácido do polipeptídeo do receptor de GDF codificado pelo polinucleotídeo esteja funcionalmente não-modificada. Também incluídas estão seqüências de nucleotídeo que codificam polipeptídeos de receptor de miostatina.

Porções de oligonucleotídeo de um polinucleotídeo codificando um receptor de GDF da invenção também são compreendidas na presente invenção. Tais oligonucleotídeos geralmente são pelo menos de 15 bases de comprimento, que é suficiente para permitir que o oligonucleotídeo hibridize seletivamente para um polinucleotídeo codificando o receptor, e pode ser

pelo menos de cerca de 18 nucleotídeos ou 21 nucleotídeos ou mais de comprimento. Conforme usado aqui, o termo "hibridização seletiva" ou "hibridiza seletivamente" refere-se à hibridização sob condições fisiológicas moderadamente estringentes ou altamente estringentes, que pode distinguir 5 seqüências de nucleotídeo de seqüências de nucleotídeo não-relacionadas.

Em reações de hibridização de ácido nucléico, as condições usadas para se conseguir um nível particular de estringência vai variar, dependendo da natureza dos ácidos nucléicos que estão sendo hibridizados. Por exemplo, o comprimento, o grau de complementariedade, composição 10 da seqüência de nucleotídeo (por exemplo, teor de GC:AT relativo), e tipo de ácido nucléico, isto é, se a seqüência de do oligonucleotídeo ou ácido nucléico alvo é DNA ou RNA, pode ser considerado na seleção das condições de hibridização. Uma consideração adicional é se um dos ácidos nucléico é imobilizado, por exemplo, em um filtro. Métodos para seleção de condições 15 de estringência apropriadas podem ser determinados empiricamente ou estimados usando várias fórmulas, e são bem conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Sambrook e outros, supra, 1989).

Um exemplo de condições de estringência progressivamente superiores é como segue: 2 X SSC/0,1% SDS por volta da temperatura ambiente (condições de hibridização); 2 X SSC/0,1% SDS por volta da temperatura ambiente (condições de baixa estringência); 0,2 X SSC/0,1% SDS por volta de 42º C (condições de estringência moderada); e 0,1 X SSC/0,1% SDS por volta de 68º C (condições de alta estringência). A lavagem pode ser realizada usando apenas uma dessas condições, por exemplo, condições de 25 alta estringência, ou cada uma das condições pode ser usada, por exemplo, por 10 a 15 minutos cada, na ordem listada acima, repetindo alguma ou todas as etapas listadas.

Um polinucleotídeo codificando um receptor de GDF da invenção pode ser obtido através de quaisquer um de vários métodos. Por exemplo, o polinucleotídeo pode ser isolado usando técnicas de hibridização ou baseadas em computador, como são bem conhecidas na técnica. Esses métodos incluem, mas não estão limitados a, 1) hibridização de bibliotecas ge-

nômicas ou de cDNA com sondas para detectar seqüências de nucleotídeo; 2) avaliação de anticorpo de bibliotecas de expressão para detectar fragmentos de DNA clonados com características estruturais compartilhadas; 3) reação de cadeia de polimerase (PCR) em DNA ou cDNA genômico usando

5 iniciadores capazes de anelamento com a seqüência de DNA de interesse; 4) pesquisas por computador de bases de dados de seqüência quanto a seqüências similares (vide acima); 5) avaliação diferencial de uma biblioteca de DNA subtraída; e 6) ensaios de dois híbridos usando, por exemplo, um peptídeo de GDF maduro em um dos híbridos.

10 Em vista do presente relatório de que um receptor de activina especificamente interage com miostatina, sondas de oligonucleotídeo podem ser projetadas com base na seqüência codificando um receptor de activina, por exemplo, uma seqüência codificando o domínio extracelular, que liga miostatina, e usadas para avaliar uma biblioteca preparada de células tal 15 como células musculares ou adipócitos, que são responsivos à miostatina, desse modo facilitando a identificação de um polinucleotídeo codificando um receptor de miostatina. Clones selecionados podem ser ainda mais avaliados, por exemplo, através de subclonagem dos insertos em um vetor de expressão e, seguindo a expressão das seqüências clonadas, avaliação dos 20 polipeptídeos expressos usando miostatina.

Um polinucleotídeo da invenção, por exemplo, um polinucleotídeo codificando um receptor de miostatina, pode ser derivado de uma espécie de vertebrado, incluindo uma espécie de mamífero, ave, ou peixe, ou de espécie de invertebrado. Procedimentos de avaliação que se apóiam na hibridização de ácido nucléico permitem o isolamento de qualquer seqüência de gene de qualquer organismo, contanto que a sonda apropriada esteja disponível. Sondas de oligonucleotídeos que correspondem a uma parte da seqüência codificando a proteína em questão podem ser sintetizadas quimicamente. Isto requer que extensões de oligopeptídeo curtas de seqüência de 25 aminoácido sejam conhecidas. Uma seqüência de polinucleotídeo codificando o receptor pode ser deduzida do código genético, levando em consideração a degeneração do código genético. Desse modo, reações de adição 30

mistas podem ser realizadas quando a seqüência é degenerada. Isto inclui uma mistura heterogênea de DNA de filamento duplo desnaturado. Para tal avaliação, hibridização é de preferência realizada ou no DNA de filamento único ou no DNA de filamento duplo desnaturado. Hibridização é particularmente útil na detecção de clones de cDNA derivados de fontes onde uma quantidade extremamente baixa de seqüências de mRNA com relação ao polipeptídeo de interesse está presente. Desse modo, usando condições de hibridização estringentes direcionadas para evitar ligação não-específica, visualização auto-radiográfica pode ser usada para identificar um clone de cDNA específico através de hibridização do DNA alvo para uma sonda de oligonucleotídeo na mistura que é o complemento completo do ácido nucléico alvo (Wallace e outros, Nucl. Acid. Res. 9:879, 1981, que é aqui incorporado a título de referência). Alternativamente, uma biblioteca de subtração pode ser usada, desse modo eliminando clones de cDNA não-específicos.

Quando a seqüência de aminoácido completa de um polipeptídeo desejado não é conhecida, a síntese direta das seqüências de DNA não é possível e o método de escolha é a síntese de seqüências de cDNA. Dentro os procedimentos padrão para isolamento de seqüências de cDNA de interesse está a formação de bibliotecas de cDNA preparadas em plasmídeos ou fago, onde as bibliotecas são derivadas de transcrição reversa de mRNA que é abundante em células doadoras tendo um alto nível de expressão genética. Quando usada em combinação com tecnologia de reação de cadeia de polimerase, produtos de expressão ainda mais rara podem ser clonados. Onde porções significantes da seqüência de aminoácido do polipeptídeo forem conhecidas, a produção de seqüências de sonda de DNA ou RNA de filamento único ou de filamento duplo rotulado duplicando uma seqüência putativamente presente no cDNA alvo pode ser empregada em procedimentos de hibridização realizados em cópias clonadas do cDNA, que foram desnaturadas em uma forma de filamento único (Jay e outros, Nucl. Acid. Res 11:2325, 1983, que é aqui incorporado a título de referência).

Uma biblioteca de expressão de cDNA, tal como uma biblioteca lâmbda gt11, pode ser avaliada quanto a peptídeos de receptor de GDF u-

sando um anticorpo específico para receptor de GDF, por exemplo, um anticorpo anti-Act RIIB. O anticorpo pode ser policlonal ou monoclonal, e pode ser usado para detectar produto de expressão indicativo da presença de cDNA de receptor de GDF. Tal biblioteca de expressão pode também ser 5 avaliada com um peptídeo de GDF, por exemplo, com miostatina, ou uma porção de peptídeo funcional dele, para identificar um clone codificando pelo menos uma porção de um domínio de ligação de miostatina de um receptor de miostatina.

Polinucleotídeos codificando receptores de GDF mutantes e polipeptídeos de receptor de GDF mutantes são também compreendidos na invenção. Uma alteração em um polinucleotídeo codificando um receptor de GDF pode ser uma mutação intragênica tal como mutação por ponto, mutação sem sentido (STOP), mutação perdida, mutação de sítio de união ou mudança de estrutura, ou pode ser uma deleção heterozigota ou homozigota, e pode ser uma mutação de ocorrência natural ou pode ser construída usando métodos de DNA recombinante, por exemplo. Tais alterações podem 10 ser detectadas usando métodos padrão conhecidos daqueles de habilidade na técnica, incluindo, mas não limitado a, análise de seqüência de nucleotídeo, análise Southern blot, uma análise à base de PCR tal como PCR multiplex ou análise de sítios com seqüência marcada (STS), ou análise de hibridização *in situ*. Polipeptídeos de receptor de GDF podem ser analisados através de SDS-PAGE padrão, análise de imunoprecipitação, análise western blot, ou similar. Receptores de GDF mutantes são exemplificados por receptores de GDF truncados, incluindo um domínio extracelular solúvel, que podem 15 ter a habilidade de especificamente se ligarem a seu GDF cognato, mas não tem o domínio de cinase; um domínio de cinase de receptor de GDF intracelular, que pode exibir atividade de cinase constitutiva; bem como através de receptores de GDF que contêm uma mutação em ponto, que rompe a atividade de cinase do receptor ou a habilidade de ligação de ligante do receptor; e similar. Tais mutantes de receptor de GDF são úteis para modulação 20 de transdução de sinal de GDF e, desse modo, para prática de vários métodos da invenção.

Um polinucleotídeo codificando um receptor de GDF pode ser expresso *in vitro* introduzindo o polinucleotídeo em uma célula hospedeiro adequada. "Células hospedeiro" podem ser quaisquer células onde o vetor particular pode ser propagado, e, onde apropriado, um polinucleotídeo contido no vetor pode ser expresso. O termo "células hospedeiro" inclui qualquer progênie de uma célula hospedeiro original. É entendido que toda a progênie da célula hospedeiro pode não ser idêntica à célula de origem devido, por exemplo, a mutações que acontecem durante a replicação. No entanto, tal progênie está incluída quando o termo "célula hospedeiro" é usado. Métodos de obtenção de uma célula hospedeiro que transientemente ou estavelmente contém um polinucleotídeo da invenção introduzido são bem conhecidos na técnica.

Um polinucleotídeo de receptor de GDF da invenção pode ser inserido em um vetor, que pode ser um vetor de clonagem ou um vetor de expressão recombinante. O termo "vetor de expressão recombinante" refere-se a um plasmídeo, vírus ou outro veículo conhecido na técnica que foi manipulado através de inserção ou incorporação de um polinucleotídeo, particularmente, com relação à presente invenção, um polinucleotídeo codificando todo ou uma porção de peptídeo de um receptor de GDF. Tais vetores de expressão contêm uma seqüência de promoção, que facilita a transcrição eficiente da seqüência genética inserida do hospedeiro. O vetor de expressão geralmente contém uma origem de replicação, um promotor, bem como genes específicos que permitem a seleção fenotípica das células transformadas. Vetores adequados para uso na presente invenção incluem, mas não estão limitados ao, vetor de expressão à base de T7 para expressão em bactéria (Rosenberg e outros, Gene 56:125, 1987), o vetor de expressão pMSXND para expressão em células de mamífero (Lee and Nathans, J. Biol. Chem. 263:3521, 1988) e vetores derivados de baculovírus para expressão em células de inseto. O segmento de DNA pode estar presente no vetor operavelmente ligado a elementos de regulagem, por exemplo, um promotor, que pode ser um promotor T7, promotor I de metalotionina, promotor de poliedrina, ou outro promotor conforme desejado, particularmente promotores

específicos de tecido ou promotores induzíveis.

Uma seqüência de polinucleotídeo codificando um receptor de GDF pode ser expressa ou em procariotas ou em eucariotas. Hospedeiros podem incluir organismos microbianos, levedura, insetos e mamíferos. Métodos de expressão de polinucleotídeos tendo seqüências eucarióticas ou virais em procariotas são bem conhecidos na técnica, como são os vetores de DNA virais e de plasmídeo biologicamente funcionais capazes de expressão de uma replicação em um hospedeiro. Métodos de construção de um vetor de expressão contendo um polinucleotídeo da invenção são bem conhecidos, como são os fatores a serem considerados na seleção de sinais de controle transcripcionais ou de tradução, incluindo, por exemplo, se o polinucleotídeo deve ser expresso de preferência em um tipo de célula em particular ou sob condições particulares (vide, por exemplo, Sambrook e outros, *supra*, 1989).

Uma variedade de sistemas de célula hospedeiro/vetor expressão pode ser utilizada para expressar uma seqüência de codificação de receptor de GDF, incluindo, mas não limitado a, microorganismos tal como bactérias transformadas com vetores de expressão de DNA de bacteriófago recombinante, DNA de plasmídeo ou DNA de cosmídeo; células de levedura transformadas com vetores de expressão de levedura recombinantes; sistemas de célula de planta infectados com vetores de expressão de vírus recombinante tal como vírus mosaico de couve-flor ou vírus mosaico de tabaco, ou transformadas com vetor de expressão de plasmídeo recombinante tal como um plasmídeo Ti; células de inseto infectadas com vetores de expressão de vírus recombinante tal como baculovírus; sistemas de célula animal infectada com vetores de expressão de vírus recombinante tal como vetor de retrovírus, adenovírus ou vírus vaccínia; e sistemas de célula animal transformada geneticamente construída para expressão estável. Onde o receptor de GDF expresso é pós-traducionalmente modificado, por exemplo, através de glicosilação, pode ser particularmente vantajoso selecionar um sistema de célula hospedeiro/vetor de expressão que possa realizar a modificação desejada, por exemplo, um sistema de célula hospedeiro/vetor de

expressão de mamífero.

Dependendo do sistema de célula hospedeiro/vetor utilizado, qualquer número de elementos de transcrição e tradução, incluindo promotores constitutivos e induzíveis, elementos de aumento de transcrição, terminadores de transcrição, e similar pode ser usado no vetor de expressão (Bitter e outros, *Meth. Enzymol.* 153:516-544, 1987). Por exemplo, quando clonando sistemas bacterianos, promotores induzíveis tal como pL do bacteriófago Σ , plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac) e similar podem ser usados. Quando clonando sistemas de célula de mamífero, promotores derivados do genoma de células de mamífero, por exemplo, um promotor de metilotioneína humana ou de camundongo, ou de vírus de mamífero, por exemplo, uma repetição de terminal longo de retrovírus, um promotor final de adenovírus ou um promotor do vírus vaccinia de 7,5 K, podem ser usados. Promotores produzidos através de técnicas de DNA recombinante ou sintéticas podem ser também usados para prover transcrição da seqüência de codificação de receptores de GDF inserida.

Em células de levedura, vários vetores contendo promotores constitutivos ou induzíveis podem ser usados (vide Ausubel e outros, *supra*, 1987, vide capítulo 13; Grant e outros, *Meth. Enzymol.* 153:516-544, 1987; Glover, *DNA Cloning Vol. II* (IRL Press, 1986), vide capítulo 3; Bitter, *Meth. Enzymol.* 152:673-684, 1987; vide também *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces* (Eds., Strathern e outros, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982), Vols. I e II. Um promoter de levedura constitutivo tal como ADH ou LEU2 ou um promotor induzível tal como GAL pode ser usados (Rothstein, *DNA Cloning, Vol. II (supra, 1986)*, capítulo 3). Alternativamente, vetores podem ser usados, os quais promovam a integração de seqüências de DNA estrangeiro no cromossoma da levedura.

Sistemas eucarióticos, particularmente sistemas de expressão de mamífero, permitem modificações de pós-tradução apropriadas de proteínas de mamífero expressas. Células eucarióticas que possuem o mecanismo celular para processamento apropriado do transcrito primário, glicosilação, fosforilação, e vantajosamente, inserção na membrana plasmática do

produto de gene podem ser usadas como células hospedeiro para a expressão de um polipeptídeo de receptor de GDF, ou sua porção de peptídeo funcional.

Sistemas de célula de mamífero que utilizam vírus recombinantes ou elementos virais para guiar expressão podem ser construídos. Por exemplo, quando usando vetores de expressão de adenovírus, a seqüência de codificação de receptores de GDF pode ser ligada a um complexo de controle de transcrição/tradução de adenovírus, por exemplo, o último promotor e a seqüência líder "tripartite". Alternativamente, o promotor do vírus 5 vaccínia de 7,5 K pode ser usado (Mackett e outros, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 79:7415-7419, 1982; Mackett e outros, J. Virol. 49:857-864, 1984; Panicali e outros, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 79:4927-4931, 1982). Particularmente úteis são vetores de vírus papiloma bovino, que podem replicar como elementos extracromossômicos (Sarver e outros, Mol. Cell. Biol., 1:486, 10 15 1981). Um pouco depois da entrada deste DNA nas células do camundongo, o plasmídeo replica para cerca de 100 a 200 cópias por célula. Transcrição do cDNA inserido não requer integração do plasmídeo ao cromossoma da célula hospedeiro, desse modo dando um alto nível de expressão. Esses vetores podem ser usados para expressão estável ao incluir um marcador 20 25 selecionável no plasmídeo, tal como, por exemplo, o gene neo. Alternativamente, o genoma de retrovírus pode ser modificado para uso como um vetor capaz de introduzir e direcionar a expressão do gene de receptores de GDF em células hospedeiro (Cone e Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 81:6349-6353, 1984). Expressão de alto nível pode ser também conseguida usando promotores induzíveis, incluindo, mas não limitado a, promotor de metalotionina IIA e promotores de choque térmico.

Para produção de alto rendimento, a longo prazo, de proteínas recombinantes, expressão estável é preferida. Ao invés de usar vetores de expressão que contêm origens virais de replicação, células hospedeiro podem ser transformadas com o cDNA de receptores de GDF controlado por elementos de controle de expressão apropriados tal como promotor, realçador, seqüências, terminadores de transcrição, e sítios de poliadenilação, e 30

um marcador selecionável. O marcador selecionável no plasmídeo recombinante pode conferir resistência à seleção, e permite que as células integrem estavelmente o plasmídeo nos seus cromossomas e cresçam para formar focos, que, por sua vez, podem ser clonados e expandidos em linhagens de célula. Por exemplo, seguindo a introdução de DNA estrangeiro, células construídas podem ser deixadas crescer por 1 a 2 dias em um meio enriquecido, e então são mudadas para um meio seletivo. Vários sistemas de seleção podem ser usados, incluindo, mas não limitado a, genes de cinase de timidina do vírus simplex do herpes (Wigler e outros, *Cell* 11:223, 1977), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (Szybalska e Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 48:2026, 1982), e adenina fosforibosiltransferase (Lowy e outros, *Cell* 22:817, 1980) podem ser empregados em células tk⁻, hgprt⁻ ou aprt⁻, respectivamente. Também, resistência antimetabólico pode ser usada como a base de seleção para dhfr, que confere resistência a genes de metotrexato (Wigler e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 77:3567, 1980; O'Hare e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 78:1527, 1981); gpt, que confere resistência a ácido micofenólico (Mulligan e Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 78:2072, 1981); neo, que confere resistência a aminoglicosídeo G-418 (Colberre-Garapin e outros, *J. Mol. Biol.* 150:1, 1981); e higro, que confere resistência à higromicina (Santerre e outros, *Gene* 30:147, 1984). Genes selecionáveis adicionais, incluindo trpB, que permite que as células utilizem indol no lugar de triptofano; hisD, que permite que as células utilizem histinol no lugar de histidina (Hartman and Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85:8047, 1988); e ODC (ornitinina descarboxilase) que confere resistência a inibidor de ornitinina descarboxilase, 2-(difluormetil)-DL-ornitinina, DFMO (McConlogue, *Curr. Comm. Mol. Biol.* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987), foram também descritos.

Quando o hospedeiro é um eucariota, tais métodos de transfecção de DNA como co-precipitados de fosfato de cálcio, procedimentos mecânicos convencionais tal como microinjeção, eletroforação, inserção de um plasmídeo inserido em lipossomas, ou vetores de vírus podem ser usados. Células eucariotas podem ser também co-transformadas com seqüências de

DNA codificando os receptores de GDF da invenção, e uma segunda molécula de DNA estrangeiro codificando um fenótipo selecionável, tal como o gene de cinase de timidina simplex do herpes. Um outro método é o uso de um vetor viral eucariótico, tal como vírus símio 40 (SV40) ou vírus papiloma

5 bovino, para transientemente infectar ou transformar células eucarióticas e expressar a proteína. (Gluzman, Eukariotic Viral Vectors (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982)).

A invenção também provê linhagens de célula recombinantes estáveis, cujas células expressam polipeptídeos de receptor de GDF e con-

10 têm DNA que codifica receptores de GDF. Tipos de célula adequados incluem, mas não estão limitados a, células NIH 3T3 (murino), células C2C12, células L6 e células P19. Mioblastos C1C12 e L6 diferenciam espontaneamente na cultura e formam miotubos dependendo das condições de crescimento particulares (Yaffe e Saxel, Nature 270:725-727, 1977; Yaffe, Proc.

15 Natl. Acad. Sci., USA 61:477-483, 1968). P19 é uma linhagem de célula de carcinoma embriônico. Tais células são descritas, por exemplo, no Cell Line Catalog do American Type Culture Collection (ATCC). Essas células podem ser estavelmente transformadas usando métodos bem conhecidos (vide, por exemplo, Ausubel e outros, supra, 1995, vide seções 9.5.1-9.5.6).

20 Um receptor de GDF pode ser expresso a partir de um polinucleotídeo recombinante da invenção usando elementos de regulagem indu-

zíveis ou constitutivos, conforme aqui descrito. A seqüência de codificação de proteína desejada e um promotor operavelmente ligado podem ser introduzidos em uma célula recipiente ou como uma molécula de DNA de não-

25 replicação (ou RNA), que pode ou ser uma molécula linear ou uma molécula circular covalentemente fechada. Expressão da molécula desejada pode a-

contecer devido à expressão transiente da seqüência introduzida, ou o polinucleotídeo pode ser estavelmente mantido na célula, por exemplo, através de integração em um cromossoma da célula hospedeiro, desse modo permi-

30 tindo uma expressão mais permanente. Desse modo, as células podem ser células estavelmente ou transientemente transformadas (transfetadas).

Um exemplo de um vetor que pode ser empregado é um que é

capaz de integrar as seqüências de gene desejadas no cromossoma da célula hospedeiro. Células que têm o DNA introduzido estavelmente integrado em seus cromossomas podem ser selecionadas introduzindo também um ou mais marcadores que permitem a seleção de células hospedeiro que contêm 5 o vetor de expressão. O marcador pode complementar uma auxotrofia no hospedeiro tal como leu2, ou ura3, que são marcadores auxotróficos de levedura comuns; podem conferir uma resistência a biocida, por exemplo, a um antibiótico ou a íons de metal pesado tal como cobre, ou similar. O gene de marcador selecionável pode ou ser diretamente ligado às seqüências de 10 gene de DNA a serem expressas, ou pode ser introduzido na mesma célula através de co-transfecção.

A seqüência introduzida pode ser incorporada a um plasmídeo ou vetor viral capaz de replicação autônoma no hospedeiro recipiente. Qualquer variedade de vetores pode ser empregada para este propósito. Fatores 15 de importância na seleção de um vetor de plasmídeo ou viral particular incluem a facilidade com a qual as células recipientes que contêm o vetor podem ser reconhecidas e selecionadas daquelas células que não contêm o vetor; o número de cópias do vetor desejado em uma célula hospedeiro em particular; e se é desejável ser capaz de "ir e voltar" o vetor entre as células 20 hospedeiros de espécies diferentes.

Para um hospedeiro mamífero, vários sistemas de vetor estão disponíveis para expressão. Uma classe de vetores utiliza elementos de DNA que provêem plasmídeos extra-cromossômicos de replicação autônoma derivados de vírus animais, por exemplo, um vírus papiloma bovino, vírus polioma, adenovírus ou vírus SV40. Uma segunda classe de vetores inclui vetores de expressão do vírus vaccínia. Uma terceira classe de vetores depende da integração das seqüências de gene desejadas ao cromossoma hospedeiro. As células que têm DNA introduzido estavelmente integrado em seus cromossomas podem ser selecionadas também introduzindo um ou 25 mais genes marcadores (conforme acima descrito), que permite a seleção de células hospedeiro que contêm o vetor de expressão. O gene marcador selecionável pode ser diretamente ligado às seqüências de DNA a serem 30

expressa, ou introduzido na mesma célula através de co-transfecção. Elementos adicionais podem ser incluídos para prover síntese ótima de um mRNA ou peptídeo codificado, incluindo, por exemplo, sinais de união, promotores ou realçadores de transcrição, e sinais de terminação de transcrição 5 ou tradução. Vetores de expressão de cDNA incorporando elementos de regulagem apropriados são bem conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Okayama, Mol. Cell. Biol. 3:280, 1983).

Uma vez o vetor ou seqüência de DNA contendo o construto ter sido preparado para expressão, o construto de DNA pode ser introduzido em 10 um hospedeiro apropriado. Vários métodos podem ser usados para introdução do polinucleotídeo em uma célula, incluindo, por exemplo, métodos de transfecção ou transformação tal como fusão de protoplasto, precipitação de fosfato de cálcio, e eletroforação ou outras técnicas convencionais, por exemplo, infecção onde o vetor for um vetor viral.

15 A invenção também provê animais transgênicos, os quais têm células que expressam um receptor de GDF recombinante. Tais animais transgênicos podem ser selecionados para terem teor de gordura menor ou mais massa muscular, ou ambos, e, desse modo, podem ser úteis como uma fonte de produtos alimentícios com teor de músculo e proteína alto, e 20 teor de gordura e colesterol reduzido. Os animais foram alterados cromosomicamente nas suas células germinativas e células somáticas de modo que a produção de um GDF, particularmente miostatina, é mantida em um nível normal, mas o receptor de miostatina é produzido em quantidade reduzidas, ou é completamente rompido, resultando nas células nos animais tendo 25 uma habilidade menor em se ligar à miostatina e, consequentemente, tendo níveis maiores do que o normal de tecido muscular, de preferência sem níveis de gordura ou colesterol maior. Desse modo, a presente invenção também inclui produtos alimentícios providos pelos animais. Tais produtos alimentícios têm valor nutricional maior por causa do aumento no tecido muscular. Os animais não-humanos transgênicos da invenção incluem animais bovinos, porcinos, ovinos e aves, bem como outros vertebrados, e ainda inclui invertebrados transgênicos. 30

A invenção também provê um método de produção de produtos alimentícios animais tendo teor muscular maior. Tal método pode incluir modificação da construção genética das células germinativas de um embrião pró-nuclear do animal, implantando o embrião no oviduto de uma fêmea pseudográvida, desse modo permitindo que o embrião amadureça para progênie de período completo, teste da progênie quanto à presença do transgene para identificar progênie transgene positiva, cruzamento da progênie transgene positiva para se obter mais progênie transgene positiva, e processamento da progênie para se obter um produto alimentício. A modificação da célula germinativa compreende alterar a composição genética de modo a reduzir ou inibir a expressão do gene de ocorrência natural codificando a produção de uma proteína de receptor de miostatina. Por exemplo, o transgene pode compreender uma molécula de anti-sentido que é específica para um polinucleotídeo codificando um receptor de miostatina; pode compreender uma seqüência não-funcional que substitui ou intervém no gene ou transgene de receptor de miostatina endógeno; ou pode codificar um antagonista de receptor de miostatina, por exemplo, um receptor de miostatina negativo dominante tal como um Act RIIB negativo dominante.

Conforme aqui usado, o termo "animal" refere-se a qualquer ave, peixe ou mamífero, exceto um humano, e inclui qualquer estágio de desenvolvimento, incluindo estádios embriônico e fetal. Animais de fazenda tal como porcos, bodes, ovelhas, vacas, cavalos, coelhos e similar; roedores tal como camundongos; e animais domésticos tal como gatos e cachorros são incluídos no significado do termo "animal". Em adição, o termo "organismo" é usado aqui para incluir animais conforme acima descrito, bem como outros eucariotas, incluindo, por exemplo, outros vertebrados tal como répteis e anfíbios, bem como invertebrados conforme acima descrito.

Conforme aqui usado, o termo "transgênico", quando usado em referência a um animal ou um organismo, significa que células do animal ou organismo foram geneticamente manipuladas para conter uma seqüência de polinucleotídeo exógena que é estavelmente mantida com as células. A manipulação pode ser, por exemplo, microinjeção de um polinucleotídeo ou in-

fecção com um vírus recombinante contendo o polinucleotídeo. Desse modo, o termo "transgênico" é usado aqui para ser referir a animais (organismos) onde uma ou mais células receberam um polinucleotídeo recombinante, o qual pode ser integrado a um cromossoma na célula, ou pode ser mantido 5 como um polinucleotídeo de replicação extracromossômica, de modo que pudesse ser construído em um cromossoma artificial de levedura. O termo "animal transgênico" também inclui um animal transgênico "de linha de célula germinativa". Um animal transgênico de linha de célula germinativa é um animal transgênico onde a informação genética foi tomada e incorporada a 10 uma célula de linha germinativa, desse modo conferindo a habilidade em transferir a informação para a prole. Se tal prole de fato possuir alguma ou toda essa informação, a prole também é considerada como sendo animais transgênicos. A invenção compreende ainda organismos transgênicos.

Um organismo transgênico pode ser qualquer organismo cujo 15 genoma foi alterado através de manipulação *in vitro* de um embrião no estágio inicial ou um ovo fertilizado, ou através de qualquer tecnologia transgênica para induzir um nocaute de gene específico. O termo "nocaute de gene" refere-se ao impedimento alvo de um gene em uma célula ou *in vivo* que resulta em perda de funcionamento completa. Um gene alvo em um animal 20 transgênico pode ser tornado não-funcional através de uma inserção alvo no gene a ser tornado não-funcional, por exemplo através de recombinação homóloga, ou através de qualquer outro método para impedimento do funcionamento de um gene em uma célula.

O transgene a ser usado na prática da invenção objeto pode ser 25 uma seqüência de DNA compreendendo uma seqüência de modificação de receptor de GDF modificada. De preferência, o gene de receptor de GDF modificado é um que é impedido através de marcação homóloga nas células tronco embrionicas. Por exemplo, a região C-terminal madura completa do gene de receptores de GDF pode ser deletada (vide Exemplo 13). Opcionalmente, o impedimento (ou deleção) pode ser acompanhado por inserção de ou substituição com um outro polinucleotídeo, por exemplo, uma seqüência de receptor de GDF não-funcional. Um fenótipo "de nocaute" pode ser 30

também conferido através de introdução ou expressão de um polinucleotídeo de receptor de GDF de anti-sentido em uma célula no organismo, ou através de expressão de um anticorpo ou um receptor de GDF negativo dominante nas células. Onde apropriado, polinucleotídeos que codificam proteínas tendo atividade de receptor de GDF, mas que diferem na seqüência de nucleotídeo de uma seqüência de gene de GDF de ocorrência natural devido à degeneração do código genético, podem ser usados aqui, como podem as formas truncadas, variantes alélicas e homólogos interespécie.

A presente invenção também provê anticorpos que se ligam especificamente a um receptor de GDF, e que bloqueiam a ligação de GDF ao receptor. Tais anticorpos podem ser úteis, por exemplo, para alívio de uma condição patológica tal como um distúrbio proliferativo celular associado ao tecido muscular.

Um anticorpo monoclonal que se liga especificamente ao receptor de GDF, particularmente a um receptor de miostatina, pode aumentar o desenvolvimento de músculos esqueléticos. Em modalidades preferidas dos métodos reivindicados, um anticorpo monoclonal de receptor de GDF, polipeptídeo, ou polinucleotídeo é administrado a um paciente sofrendo de uma condição patológica tal como uma doença de enfraquecimento muscular, distúrbio neuromuscular, atrofia muscular, envelhecimento ou similar. O anticorpo de receptor de GDF, particularmente um anticorpo de receptor antimiotatina, pode ser também administrado a um paciente sofrendo de uma condição patológica tal como distrofia muscular, dano ao cordão espinhal, dano traumático, doença pulmonar obstrutiva congestiva (COPD), AIDS ou caquexia.

Em uma modalidade preferida, o anticorpo de receptor antimiotatina é administrado a um paciente com doença ou distúrbio de enfraquecimento muscular através de injeção intravenosa, intramuscular ou subcutânea; de preferência, um anticorpo monoclonal é administrado dentro de uma faixa de dose entre cerca de 0,1 Tg/kg a cerca de 100 mg/kg; com mais preferência entre cerca de 1 Tg/kg a 75 mg/kg; com mais preferência de a partir de cerca de 10 mg/kg a 50 mg/kg. O anticorpo pode ser administrado, por

exemplo, através de injeção de bolus ou através de infusão lenta. Infusa lenta durante um período de 30 minutos a 2 hora é preferida. O anticorpo de receptor antimiotatina, ou outro anticorpo de receptor anti-GDF, pode ser formulado em uma formulação adequada para administração a um paciente.

5 Tais formulações são conhecidas na técnica.

O regime de dosagem será determinado pelo médico acompanhante considerando vários fatores que modificam a ação da proteína de receptor de miostatina, por exemplo, quantidade de tecido que se deseja formar, o sítio do dano do tecido, a condição do tecido danificado, o tamanho 10 de uma ferida, o tipo de tecido danificado, a idade do paciente, sexo e dieta, a gravidade de qualquer infecção, tempo de administração e outros fatores clínicos. A dosagem pode variar com o tipo de matriz usada na reconstituição 15 e os tipos de agente, tal como anticorpos de receptor antimiotatina, a serem usados na composição. Em geral, administração sistêmica ou injetável, tal como injeção intravenosa, intramuscular ou subcutânea. A administração é geralmente iniciada em uma dose que é minimamente eficaz, e a dose é aumentada durante um curso de tempo pré-selecionado até que um efeito positivo seja observado. Subseqüentemente, aumentos graduais na dosagem são feitos limitando tais aumentos graduais a níveis tais que produzem 20 um aumento correspondente no efeito, enquanto levando em consideração quaisquer efeitos prejudiciais que possam aparecer. A adição de outros fatores de crescimento conhecidos, tal como IGF I (fator de crescimento do tipo insulina), hormônio de crescimento humano, bovino ou de galinha, que podem auxiliar a aumentar a massa muscular, à composição final, 25 pode também afetar a dosagem. Na modalidade onde um anticorpo de receptor antimiotatina é administrado, o anticorpo é geralmente administrado dentro de uma faixa de dose de cerca de 0,1 Tg/kg a cerca de 100 mg/kg; com mais preferência, entre cerca de 10 mg/kg a 50 mg/kg.

Conforme usado aqui, o termo "anticorpo" é usado em seu sentido 30 mais amplo para incluir anticorpos policlonais e monoclonais, bem como fragmentos de ligação de antígeno de tais anticorpos. Um anticorpo útil em um método da invenção, ou um seu fragmento de ligação de antígeno, é ca-

racterizado, por exemplo, por ter atividade de ligação específica com um epítopo de um receptor de GDF, por exemplo, um receptor de miostatina. Em adição, conforme acima discutido, um anticorpo da invenção pode ser um anticorpo que se liga especificamente a uma porção de peptídeo de um polipeptídeo de promiostatina, particularmente um pró-domínio de miostatina ou sua porção de peptídeo funcional. Será reconhecido que os métodos que seguem, que exemplificam a preparação e caracterização de anticorpo de receptor de GDF, são ainda aplicáveis à preparação e caracterização de anticorpos adicionais da invenção, incluindo anticorpos que se ligam especificamente a um pró-domínio de miostatina, anticorpos que especificamente se ligam a um polipeptídeo de miostatina e reduzem ou inibem a clivagem proteolítica da promiostatina para miostatina, e similar.

O termo "se liga especificamente" ou "atividade de ligação específica" quando usado em referência a um anticorpo significa que uma interação do anticorpo e um epítopo em particular tem uma constante de dissociação de menos do que cerca de 1×10^{-6} , geralmente pelo menos cerca de 1×10^{-7} , geralmente pelo menos cerca de 1×10^{-8} , e particularmente pelo menos cerca de 1×10^{-9} ou 1×10^{-10} ou menos. Desse modo, fragmentos Fab, F(ab')₂, Fd e Fv de um anticorpo que retém atividade de ligação específica para um epítopo de um receptor de GDF, estão incluídos na definição de um anticorpo. Para propósitos da presente invenção, um anticorpo que reage especificamente com um epítopo de um receptor de miostatina, por exemplo, é considerado para não reagir substancialmente com um receptor de TGF- β ou um receptor de BMP se o anticorpo tiver pelo menos uma afinidade de ligação duas vezes maior, geralmente pelo menos uma afinidade de ligação maior do que cinco vezes, e particularmente pelo menos uma afinidade de ligação maior do que dez vezes com o receptor de miostatina comparado com o receptor TGF- β ou BMP.

O termo "anticorpo" conforme usado aqui inclui anticorpos de ocorrência natural bem como anticorpos de ocorrência não-natural, incluindo, por exemplo, anticorpos de cadeia simples, anticorpos quiméricos, bifuncionais e humanizados, bem como seus fragmentos de ligação de antígeno.

Tais anticorpos de ocorrência não-natural podem ser construídos usando síntese de peptídeo de fase sólida, podem ser produzidos recombinantemente ou podem ser obtidos, por exemplo, através de avaliação de bibliotecas combinatórias consistindo em cadeias pesadas variáveis e cadeias leves

5 variáveis (vide Huse e outros, *Science* 246:1275-1281 (1989), que é aqui incorporado a título de referência). Esses e outros métodos de fabricação, por exemplo, de anticorpos quiméricos, humanizados, enxertados com CDR, de cadeia simples e bifuncionais são bem conhecidos daqueles versados na técnica (Winter e Harris, *Immunol. Today* 14:243:246, 1993; Ward e outros,
10 *Nature* 341:544-546, 1989; Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988); Hilyard e outros, *Protein Engineering: A practical approach* (IRL Press, 1992); Borrabeck, *Antibody Engineering*, 2a ed. (Oxford University Press, 1995); cada um deles aqui incorporado a título de referência).

15 Anticorpos que se ligam especificamente com um receptor de GDF podem ser criados usando o receptor como um imunógeno e removendo anticorpos que reagem cruzado, por exemplo, com um receptor do tipo TGF- β tipo I ou tipo II, com um receptor de activina tal como Act RIB, Act RIIA ou Act RIIB, ou receptores de BMP tal como BMP RII, BMP RIA e BMP RIB (vide Messauge, *supra*, 1998). Um anticorpo da invenção convenientemente pode ser criado usando uma porção de peptídeo de um receptor de miostatina que não está presente em um receptor de TGF- β , activina ou BMP. Similarmente, um anticorpo que se liga especificamente a um pró-domínio de miostatina pode ser criado usando o pró-domínio, ou uma porção
20 de peptídeo funcional dele como o imunógeno. Onde tal peptídeo for não-imunogênico, ele pode ser tornado imunogênico através de acoplamento do hapteno a uma molécula carreadora tal como albumina de soro bovino (BSA) ou hemocianina de límpeto chave (KLH), ou expressando a porção de peptídeo como uma proteína de fusão. Várias outras moléculas carreadoras e
25 métodos para acoplamento de um hapteno a uma molécula carreadora são bem conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Harlow and Lane, *supra*, 1988).

Se desejado, um kit incorporando um anticorpo ou outro agente útil em um método da invenção pode ser preparado. Tal kit pode conter, em adição ao agente, uma composição farmacêutica onde o agente pode ser reconstituído para administração a um indivíduo. O kit pode também conter, 5 por exemplo, reagentes para detecção do anticorpo, ou para detecção de ligação específica do anticorpo a um receptor de GDF. Tais reagentes detec-táveis úteis para rotulagem ou identificação de outra maneira do anticorpo são descritos aqui e conhecidos na técnica.

Métodos para produzir anticorpos policlonais, por exemplo, em 10 um coelho, cabrito, camundongo ou outro mamífero, são bem conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Green e outros, "Production of Polyclonal Antisera", em Immunochemical Protocols (Manson, ed., Humana Press, 1992), páginas 1-5; Coligan e outros, "Production of Polyclonal Antisera in Rabbits, Rats, Mice and Hamsters", em Curr. Protocols Immunol. (1992), seção 2,4,1; 15 cada um deles aqui incorporado a título de referência). Em adição, anticorpos monoclonais podem ser obtidos usando métodos que são bem conhecidos e rotina na técnica (Harlow and Lane, *supra*, 1988). Por exemplo, células do baço de um camundongo imunizado com um receptor de miostatina, ou um seu fragmento epitópico, podem ser fundidas a uma linhagem de célula 20 de mieloma apropriada tal como células de mieloma SP/02 para produzir células de hibridoma. Linhagens de célula de hibridoma clonadas podem ser avaliadas usando antígeno rotulado para identificar clones que secretam anticorpos monoclonais tendo a especificidade apropriada, e hibridomas expressando anticorpos tendo uma especificidade e afinidade desejada podem 25 ser isolados e utilizados como uma fonte contínua de anticorpos. Os anticorpos podem ser ainda avaliados quanto à incapacidade de se ligar especificamente ao receptor de miostatina. Tais anticorpos são úteis, por exemplo, para preparação de kit padronizados para uso clínico. Um fago recombinante que expressa, por exemplo, um anticorpo de receptor antimiotatina de ca- 30 deia única também provê um anticorpo que pode ser usado para preparar kits padronizados.

Métodos de preparação de anticorpos monoclonais bem conhe-

cidos (vide, por exempl, Kohler e Milstein, *Nature* 256:495, 1975, que é aqui incorporado a título de referência; vide também Coligan e outros, *supra*, 1992, vide seções 1.5.1-2.6.7; Harlow and Lane, *supra*, 1988). Em resumo, anticorpos monoclonais podem ser obtidos através de injeção em camundongos de uma composição compreendendo um antígeno, verificação da presença de produção de anticorpo através de remoção de amostra de soro, remoção do baço para se obter linfócitos B, fusão dos linfócitos B com células de mieloma para produzir hibridomas, clonagem dos hibridomas, seleção de clones positivos que produzem anticorpos para o antígeno, e isolamento dos anticorpos das culturas de hibridoma.

Anticorpos monoclonais podem ser isolados a purificados de culturas de hibridoma através de uma variedade de técnicas bem estabelecidas, incluindo, por exemplo, cromatografia de afinidade com Protein-A SE-PHAROSE, cromatografia de exclusão de tamanho e cromatografia de troca de íon (Coligan e outros, *supra*, 1992, vide seções 2.7.1-2.7.12 e seções 2.9.1-2.9.3; vide, também, Barnes e outros, "Purification of Immunoglobulin G (IgG)" em *Meth.: Molec. Biol.* 10:79-104 (Humana Press, 1992), que é aqui incorporado a título de referência). Métodos de multiplicação *in vitro* e *in vivo* de anticorpos monoclonais são bem conhecidos daqueles versados na técnica. Multiplicação *in vitro* pode ser realizada em meios de cultura adequados tal como Meio Eagle Modificado da Dulbecco ou meio RPMI 1640, opcionalmente reabastecido por um soro de mamífero tal como soro bovino fetal ou elementos traço e suplementos de manutenção de crescimento tal como células de exudato peritoneal de camundongo normal, células de baço, macrófago de medula óssea. A produção *in vitro* provê preparações de anticorpo relativamente puras e permite o aumento gradual para dar quantidades grandes dos anticorpos desejados. Cultivo de hibridoma em grande escala pode ser realizado através da cultura de suspensão homogênea em um reator a ar, em um reator de agitação contínua, ou em cultura de célula imobilizada ou presa. Multiplicação *in vivo* pode ser realizada através de injeção de clones de célula em mamíferos histocompatíveis com as células de origem, por exemplo, camundongos singênicos, para causar crescimento de

tumores produtores de anticorpo. Opcionalmente, os animais são preparados com um hidrocarboneto, especialmente óleos tal como pristano (tetrametilpentadecano) antes da injeção. Após uma a três semanas, o anticorpo monoclonal desejado é recuperado do fluido corporal do animal.

5 Aplicações terapêuticas para anticorpos descritos aqui são também parte da presente invenção. Por exemplo, anticorpos da presente invenção podem ser também derivados de anticorpo de primata sub-humano. Técnicas gerais para produzir anticorpos terapeuticamente úteis em babuínos podem ser encontradas, por exemplo, em Goldenberg e outros, Publicação de Patente Internacional WO 91/11465 (1991); e Losman e outros, Int. J. Câncer 46:310, 1990, cada um aqui incorporado a título de referência.

10 Um anticorpo de receptor anti-GDF pode ser também derivado de um anticorpo monoclonal "humanizado". Anticorpos monoclonais humanizados são produzidos através de transferência de regiões de determinação de complementariedade de camundongo de cadeias variáveis leves e pesadas da imunoglobulina do camundongo para um domínio variável humano, e então substituição de resíduos humanos nas regiões de estrutura principal dos equivalentes em murino. O uso de componentes de anticorpo derivados de anticorpos monoclonais humanizados torna óbvio problemas potenciais 15 associados à imunogeneicidade de regiões constantes de murino. Técnicas gerais para clonagem de domínios variáveis de imunoglobulina de murino são conhecidas (vide, por exemplo, Orlandi e outros, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86:3833, 1989, que é aqui incorporado a título de referência em sua totalidade). Técnicas para produção de anticorpos monoclonais humanizados 20 são também conhecidas (vide, por exemplo, Jones e outros, Nature 321:522, 1986; Riechmann e outros, Nature 332:323, 1988; Verhoeyen e outros, Science 239:1534, 1988; Carter e outros, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89:4285, 1992; Sandhu, Crit. Ver. Biotechnol. 12:437, 1992; e Singer e outros, J. Immunol. 150:2844, 1993; cada um deles aqui incorporado a título de 25 referência).

30 Anticorpos da invenção podem ser também derivados de fragmentos de anticorpo humano isolados de uma biblioteca de imunoglobulina

combinatória (vide, por exemplo, Barbas e outros. METHODS: A Companion to Methods in Immunology 2:119, 1991; Winter e outros, Ann. Rev. Immunol. 12:433, 1994; cada um deles aqui incorporado a título de referência). Vetores de clonagem e expressão que são úteis para produzir uma biblioteca de 5 fago de imunoglobulina podem ser obtidos, por exemplo, da STRATAGENE Cloning Systems (La Jolla, CA).

Um anticorpo da invenção pode ser também derivado de um anticorpo monoclonal humano. Tais anticorpos são obtidos de camundongos transgênicos que foram "construídos" para produzir anticorpos humanos específicos em resposta à provocação antigênica. Nessa técnica, elementos 10 dos locais de cadeia pesada e leve humana são introduzidos em raças de camundongos derivados de linhagens de célula tronco embrionárias que contêm impedimentos alvo dos locais de cadeia pesada e leve endógenos. Os camundongos transgênicos podem sintetizar anticorpos humanos específicos 15 para抗ígenos humanos, e os camundongos podem ser usados para produzir hibridomas de secreção de anticorpo humano. Métodos para obtenção 20 de anticorpos humanos a partir de camundongos transgênicos são descritos, por exemplo, por Green e outros, Nature Genet. 7:13, 1994; Lonberg e outros, Nature 368:856, 1994; e Taylor e outros, Int. Immunol. 6:579, 1994, cada um aqui incorporado a título de referência.

Fragmentos de anticorpo da presente invenção podem ser preparados através de hidrólise proteolítica do anticorpo ou através de expressão em *E. coli* de DNA codificando o fragmento. Os fragmentos de anticorpo podem ser obtidos através de digestão de pepsina ou papaína de anticorpo 25 inteiros através de métodos convencionais. Por exemplo, fragmentos de anticorpo podem ser produzidos através de clivagem enzimática de anticorpos com pepsina para prover um fragmento 5S chamado $F(ab')_2$. Este fragmento pode ser ainda clivado usando um agente de redução tiol, e opcionalmente 30 um grupo de bloqueio para os grupos sulfidrila resultantes da clivagem de ligações dissulfeto, para produzir fragmentos monovalentes 3.5S Fab' . Alternativamente, uma clivagem enzimática usando pepsina produz dois fragmentos Fab' monovalentes e um fragmento Fc diretamente (vide, por exem-

5 plo, Goldenberg, Patente U.S. Nº 4.036.945 e Patente U.S. Nº 4.331.647, cada uma aqui incorporada a título de referência, e referências contidas ne-
10 las; Nisonhoff e outros, Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960; Porter, Bio-
chem. J. 73:119, 1959; Edelman e outros, Meth. Enzymol. 1:422 (Academic
15 Press, 1967), cada um deles aqui incorporado a título de referência; vide, também, Coligan e outros, supra, 1992, vide seções 2.8.1-2.8.10 e 2.10.1-
2.10.4).

10 Outros métodos de clivagem de anticorpos, tal como separação de cadeias pesadas para formar fragmentos de cadeia leve/pesada monova-
lentes, clivagem adicional de fragmentos, ou outras técnicas enzimáticas,
15 químicas ou genéticas podem ser também usadas, contanto que os frag-
mentos especificamente se liguem ao antígeno que é reconhecido pelo anti-
corpo intacto. Por exemplo, fragmentos Fv compreendem uma associação
20 de cadeias V_H e V_L . Esta associação pode ser não-covalente (Inbar e outros,
Proc. Natl. Acad. Sci., USA 69:2659, 1972). Alternativamente, as cadeias
variáveis podem ser ligadas por uma ligação dissulfeto intermolecular ou
25 reticuladas através de agentes químicos tal como glutaraldeído (Sandhu,
supra, 1992). De preferência, os fragmentos Fv compreendem cadeias V_H e
 V_L conectadas por um ligante de peptídeo. Essas proteínas de ligação de
30 antígeno de cadeia única (sFv) são preparadas através de construção de um
gene estrutural compreendendo seqüências de DNA codificando domínios
 V_H e V_L conectados por um oligonucleotídeo. O gene estrutural é inserido em
um vetor de expressão, que é subseqüentemente introduzido em uma célula
hospedeiro tal como *E. coli*. As células hospedeiro recombinantes sintetizam
35 uma cadeia de polipeptídeo simples com um peptídeo ligante fazendo uma
ponte entre os dois domínios V. Métodos de produção de sFvs são descritos,
por exemplo, por Whitlow e outros, Methods: A Companion to Methods in
Enzymology 2:97, 1991; Bird e outros, Science 242:423-426, 1988; Ladner e
outros, Patente U.S. Nº 4.946.778; Pack e outros, Bio/Technology 11:1271-
40 1277, 1993; cada um deles aqui incorporado a título de referência; vide tam-
bém Sandhu, supra, 1992.

Uma outra forma de um fragmento de anticorpo é um peptídeo

codificando uma região de determinação de complementariedade única (CDR). Peptídeos de CDR ("unidades de reconhecimento mínimo") podem ser obtidos construindo genes codificando a CDR de um anticorpo de interesse. Tais genes são preparados, por exemplo, usando a reação de cadeia de polimerase para sintetizar a região variável de RNA de células de produção de anticorpo (vide, por exemplo, Larrick e outros, Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106, 1991, que é aqui incorporado a título de referência).

A invenção também provê um método para identificação de um polipeptídeo de receptor de GDF. Tal método pode ser realizado, por exemplo, incubando componentes compreendendo polipeptídeo de GDF e uma célula expressando receptor de comprimento completo ou receptor truncado sob condições suficientes para permitir que o GDF se ligue ao receptor; medição da ligação do polipeptídeo de GDF ao receptor; e isolamento do receptor. O GDF pode ser qualquer um dos GDFs conhecidos (por exemplo, GDF-1-16), e de preferência é GDF-8 (miostatina) ou GDF-11. Métodos de isolamento de receptores são descritos em mais detalhe na seção de Exemplos abaixo. Desse modo, a invenção também provê um receptor de GDF substancialmente purificado, bem como peptídeos e derivados de peptídeo de um receptor de GDF que tem menos resíduos de aminoácido do que um receptor de GDF de ocorrência natural. Tais peptídeos e derivados de peptídeo são úteis como ferramentas de pesquisa e diagnóstico no estudo de doenças de enfraquecimento muscular e no desenvolvimento de agentes terapêuticos mais eficazes.

A invenção ainda provê variantes de receptor de GDF. Conforme aqui usado, o termo "variante de receptor de GDF" significa uma molécula que simula pelo menos parte da estrutura de receptores de GDF. Variantes de receptor de GDF podem ser úteis na redução ou inibição de ligação de GDF, desse modo aliviando uma condição patológica conforme aqui descrito. Exemplos de variantes de receptor de GDF incluem, mas não estão limitados a, receptores de GDF truncados tal como um domínio extracelular solúvel de um receptor de GDF; um receptor de GDF negativo dominante tal

como um receptor Act RIIB negativo dominante, que não tem atividade cina-se; ou outros receptores de GDF truncados ou mutantes.

A invenção refere-se não apenas a peptídeos e derivados de peptídeo de um receptor de GDF de ocorrência natural, mas também a vari-
5 antes de receptor de GDF, incluindo receptores de GDF mutantes, e deriva-
dos quimicamente sintetizados de receptores de GDF que se ligam especifi-
camente a GDF, por exemplo, miostatina. Por exemplo, mudanças na se-
quência de aminoácido de um receptor de GDF são compreendidas pela
presente invenção. Receptores de GDF podem ser alterados mudando o
10 DNA codificando a proteína. De preferência, apenas alterações de aminoá-
cido conservativas são empreendidas, usando aminoácidos que têm as
mesmas propriedades ou propriedades similares. Substituições de aminoá-
cido ilustrativas incluem as mudanças de alanina para serina; arginina para
lisina; asparagina para glutamina ou histidina; aspartato para glutamato; cis-
15 teína para serina; glutamina para asparagina; glutamato para aspartato; gli-
cina para prolina; histidina para asparagina ou glutamina; isoleucina para
leucina ou valina; leucina para valina ou isoleucina; lisina para arginina; glu-
tammina ou glutamato; metionina para leucina ou isoleucina; fenilalanina para
tirosina, leucina ou metionina; serina para treonina; treonina para serina; tript-
20 ofano para tirosina; tirosina para triptofano ou fenilalanina; valina para iso-
leucina ou leucina.

Variantes úteis para a presente invenção compreendem análo-
gos, homólogos, mutéinas e miméticos de um receptor de GDF que retêm a
habilidade em especificamente se ligar aos seus respectivos GDFs. Em uma
25 outra modalidade, receptores de GDF variantes que têm atividade negativa
dominante são também compreendidos, não importando se a variante tam-
bém interage especificamente com seu GDF. Peptídeos dos receptores de
GDF referem-se a porções da seqüência de aminoácido de receptores de
GDF que têm essas habilidades. As variantes podem ser geradas diretamen-
30 te a partir dos próprios receptores de GDF através de modificação química,
através de digestão de enzima proteolítica, ou suas combinações. Adicio-
nalmente, técnicas de engenharia genética, bem como métodos de sintetiza-

ção de polipeptídeos diretamente de resíduos de aminoácido, podem ser empregadas.

Os peptídeos podem ser sintetizados através de métodos comumente usados tal como proteção t-BOC ou Fmoc de grupos alfa-amino.

5 Ambos métodos envolvem síntese em etapas, com o que um aminoácido único é adicionado a cada etapa começando do terminal C do peptídeo (Colligan e outros, Current Protocols in Immunology (Wiley Interscience, 1991), Unidade 9, que é aqui incorporado a título de referência. Os peptídeos da invenção podem também ser sintetizados através de métodos de síntese de 10 peptídeo de fase sólida bem conhecidos (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149, 1962; Stewart and Young, Solid Phase Peptides Synthesis (Freeman, São Francisco, 1969), vide páginas 27-62, cada um deles aqui incorporado a título de referência), usando um copoli(estireno-divinilbenzeno) contendo 0,1-1,0 mM de aminas/g de polímero. No término da síntese química, 15 os peptídeos podem ser desprotegidos e clivados do polímero através de tratamento com HF líquido-anisol a 10% por cerca de ¼-1 hora a 0° C. Após evaporação dos reagentes, os peptídeos são extraídos do polímero com solução de ácido acético a 1% que é então lyophilizada para dar o material bruto. Esta pode ser normalmente purificada através de técnicas tal como filtragem 20 de gel em Sephadex G-15 a 5% usando ácido acético como solvente. A lyofiliação de frações apropriadas da coluna vai dar o peptídeo homogêneo ou derivados de peptídeo, que pode então ser caracterizado por técnicas padrão tal como análise de aminoácido, cromatografia de camada fina, cromatografia líquida de alto desempenho, espectroscopia de absorção ultravioleta, rotação molar, solubilidade, e quantificado através da degradação Edman 25 de fase sólida.

30 Compostos de não-peptídeo que imitam a ligação e o funcionamento de receptores de GDF ("miméticos") podem ser produzidos através da abordagem descrita por Saragovi e outros (Science 253:792-95, 1991, que é aqui incorporado a título de referência). Miméticos são moléculas que imitam elementos de estrutura de proteína secundária (Johnson e outros, "Peptide Turn Mimetics" em Biotechnology and Pharmacy (Pezzuto e outros, Eds.

Chapman and Hall, Nova York, 1993) que é aqui incorporado a título de referência). A idéia base por trás do uso de peptídeo miméticos é que a estrutura principal do peptídeo de proteínas existe principalmente para orientar cadeias laterais de aminoácido de maneira tal a facilitar interações moleculares.

5 Para os propósitos da presente invenção, um mimético apropriado pode ser considerado ser o equivalente de um receptor de GDF.

Peptídeos mais longos podem ser produzidos através da técnica de ligação "química nativa" que ligam os peptídeos juntos (Dawson e outros, Science 266:776, 1994, que é aqui incorporado a título de referência. Varian-

10 tes podem ser criadas através de técnicas recombinantes empregando métodos de clonagem genômicos ou de cDNA. Técnicas de mutagênese específica ou direcionada à região podem ser empregadas (Ausubel e outros, supra, 1989 e 1990 até os suplementos de 1993), vide Volume 1, capítulo 8; Protein Engineering (Oxender and FOx eds., A. Liss, Inc., 1987). Em adição, 15 técnicas de escaneamento de ligante e mediadas por PCR podem ser empregadas para mutagênese (Erlich, PCT Technology (Stockton Press, 1989); Ausubel e outros, supra, 1989 a 1993). Pesquisas de seqüenciamento, estrutura e modelagem de proteína para uso com qualquer uma das técnicas acima são descritas nas referências citadas acima.

20 A presente invenção também provê agentes de ligação de receptor de GDF que bloqueiam a ligação específica de um GDF ao seu receptor. Tais agentes são úteis, pode exemplo, como ferramentas de pesquisa e diagnóstico no estudo de distúrbios de enfraquecimento muscular conforme acima descrito e como agentes terapêuticos eficazes, e podem ser 25 identificados usando os métodos conforme aqui descrito, por exemplo, um método de modelagem molecular. Em adição, composições farmacêuticas compreendendo agentes de ligação de receptor de GDF podem representar agentes terapêuticos eficazes. No contexto da invenção, a frase "agente de ligação de receptor de GDF" descreve um ligante de ocorrência natural de 30 um receptor de GDF, por exemplo, GDF-1 a GDF-16; um ligante sintético de receptores de GDF, ou um derivado apropriado dos ligantes naturais ou sintéticos. A determinação e o isolamento de ligantes são bem conhecidos na

técnica (Lerner, Trends Neurosci. 17:142-146, 1994, que é aqui incorporado a título de referência).

Em ainda uma outra modalidade, a presente invenção refere-se a agentes de ligação de receptor de GDF que interferem com a ligação entre 5 um receptor de GDF e um GDF. Tais agentes de ligação podem interferir através de inibição competitiva, através de inibição não-competitiva ou através de inibição descompetitiva. Interferência com ligação normal entre receptores de GDF e um ou mais GDF pode resultar em um efeito farmacológico útil.

10 A invenção também provê um método para identificação de uma composição que se ligue a um receptor de GDF. O método inclui incubação de componentes compreendendo a composição e um receptor de GDF sob condições suficientes para permitir que os componentes interajam especificamente, e medição da ligação da composição a receptores de GDF. As 15 composições que se ligam a receptores de GDF incluem peptídeos, peptidomiméticos, polipeptídeos, compostos químicos e agentes biológicos conforme descrito acima. A incubação inclui descrição dos reagentes a condições que permitem contato entre a composição de teste e os receptores de GDF, e provêem condições adequadas para uma interação específica como 20 aconteceria *in vivo*. Contato pode ser em solução ou em fase sólida. O ligan- te de teste/composição pode ser opcionalmente uma biblioteca combinatória para avaliação de uma pluralidade de composições, conforme descrito aci- ma. As composições identificadas no método da invenção podem ser ainda 25 avaliadas, detectadas, clonadas, seqüenciadas e similar, ou em solução ou após se ligarem a um apoio sólido, através de qualquer método geralmente aplicado para a detecção de uma seqüência de DNA específica tal como PCR, restrição oligomérica (Saiki e outros, Bio/Technology 3:1008-1012, 1985, que é aqui incorporado a título de referência), análise de sonda de 30 oligonucleotídeo específico de alelo (ASO) (Conner e outros, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 80:278, 1983, que é aqui incorporado a título de referência), ensaios de ligação de oligonucleotídeo (OLAs) (Landergren e outros, Science 241:1077, 1988, que é aqui incorporado a título de referência), e similar

(vide Landergren e outros, *Science* 242:229-237, 1988, que é aqui incorporado a título de referência).

Para determinar se uma composição pode complexar funcionalmente com a proteína do receptor, indução de um gene exógeno pode ser monitorada através de monitoração das mudanças no nível de proteína de uma proteína codificada pelo gene exógeno, ou através de qualquer outro método conforme aqui descrito. Quando uma composição é identificada que pode induzir transcrição do gene exógeno, é concluído que esta composição pode especificamente se ligar à proteína do receptor codificada pelo ácido nucléico codificando a composição de testes de amostra inicial.

Expressão do gene exógeno pode ser monitorada através de um ensaio funcional ou ensaio para um produto de proteína, por exemplo. O gene exógeno é desse modo um gene que provê um produto de expressão que pode ser ensaiado/medido a fim de permitir detecção de expressão do gene exógeno. Tais genes exógenos incluem, mas não estão limitados a, genes receptores tal como gene cloranfenicol acetiltransferase, um gene de fosfatase alcalina, β -galactosidase, um gene de luciferase, um gene de proteína fluorescente verde, guanina xantina fosforribosiltransferase, fosfatase alcalina, e genes de resistência a antibiótico tal como neomicina fosfotransferase (vide acima).

A expressão do gene exógeno é indicativa de uma interação específica de uma composição e um receptor de GDF; desse modo, a composição de ligação ou bloqueio pode ser identificada e isolada. As composições da presente invenção podem ser extraídas e purificadas dos meios de cultura ou uma célula usando técnicas de purificação de proteína conhecidas comumente empregadas, incluindo, por exemplo, extração, precipitação, cromatografia de troca de íon, cromatografia de afinidade, filtragem de gel e similar. Composições podem ser isoladas através de cromatografia de afinidade usando o domínio extracelular de proteína de receptor modificado ligado a uma matriz de coluna ou através de cromatografia de heparina.

Também incluídos no método de avaliação da invenção estão métodos químicos para identificação de compostos químicos que se ligam a

receptores de GDF, conforme acima descrito. Desse modo, o método de avaliação é também útil para identificar variantes, agentes de ligação ou bloqueio, etc, que funcionalmente, se não fisicamente (por exemplo, estericamente), agem como antagonistas ou agonistas, conforme desejado.

5 Os exemplos que seguem pretendem ilustrar mas não limitar a invenção.

EXEMPLO 1

A MIOSTATINA AGE DE UMA MANEIRA DEPENDENTE DA DOSE

Este exemplo mostra que a atividade da miostatina em inibir 10 crescimento muscular é dependente do nível de expressão de miostatina *in vivo*.

A miostatina é um regulador negativo de massa muscular esquelética (McPherron e outros, supra, 1997; McPherron and Lee, supra, 1997).

15 Camundongos com nocaute de miostatina que eram homozigotos para uma deleção do gene de miostatina tiveram um aumento de 25-30% na massa total do corpo. Um exame dos camundongos com nocaute homozigotos revelou que a massa muscular maior era devido a um aumento de cerca de 100-200% na massa muscular esquelética no corpo.

Os camundongos que eram heterozigotos para a mutação de 20 miostatina também tiveram um aumento na massa do corpo total. No entanto, a massa maior dos heterozigotos foi menos do que aquela dos homozigotos e foi estatisticamente significante em apenas um grupo de idade e sexo dentre os muitos examinados. A fim de determinar se os camundongos heterozigotos têm um fenótipo intermediário entre aqueles camundongos do tipo selvagem e os com nocaute de miostatina homozigotos, a análise de pesos musculares foi entendida aos camundongos heterozigotos. Amostras de músculos individuais de camundongos heterozigotos pesavam aproximadamente 25-50% mais do que aqueles de camundongo do tipo selvagem. Esses resultados mostram que os camundongos que são heterozigotos para 25 deleção de um gene de miostatina têm um fenótipo que é intermediário entre aquele dos camundongos de tipo selvagem e camundongos com nocaute de miostatina homozigotos, e mostram que a miostatina produz um efeito de-

pendente da dose *in vivo*.

Esses resultados mostram que a manipulação da atividade da miostatina pode ser útil no tratamento de doenças de enfraquecimento muscular e outros distúrbios metabólicos associados à atividade de miostatina.

5 Ainda, o efeito dependente da dose da miostatina indica que um efeito terapêutico pode ser obtido sem se atingir inibição completa da atividade da miostatina, desse modo, permitindo um ajuste da atividade da miostatina se, por exemplo, um certo nível de atividade produzir efeitos indesejados em um indivíduo.

10 **EXEMPLO 2**

O EFEITO DA MIOSTATINA DIMINUI COM A IDADE EM CAMUNDONGOS EM NOCAUTE

Este exemplo mostra que uma diferença menor no peso do corpo de camundongos do tipo selvagem e camundongos em nocaute de miostatina homozigotos está associada a um declínio no peso muscular dos camundongos mutantes.

15

Os camundongos em nocaute de miostatina pesavam aproximadamente 25-30% mais do que os camundongos do tipo selvagem com cinco meses de vida (McPherron e outros, supra, 1997). No entanto, esta diferença nos pesos do corpo totais se tornou显著mente menor ou desapareceu totalmente conforme os animais envelhecia. A fim de determinar se este efeito era devido a uma perda relativa de peso no camundongo em nocaute devido, por exemplo, à degeneração muscular, ou a um ganho de peso relativamente maior pelos camundongos do tipo selvagem, uma análise 20 detalhada de pesos musculares foi feita como uma função da idade.

25

Em todas as idades examinadas de 2 meses a 17 meses, o músculo peitoral pesava显著mente mais em camundongos mutantes homozigotos do que nos filhotes do tipo selvagem. A diferença mais drástica foi observada em 5 meses, momento quando o peso peitoral era aproximadamente 200% maior nos camundongos mutantes. Embora o peso peitoral declinasse ligeiramente em idades mais avançadas, o peso deste músculo em camundongos mutantes permaneceu maior do que duas vezes aquele

30

dos camundongos do tipo selvagem. Esse mesmo declínio básico foi observado em todos os outros músculos examinados, incluindo o tríceps do braço, o quadríceps, o gastrocnêmio e plantar, e a tibia anterior. Declínios similares foram observados em ambos camundongos macho e fêmea. Esses resultados mostram que a diferença menor nos pesos do corpo totais entre camundongos mutantes e do tipo selvagem observada com o envelhecimento é devido a um ligeiro declínio nos pesos musculares no camundongo mutante.

EXEMPLO 3

A MIOSTATINA AFETA O ACÚMULO DE GORDURA DE UMA MANEIRA

10 DEPENDENTE DA DOSE

Este exemplo mostra que os camundongos com nocaute de miostatina falharam em acumular gordura, e que a diminuição no acúmulo de gordura está associada ao nível de expressão de miostatina *in vivo*.

Uma vez que a diminuição nos pesos musculares em mutantes de miostatina, conforme mostrado no Exemplo 2, não era totalmente responsável pela observação de que os animais do tipo selvagem eventualmente pesavam quase o mesmo que os camundongos mutantes, a quantidade de acúmulo de gordura nos camundongos do tipo selvagem e mutantes foi examinada. As partes inferiores da pata com gordura inguinais, epididimais e retroperitoneais em camundongos machos foram examinadas. Não havia nenhuma diferença nos pesos em nenhuma dessas partes inferiores da pata com gordura entre os camundongos do tipo selvagem e os mutantes em dois meses de vida. Por volta do 3 ao 5 meses de vida, os camundongos do tipo selvagem e com nocaute heterozigotos ambos exibiam uma grande faixa de pesos de parte inferior da pata com gordura, e, em média, os pesos da parte inferior da pata com gordura aumentaram em aproximadamente 3 vezes a 5 vezes quando os animais atingiram 9 a 10 meses de vida. Devido a grande faixa de pesos de parte inferior da pata com gordura observada nesses animais, alguns animais mostraram um aumento muito maior (de até 10 vezes) do que outros.

Em contraste com os camundongos do tipo selvagem e com nocaute heterozigotos, os pesos da parte inferior da pata com gordura de ca-

mundongos mutantes homozigotos estavam em uma faixa relativamente estreita e eram virtualmente idênticos em camundongos de 2 meses de vida e em camundongos de 9 a 10 meses de vida. Desse modo, o acúmulo de gordura maior que aconteceu com envelhecimento nos camundongos do tipo selvagem não foi observado em camundongos com nocaute de miostatina homozigotos. Esta diferença no acúmulo de gordura, junto com o ligeiro declínio nos pesos musculares, como uma função da idade nos camundongos mutantes homozigotos explica completamente a observação de que os animais do tipo selvagem eventualmente têm o mesmo peso de corpo total que os mutantes.

Os pesos da parte inferior da pata com gordura médios de camundongos heterozigotos em nocaute em 9 a 10 meses de vida era intermediário entre aqueles dos camundongos do tipo selvagem e mutantes homozigotos. Embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significante, devido a ampla faixa de pesos de parte inferior da pata com gordura nesses e nos camundongos do tipo selvagem, esses resultados mesmo assim indicam que a miostatina tem um efeito dependente da dose sobre o acúmulo de gordura, similar ao seu efeito sobre o crescimento muscular.

EXEMPLO 4

20 EFEITO DA MIOSTATINA SOBRE O METABOLISMO

Este exemplo mostra que os níveis de insulina e glicose no soro, bem como a atividade metabólica, são afetados pelo nível de expressão de miostatina.

A fim de determinar se a hipertrofia muscular esquelética e a falta de acúmulo de gordura no camundongo mutante de miostatina é devido a um efeito sobre o metabolismo geral, o perfil metabólico dos camundongos mutantes foi examinado. Os níveis de triglicerídeo no soro e de colesterol no soro eram显著mente menores em camundongos mutantes de miostatina comparado com os camundongos de controle do tipo selvagem (Tabela 1). Os níveis de insulina no soro também pareciam ser menores nos camundongos mutantes de miostatina. No entanto, os níveis de glicose fornecida e fixa eram ambos não-distinguíveis entre os camundongos mutantes

homozigotos e camundongos do tipo selvagem (Tabela 1), e ambos grupos de camundongo tinham uma resposta normal em um teste de tolerância à glicose. Os resultados mostram que oscamundongos em nocaute de miostatina homozigotos podem manter níveis normais de glicose no soro mesmo se seu nível de insulina no soro for menor do que aquele dos animais do tipo selvagem.

Tabela 1. PARÂMETROS DE SORO

		+/+	-/-	
	triglicerídeos (mg/dl)	131,5+/-16,5	66,8+/-11,4	P = 0,012
10	colesterol (mg/dl)	138,3+/-8,1	94,5+/-6,8	P = 0,0034
	glicose fornecida (mg/dl)	114,0+/-4,8	119,3+/-5,2	n.s. (p = 0,43)
	glicose fixa (mg/dl)	86,5+/-3,8	103,3+9,3	n.s. (p = 0,13)

+/+ indica camundongos do tipo selvagem; -/- indica camundongos em nocaute homozigotos

15 A fim de determinar se diferenças nas taxas metabólicas poderiam explicar a falta de acúmulo de gordura nos camundongos mutantes, a taxa de consumo de oxigênio dos camundongos do tipo selvagem e mutantes foi comparada usando um calorímetro. Os camundongos mutantes tinham uma taxa metabólica base menor e uma taxa metabólica geral menor
20 do que os camundongos de controle do tipo selvagem. Esses resultados indicam que a falta de acúmulo de gordura nos camundongos mutantes de miostatina não é devido a uma taxa maior de atividade metabólica.

EXEMPLO 5

A MIOSTATINA AFETA O ACÚMULO DE GORDURA EM CAMUNDONGOS

25 GENETICAMENTE OBESOS

Este exemplo mostra que uma falta de expressão de miostatina suprime o acúmulo de gordura em camundongos que são um modelo genético para obesidade.

30 A fim de determinar se a perda de atividade de miostatina poderia suprimir o acúmulo de gordura não apenas em camundongos normais, mas também em camundongos obesos, o efeito da mutação de miostatina em camundongos amarelos letais agouti (A^y), que representam um modelo

genético de obesidade (Yen e outros, FASEB J. 8:479-488, 1994), foi examinado. Os camundongos que eram duplamente heterozigotos para as mutações amarelo letais e de miostatina foram gerados, e a prole dos cruzamentos desses camundongos duplamente heterozigotos foi examinada.

5 O peso do corpo total do camundongo A^y/a, miostatina-/- duplo foi drasticamente reduzido (aproximadamente 9 gramas) comparado com aquele do camundongo A^y/a, miostatina +/+. Esta redução no peso do corpo total foi ainda mais drástica considerando que o mutante A^y/a, miostatina-/- duplo tinha cerca de 2 a 3 vezes mais músculo esquelético do que o camundongo A^y/a, miostatina +/+. O mutante duplo tinha aproximadamente 10 gramas a mais de músculo do que o camundongo A^y/a, miostatina +/+ e, desse modo, a redução do peso total no resto dos tecidos foi de cerca de 19 gramas.

10

15 A redução no peso total do corpo resultou de uma redução no teor de gordura geral. Conforme mostrado na Tabela 2, os pesos das partes inferiores da pata com gordura parametrial e retroperitoneal foram reduzidos 5 vezes a 6 vezes no camundongo A^y/a, miostatina-/- duplo mutante comparado com o A^y/a, miostatina +/+. Esses resultados indicam que a presença de mutação de miostatina suprime drasticamente o acúmulo de gordura na obesidade.

20

25 A presença de mutação de miostatina também afetou drasticamente o metabolismo de glicose. Camundongos Agouti letais sem mutação de miostatina tinham resultados de teste de tolerância de glicose de modo geral anormal, com níveis de glicose no soro muitas vezes atingindo 450 a 600 mg/dl e apenas recuperando lentamente para os níveis de base durante um período de 4 horas. Camundongos letais agouti fêmeas foram afetadas menos do que os camundongos machos, e algumas fêmeas responderam quase que normalmente a esse teste, conforme anteriormente descrito (vide Yen e outros, supra, 1994). Em contraste, embora os camundongos A^y/a, miostatina-/- tivessem testes de tolerância de glicose ligeiramente anormais, nenhum desses animais tinha as anormalidades de um modo geral observadas nos camundongos A^y/a, miostatina +/+.

30

Esses resultados indicam que a mutação de miostatina pelo menos parcialmente supriu o desenvolvimento de metabolismo de glicose anormal nos camundongos letais agouti. Significantemente, camundongos que eram heterozigotos para a mutação de miostatina tinham uma resposta 5 imediata comparado com camundongos de miostatina $+/+$ e miostatina $-/-$, desse modo confirmando o efeito dependente da dose da miostatina.

EXEMPLO 6

PURIFICAÇÃO DE MIOSTATINA RECOMBINANTE

Este exemplo provê um método para preparação e isolamento 10 de miostatina recombinante.

A fim de esclarecer a atividade biológica da miostatina, grandes quantidades de proteína de miostatina foram purificadas para bioensaios. Linhagens de célula de ovário de hamster Chinês (CHO) estáveis produzindo altos níveis de proteína de miostatina foram geradas através de co- 15 amplificação de um cassete de expressão de miostatina com um cassete de diidrofolato redutase usando um esquema de seleção de metotrexato (McPherrom e outros, supra, 1997). A miostatina foi purificada do meio condicionado da linhagem de maior produção através de fracionamento sucessivo em hidroxiapatita, lentil lecitina SEPHAROSE, agarose DEAE e heparina 20 SEPHAROSE. Análise de tingimento de prata revelou que a proteína purificada obtida seguindo essas quatro cromatografias de coluna (referida como "eluato de heparina") consistia em duas espécies com massas moleculares de aproximadamente 35 kilodáltons (kDa) e 12 kDa.

A preparação de proteína purificada foi determinada através de 25 vários critérios para representar um complexo de dois peptídeos de pró-domínio de miostatina e um dímero ligado a dissulfeto de peptídeos de miostatina C-terminal. Primeiro, análise western blot, usando anticorpos produzidos contra porções específicas da seqüência de promiostatina, identificou a faixa de 35 kDa como o pró-domínio e a faixa de 12 kDa como o peptídeo C- 30 terminal maduro. Segundo, sob condições de não-redução, as espécies reagindo com anticorpos direcionados contra o peptídeo C-terminal maduro tinham uma mobilidade eletroforética de acordo com um dímero ligado a dis-

sulfeto. Terceiro, a razão molar do pró-domínio para o peptídeo C-terminal maduro era de aproximadamente 1:1. Quarto, o pró-domínio e o peptídeo C-terminal maduro co-purificados através das quatro etapas de cromatografia de coluna. Finalmente, o peptídeo C-terminal maduro ligado à coluna de len-

5 til lecitina mesmo que a região C-terminal não contenha sinais de glicosilação ligados a N de consenso, indicando que o peptídeo C-terminal maduro se ligou à coluna devido à sua interação com o peptídeo de pró-domínio, que contém um sítio de glicosilação ligado a N potencial.

10 Esses resultados indicam que a miostatina produzida pelas células CHO geneticamente modificadas é secretada em uma forma proteoliticamente processada, e que o pró-domínio e a região C-terminal madura resultantes se associam não-covalentemente para formar um complexo contendo dois peptídeos de pró-domínio e um dímero ligado a dissulfeto de fragmentos proteolíticos C-terminais, similar àquele descrito para TGF- β . No 15 complexo de TGF- β , o dímero C-terminal existe em uma forma inativa, latente (Miyazono e outros, J. Biol. Chem. 263:6407-6415, 1988) e a espécie ativa pode ser liberada deste complexo latente através de tratamento com ácido, agentes caotrópicos, espécies reativas a oxigênio, ou plasmina, ou através de interações com outras proteínas, incluindo trombospondina e integrina $\text{I}\gamma\beta_6$ (Lawrence e outros, Biochem. Biophys. Res. Comm. 133:1026-1034, 1985; Lyons e outros, J. Cell. Biol. 106:1659-1665, 1988; Schultz-Cherry and Murphy-Ullrich, J. Cell. Biol. 122:923-932, 1993; Barcellos-Hoff and Dix, Mol. Endocrinol. 10:1077-1083, 1996; Munger e outros, Cell 96:319-328, 1999).

20 Ainda, a adição de peptídeo de pró-domínio purificado (também conhecido como peptídeo associado à latência ou LAP) ao complexo de TGF- β inibe a atividade biológica do dímero C-terminal purificado *in vitro* e *in vivo* (Gentry and Nash, Biochemistry 29:6851-6857, 1990; Bottinger e outros, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 93:5877-5882, 1996).

25

30 O eluato de heparina, que consistia em um complexo de peptídeo de pró-domínio e C-terminal maduro, foi adicionalmente purificado usando uma coluna de fase reversa de HPLC C4. O dímero C-terminal eluiu da coluna de HPLC mais cedo do que o pró-domínio, desse modo permitindo

o isolamento do dímero C-terminal livre de pró-domínio. Frações que continham a maior parte do pró-domínio foram também obtidas, embora essas frações contivessem quantidades pequenas do dímero C-terminal. Um pouco de proteína estava também presente como complexos de peso molecular mais alto. A natureza dos complexos de peso molecular mais alto é desconhecida, com base em análise western blot na presença ou ausência de agentes de redução, esses complexos podem conter pelo menos um peptídeo de pró-domínio ou um peptídeo de miostatina maduro C-terminal ligado por uma ou mais ligações dissulfeto. Na verdade, a maior parte do peptídeo C-terminal maduro presente na fração de HPLC enriquecida quanto ao pró-peptídeo (frações de HPLC 35-37) estava presente nesses complexos de peso molecular alto. Esses complexos de peso molecular mais alto provavelmente representam proteínas inapropriadamente dobradas que são secretadas pelas células de CHO geneticamente modificadas.

15 **EXEMPLO 7**

A MIOSTATINA ESPECIFICAMENTE INTERAGE COM UM RECEPTOR DE ACTIVINA

Este exemplo mostra que a miostatina especificamente se liga a um receptor de activina do tipo II expresso em células em cultura, e que esta ligação específica é inibida por um pró-domínio de miostatina.

Os receptores para alguns membros da família dos TGF- β foram identificados, e a maior parte são cinases de serina/treonina de alcance de membrana simples (Massague and Weis-Garcia, Câncer Surveys 27:41-64, 1996). Os receptores de activina do tipo II (Act RIIA e/ou Act RIIB), por exemplo, são sabidos se ligar a membros da superfamília dos TGF-B. O fenótipo dos camundongos sem o receptor de Act RIIB mostrou defeitos de padronização axial anterior/posterior e anormalidades nos rins que eram muito similares àqueles observados em camundongos com nocaute de GDF-11 (McPherron e outros, Nat. Genet. 22:260-264, 1999; Oh e Li, Genes Devel. 11:1812-1826, 1997). Uma vez que as seqüências de aminoácido de GDF-11 e miostatina (GDF-8) são 90% idênticas na região de C-terminal madura, a habilidade da miostatina em especificamente interagir com um receptor de

activina do tipo II foi examinada.

A miostatina foi rotulada através de radioiodação, e estudos de ligação foram realizados usando células COS transfectadas com um construto de expressão de Act RIIB. A miostatina interagiu especificamente com as 5 células COS transfectadas. A ligação de miostatina foi competida de uma maneira dependente da dose pelo excesso de miostatina não-rotulada, e foi 10 significantemente menor nas células COS de controle, que foram transfectadas com um vetor vazio. Nenhuma ligação significante aconteceu para as células transfectadas com um construto de expressão de BMP RII ou TGF- β 15 RII. A ligação de miostatina a células transfectadas com Act RIIB era saturável, e a afinidade de ligação era de aproximadamente 5 nM conforme determinado através análise Scatchard.

O ensaio de ligação de receptor também foi usado para examinar a habilidade do pró-domínio de miostatina em inibir a habilidade do dímero C-terminal maduro em interagir especificamente com Act RIIB nesse sistema. A adição de peptídeo de pró-domínio purificado bloqueou a habilidade do dímero C-terminal em se ligar às células COS transfectadas com Act RIIB de uma maneira dependente da dose. Esses resultados indicam 20 que o pró-domínio de miostatina é um inibidor natural de miostatina.

EXEMPLO 8

NÍVEIS DE MIOSTATINA MAIORES INDUZEM PERDA DE PESO

Este exemplo mostra que os níveis elevados de miostatina podem levar a uma perda de peso substancial *in vivo*.

Em um conjunto de experimentos, células CHO que expressavam miostatina foram injetadas em camundongos nus. Os camundongos nus que tinham tumores de célula CHO expressando miostatina mostraram enfraquecimento grave durante aproximadamente 12 a 16 dias seguindo a 25 injeção das células. Esta síndrome de enfraquecimento não foi observada em camundongos nus injetados com qualquer uma de uma variedade de linhagens de CHO de controle que tinham sofrido um processo de seleção similar 30 mais não expressavam miostatina. Ainda, a seqüência de codificação de miostatina no construto usado para transfectar as células CHO estava sob o

controle de um promotor de metalotionina, e a síndrome de enfraquecimento foi exacerbada quando camundongos carregando os tumores expressando miostatina foram mantidos em água contendo sulfato de zinco. Análise western blot revelou altos níveis de proteína de miostatina no soro de camundongos nus que carregavam as células CHO expressando miostatina. Esses resultados indicam que a síndrome de enfraquecimento foi induzida em resposta ao nível elevado de miostatina nos camundongos nus e, conforme discutido abaixo, este resultado foi confirmado observando efeitos similares em camundongos injetados com miostatina purificada.

A perda de peso drástica observada nos camundongos nus carregando células CHO expressando miostatina foi devido principalmente a uma perda desproporcional de ambos gordura e peso muscular. Pesos da parte inferior da pata com gordura branca (gordura branca intra-escapular, uterina e retroperitoneal) foram reduzidos em mais de 90% comparado com camundongos carregando tumores de célula CHO de controle. Os pesos musculares foram também gravemente reduzidos, com músculos individuais pesando aproximadamente quase a metade em camundongos expressando miostatina que em camundongos de controle por volta do dia 16. Esta perda no peso muscular foi refletida por uma diminuição correspondente nos tamanhos de fibra e teor de proteína.

Camundongos carregando os tumores de célula CHO expressando miostatina também se tornaram gravemente hipoglicêmicos. No entanto, a perda de peso e a hipoglicemia não eram devido a uma diferença no consumo de alimento, uma vez que todos os camundongos consumiram quantidades equivalentes de alimento em cada intervalo de tempo examinado durante o curso de 16 dias de tratamento. Esses resultados indicam que a superexpressão de miostatina induz uma perda de peso drástica, o que se assemelha à síndrome de enfraquecimento de caquexia que acontece em pacientes sofrendo de doenças crônicas tal como câncer e AIDS.

Com administrações mais crônicas usando doses de miostatina menores, mudanças no peso de gordura foram observadas. Por exemplo; injeções duas vezes por dia de 1 µg de proteína de miostatina por 7 dias re-

sultaram em uma diminuição de aproximadamente 50% nos pesos de várias partes inferiores de pata com gordura branca diferentes (partes inferiores da pata com gordura branca intrae-scapular, uterina, e retroperitoneal) sem nenhum efeito significante sobre a gordura marrom (marrom intraescapular).

5 Eses resultados confirmam que a miostatina pode induzir perda de peso, e em casos extremos, uma síndrome de enfraquecimento *in vivo*.

EXEMPLO 9

CARACTERIZAÇÃO DE LIGAÇÃO DE MIOSTATINA A UM RECEPTOR DE ACTIVINA

10 Este exemplo descreve um método para caracterização da relação de ligação de miostatina com um receptor de activina com efeitos biológicos produzidos pela miostatina *in vivo*.

Camundongos com nocaute de Act RIIA ou Act RIIB podem ser usados para confirmar que o Act RIIA ou Acr RIIB é um receptor para miostatina *in vivo*. Uma análise muscular detalhada desses camundongos pode determinar se o nocaute de um receptor de activina está associado a uma mudança no número ou tamanho da fibra muscular. Uma vez que mutantes homozigotos duplos Act RIIA/Act RIIB morrem durante a embriogênese (Song e outros, *Devel. Biol.* 213:157-169, 1999), apenas as combinações homozigotas/heterozigotas diferentes podem ser examinadas. No entanto, camundongos específicos de tecido ou de nocaute condicional podem ser gerados de modo que ambos genes podem ser "deletados" apenas no tecido muscular, desse modo permitindo exame pós-natal do camundongo em nocaute homozigoto duplo.

25 O efeito sobre o tecido adiposo pode ser examinado com o envelhecimento dos camundongos para determinar se o número de adipócitos ou o acúmulo de lipídeo por esses adipócitos é alterado nos camundongos em nocaute. O número e o tamanho de adipócito são determinados preparando suspensões celulares a partir de tecido tratado com colagenase (Rodbell, *J. Biol. Chem.* 239:375-380, 1964; Hirsch and Gallian, *J. Lipid Res.* 9:110-119, 1968). O teor de lipídeo total nos animais é determinado medindo pesos de carcaças secas e então os pesos das carcaças secas residuais

após a extração do lipídeo (Folch e outros, *J. Biol. Chem.* 226:497-509, 1957).

Uma variedade de parâmetros de soro pode ser também examinada, incluindo glicose e insulina fornecida e fixa, triglicerídeos, colesterol e leptina. Conforme acima descrito, triglicerídeos no soro e insulina no soro são diminuídos nos animais mutantes de miostatina. A habilidade dos camundongos em nocaute de receptores activina em responder a uma carga de glicose exógena pode ser também examinada usando testes de tolerância de glicose. Conforme acima descrito, a resposta à carga de glicose foi essencialmente idêntica em camundongos mutantes do tipo selvagem e de miostatina em 5 meses de vida. Esta observação pode ser estendida medindo esses parâmetros nos camundongos conforme eles envelhecem. Níveis de insulina no soro podem ser também medidos em vários momentos durante os teste de tolerância de glicose.

Taxas metabólicas de base podem ser também monitoradas usando um calorímetro (Columbus Instruments). Conforme acima descrito, camundongos mutantes de miostatina têm uma taxa metabólica menor em 3 meses de idade do que os seus correspondentes do tipo selvagem. Esta análise pode ser estendida a camundongos mais velhos, e quociente respiratório pode ser também medido nesses animais. A habilidade em manter a termogênese normal pode ser determinada medindo as temperaturas base do corpo bem como a sua habilidade em manter a temperatura do corpo quando postos a 4° C. Pesos de gordura marrom e níveis de expressão de UCP1, UCP2 e UCP3 na gordura marrom, gordura branca, músculo e outros tecidos podem ser também examinados (Schrauwen e outros, 1999).

Ingestão de alimento com relação ao ganho de peso pode ser monitorada, e eficiência de alimentação pode ser calculada. Em adição, o ganho de peso dos animais postos em dietas de gordura alta pode ser monitorado. Camundongos do tipo selvagem mantidos em uma dieta de gordura alta acumulam gordura rapidamente, enquanto que os resultados descritos aqui indicam que os animais mutantes de receptor activina permanecerão relativamente magros.

Os resultados desses estudos podem prover um perfil mais completo do efeito de camundongos de miostatina, particularmente com relação ao seu estado metabólico geral, desse modo provendo compreensão de se a habilidade dos camundongos com nocaute de miostatina em suprimir o acúmulo de gordura é um efeito anabólico da mutação de miostatina no músculo que leva a uma mudança na utilização de energia de modo que pouca energia está disponível para armazenamento na forma de gordura. Por exemplo, o acúmulo de gordura menor pode ser devido a uma taxa maior de termogênese. Esses resultados também proverão uma base para comparação do efeito da atividade de miostatina no contexto de modelos genéticos diferentes de obesidade e diabetes do tipo II.

EXEMPLO 10

CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA MIOSTATINA EM MODELOS GENÉTICOS DE OBESIDADE E DIABETES DO TIPO II

Este exemplo descreve métodos para a determinação do efeito da miostatina no tratamento da obesidade e diabetes do tipo II.

A redução drástica no acúmulo de gordura geral em camundongos mutantes de miostatina comparado com os camundongos do tipo selvagem indica que a atividade da miostatina pode ser manipulada para tratar ou prevenir obesidade ou diabetes do tipo II. O efeito da mutação de miostatina pode ser examinado no contexto de vários modelos de camundongo bem caracterizados dessas doenças metabólicas, incluindo, por exemplo, tipos mutantes de camundongos "obesos" (ob/ob), camundongos "diabéticos" (db/db) e amarelo letal agouti (A^y). Cada um desses tipos é anormal quanto a virtualmente cada parâmetro e teste descrito acima (vide, por exemplo, Yen e outros, supra, 1994, Friedman and Halaas, *Nature* 395:763-770, 1998). A habilidade da mutação de miostatina em deixar lento ou suprimir o desenvolvimento dessas anormalidades em camundongos carregando essas e outras mutações pode ser examinada construindo mutantes duplos, então submetendo os animais mutantes duplos, junto com filhotes de controle apropriados carregando apenas as mutações ob/ob, db/db ou amarelo agouti letal, a vários testes.

Conforme acima descrito, os camundongos Ay de mutação de miostatina foram associados a uma supressão de cerca de 5 vezes de acúmulo de gordura nos camundongos Ay mutantes de miostatina, e com uma supressão parcial do desenvolvimento de metabolismo de glicose anormal

5 conforme avaliado através de testes de tolerância de glicose. Esses resultados podem ser estendidos para incluir animais adicionais em várias idades, e estudos similares podem ser realizados com mutantes ob/ob e db/db. Uma vez que ambas mutações são recessivas, os camundongos que são duplamente homozigotos para a mutação de miostatina e ou a mutação ob ou db

10 podem ser gerados. A fim de examinar os efeitos de perda parcial de funcionamento da miostatina nesses sistemas de modelo genético, os camundongos que são homozigotos para a mutação ob ou db e heterozigotos para a mutação de miostatina são também examinados. Os camundongos que são duplamente heterozigotos para as mutações de miostatina e ob foram gerados, e a prole dos cruzamentos desses camundongos duplamente heterozigotos pode ser examinada, particularmente com relação a acúmulo de gordura e metabolismo de glicose. Supressão parcial de uma ou ambas dessas anormalidades nos mutantes obesos pode indicar que a miostatina é um alvo para o tratamento de obesidade e diabetes do tipo II.

15

20 **EXEMPLO 11**

CARACTERIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS EXPRES-
SANDO POLIPEPTÍDEOS NEGATIVOS DOMINANTES QUE PODEM AFE-
TAR A ATIVIDADE DA MIOSTATINA

Este exemplo descreve métodos para caracterização do efeito

25 da miostatina pós-natalmente através da expressão de polipeptídeos negativos dominantes que podem bloquear a expressão da miostatina ou a transdução de sinal de miostatina.

Inibidores de Miostatina

A modulação da atividade da miostatina pós-natalmente pode

30 ser usada para determinar o efeito da miostatina sobre o número de fibra muscular (hiperplasia) e tamanho da fibra muscular (hipertrofia). Camundongos com nocaute de miostatina condicional, onde o gene da miostatina é

deletado em momentos definidos durante a vida do animal, podem ser usados para esses estudos. O regulador tet em combinação com a recombinase cre provê um sistema para geração de tais camundongos. Nesse sistema, a expressão de cre é induzida pela administração de doxiciclina.

5 Camundongos transgênicos expressando um inibidor de miostatina de um promotor induzível podem ser também gerados de modo que a atividade da miostatina pode ser reduzida ou inibida em momentos definidos durante a vida do animal. Os reguladores de tetraciclina são úteis para geração de tais camundongos transgênicos, onde a expressão da miostatina é
10 induzida pela doxiciclina.

Uma modificação do sistema tet, que utiliza co-expressão de um transativador tet reverso híbrido (fusão da proteína do domínio de ativação de VP16 com o repressor tet reverso mutante) e um transrepressor tet híbrido (fusão da proteína do domínio repressor KRAB de Kox1 de mamífero com
15 o repressor tet nativo), pode ser particularmente útil para produção dos camundongos transgênicos (Rossi e outros, *Nat. Genet.* 20:389-393, 1998; Forster e outros, *Nucl. Acids. Res.* 27:708-710, 1999). Nesse sistema, o transativador tet reverso híbrido se liga a seqüências do operador tet, e ativa a transcrição apenas na presença de tetraciclina; o transrepressor tet híbrido
20 se liga a seqüências de operador tet e reprime a transcrição apenas na ausência de tetraciclina. Através de co-expressão dessas duas proteínas de fusão, a atividade de base do promotor alvo é silenciada pelo transrepressor tet na ausência de tetraciclina, e é ativada pelo transativador tet reverso quando da administração de tetraciclina.

25 Dois tipos de linhagens transgênicas podem ser gerados. No primeiro tipo, o transgene codifica um polipeptídeo inibidor de miostatina sob o controle de um promotor específico muscular, por exemplo, o promotor de cinase de creatinina muscular (Sternberg e outros, supra, 1988) ou o realçador/promotor de cadeia leve de miosina (Donoghue e outros, supra, 1991).
30 Linhagens transgênicas individuais são avaliadas quanto à expressão específica dos reguladores tet no músculo esquelético, e várias linhagens independentes para cada um dos dois promotores são selecionadas e examina-

das para confirmar que quaisquer efeitos observados não são devidos, por exemplo, a efeitos específicos no sítio de integração. Um construto contendo os dois reguladores tet sob o controle do promotor/realçador de cadeia leve de miosina foi construído, e pode ser usado para injeções pró-nucleares. No 5 segundo tipo de linhagem, o transgene contém um polipeptídeo inibidor de miostatina sob o controle de um promotor CMV mínimo que contém ainda seqüências de operador tet.

O inibidor de miostatina pode ser uma forma negativa dominante de miostatina ou um pró-domínio de miostatina, que, conforme aqui descrito, 10 pode inibir a atividade de miostatina. Formas negativas dominantes de membros da família de TGF- β foram descritas (vide, por exemplo, Lopez e outros, Mol. Cell. Biol. 12:1674-1679, 1992; Wittbrodt and Rosa, Genes Dev. 8:1448-1462, 1994), e contêm, por exemplo, um sítio de clivagem proteolítico mutante, desse modo prevenindo a proteína de ser processada em 15 espécies biologicamente ativas. Quando co-expressa em uma célula com o gene do tipo selvagem endógeno, a proteína mutante forma heterodímeros não-funcionais com a proteína do tipo selvagem, desse modo agindo como um dominante negativo. Um polipeptídeo de miostatina mutante contendo uma mutação no sítio de clivagem de promiostatina foi construído, e pode 20 ser examinado quanto a um efeito negativo dominante através de co-expressão do mutante com miostatina do tipo selvagem em razões variantes em 293 células. Meio condicionado de 293 células transilientemente transfectadas com os construtos pode ser examinado através de análise western blot e a habilidade do mutante em bloquear a formação de dímeros C- 25 terminal pode ser examinada.

Um construto de expressão codificando apenas o pró-domínio de miostatina pode ser também utilizado. Conforme acima descrito, o pró-domínio forma um complexo firme com o dímero C-terminal maduro e bloqueia a habilidade do dímero de miostatina C-terminal em se ligar a Act RIIB 30 em células expressando o receptor em cultura. Através de analogia a TGF- β , o pró-domínio de miostatina pode também manter o dímero C-terminal maduro em um complexo latente inativo *in vivo*.

Esses animais transgênicos podem ser cruzados com aqueles expressando os reguladores tet para gerar linhagens duplamente transgênicas contendo ambos reguladores tet e seu construto alvo inibidor. Essas linhagens duplamente transgênicas podem ser avaliada quanto àquelas onde

5 todos dos componentes diferentes são apropriadamente expressos. Análise northern blot usando RNA obtido de vários músculos e tecidos de controle de camundongos representativos em cada linhagem, antes e após administração de doxiciclina na água de beber, pode ser usada para identificar tais linhagens transgênicas. As linhagens transgênicas serão selecionadas que

10 não expressem o transgene em nenhum tecido na ausência de doxiciclina, e que expressem o transgene apenas em músculo e na presença de doxiciclina.

A doxiciclina é administrada ao animal transgênico selecionado e o efeito sobre a massa muscular é examinado. A doxiciclina pode ser administrada a mães grávidas para induzir a expressão do inibidor durante a embriogênese. O efeito de bloqueio da atividade da miostatina durante o desenvolvimento dos animais transgênicos pode ser comparado aos efeitos observados nos camundongos com nocaute de miostatina. Uma vez que os promotores para dirigir a expressão dos reguladores podem ser induzidos

15 em um momento posterior durante o desenvolvimento do que no momento em que a miostatina é primeiro expressa, o efeito sobre a massa muscular nos camundongos transgênicos pode ser comparado ao efeito que acontece nos camundongos com nocaute de miostatina.

O efeito de inibição da atividade da miostatina pós-natalmente

20 pode ser examinado através da administração de doxiciclina aos camundongos duplamente transgênicos em vários momentos após o nascimento. O tratamento com doxiciclina pode começar, por exemplo, na 3^a semana de vida, e os animais podem ser analisados no 5^o mês de vida, que é a idade na qual a diferença nos pesos musculares estava no máximo nos camundongos com nocaute de miostatina versus camundongos do tipo selvagem.

25 Os animais são examinados quanto aos efeitos do inibidor sobre a massa muscular. Os músculos podem ser também examinados histologicamente

para determinar os efeitos sobre o número de fibras e o tamanho da fibra. Em adição, uma análise do tipo de fibra de vários músculos nos camundongos transgênicos pode ser realizada para determinar se há um efeito seletivo sobre as fibras do tipo I ou tipo II.

5 A doxiciclina pode ser administrada em doses diferentes e em momentos diferentes para caracterizar o efeito dos inibidores de miostatina. Camundongos duplamente transgênicos podem ser também mantidos cronicamente em doxiciclina, então examinados quanto aos efeitos sobre os pesos na parte inferior da pata com gordura e outros parâmetros metabólicos
10 relevantes conforme acima descrito. Os resultados desses estudos podem confirmar que a modulação da atividade da miostatina pós-natalmente pode aumentar a massa muscular ou diminuir o acúmulo de gordura, desse modo indicando que a miostatina alvo pode ser útil para o tratamento de uma variedade de doenças de enfraquecimento muscular e metabólicas clinicamente.

15 **Miostatina**

Camundongos transgênicos contendo um transgene de miostatina podem ser também examinados e os efeitos produzidos quando da expressão da miostatina podem ser comparados com aqueles observados nos camundongos nus contendo as células de CHO expressando miostatina.

20 Similarmente conforme acima descrito, a miostatina pode ser posta sob controle de elementos reguladores condicionais (tet) e específicos de tecido, e a expressão da miostatina nos camundongos transgênicos pode ser examinada para determinar se uma síndrome de enfraquecimento acontece similar àquela observada nos camundongos nus. O transgene de miostatina pode
25 incluir, por exemplo, sinais de processamento derivados de SV40, de modo que o transgene pode ser distinguido do gene de miostatina endógeno.

Amostras de soro podem ser isoladas dos camundongos transgênicos de miostatina em vários momentos seguindo a administração de doxiciclina e o nível de produto de transgene de miostatina no soro pode ser
30 determinado. Os pesos do corpo totais dos animais são monitorados com o tempo para determinar se os animais mostram perda de peso significante. Em adição, músculos individuais e partes inferiores da pata com gordura são

isolados e pesados, e o número, tamanho e tipo de fibras musculares são determinados em amostras musculares selecionadas.

O nível de expressão de transgene de miostatina pode ser variado variando a dose de doxiciclina administrada aos animais. A expressão do transgene pode ser monitorada usando, por exemplo, análise northern blot de níveis de RNA do transgene no músculo, ou níveis de proteína de miostatina no soro. A identificação de níveis específicos de expressão de transgene de miostatina permite uma relação do grau de enfraquecimento induzido pela miostatina. As linhagens transgênicas podem ser também cruzadas com os camundongos com nocaute de miostatina para gerar camundongos onde a única fonte de miostatina é expressão a partir do transgene. Expressão de miostatina em vários momentos durante o desenvolvimento pode ser examinada e o efeito da miostatina sobre o número de fibra, tamanho da fibra, e tipo de fibra pode ser determinado. A disponibilidade de camundongos onde a expressão de miostatina pode ser precisamente e rapidamente controlada provê uma ferramenta poderosa para caracterização adicional do curso de transdução de sinal de miostatina e para exame dos efeitos de vários agentes que potencialmente podem ser úteis para modulação da transdução de sinal de miostatina.

20 Efetores de transdução de sinal de miostatina

Camundongos transgênicos contendo quaisquer formas negativas dominantes de um curso de transdução de sinal de miostatina, que pode incluir componentes de um curso de transdução de sinal de TGF- β , que é expresso especificamente no músculo esquelético podem ser gerados. Conforme aqui descrito, as proteínas Smad, que fazem a mediação da transdução de sinal através de um curso induzido pelos receptores activina do tipo II, podem estar envolvidas na transdução de sinal de miostatina.

Act RIIB pode se ligar a GDF-11, que está altamente relacionado com a miostatina (McPherron e outros, supra, 1997; Gamer e outros, supra, 1999; Nakashima e outros, Mech. Devel. 80:185-189, 1999) e expressão de c-ski, que pode se ligar a Smad2, Smad3 e Smad4 de inibição, drasticamente afeta o crescimento muscular (Sutrave e outros, supra, 1990; Berk

e outros, supra, 1997; vide também, Luo e outros, supra, 1999; Stroschein e outros, supra, 1999; Sun e outros, supra, 1999a e b; Akiyoshi e outros, supra, 1999). Conforme aqui descrito, a miostatina interage especificamente com Act RIIB e, desse modo, pode exercer o seu efeito biológico, pelo menos em parte, ligando-se a receptores activina do tipo II *in vivo* e ativando o curso de sinalização de Smad.

O papel do curso de sinalização de Smad na regulagem do crescimento muscular pode ser examinado usando linhagens de camundongo transgênicas que são bloqueadas, ou capazes de ser bloqueadas, em ponto específicos no curso de transdução de sinal de Act RIIB/Smad. O promotor de cinase de creatina muscular ou realçador/promotor de cadeia leve de miosina pode ser usado para dirigir a expressão de vários inibidores do curso de transdução de sinal de Smad.

Um inibidor útil nesse sistema pode incluir, por exemplo, folistatina; um receptor Act RIIB negativo dominante; um polipeptídeo Smad negativo dominante tal como Smad3; c-ski; ou um polipeptídeo de Smad inibidor tal como Smad 7. A folistatina pode se ligar e inibir a atividade de certos membros da família dos TGF- β , incluindo GDF-11 (Gamer e outros, supra, 1999). Formas negativas dominantes de um receptor activina do tipo II podem ser obtidas, por exemplo, através de expressão do domínio extracelular, particularmente uma forma solúvel de um domínio extracelular de Act RIIB, ou expressando um receptor Act RIIB truncado que não tem o domínio cinase ou contém uma mutação de modo que o receptor mutante não tem atividade cinase. A Smad 7 funciona como uma Smad inibidora que pode bloquear o curso de sinalização induzido pela activina, TGF- β , e BMP. Uma forma negativa dominante de Smad 3, por exemplo, pode ser construída mutando os sítios de fosforilação C-terminal da Smad 3, desse modo bloqueando o funcionamento da Smad 3 (Liu e outros, supra, 1997). A superexpressão de c-ski está relacionada à hipertrofia muscular em camundongos transgênicos (Sutrave e outros, 1990).

Camundongos transgênicos podem ser preparados e cada linhagem de criação examinada quanto à expressão apropriada, específica de

músculo, do transgene. Os camundongos selecionados são examinados quando aos pesos do corpo totais, pesos musculares individuais, e tamanhos, números e tipos da fibra muscular. Aquelas linhagens que demonstram um efeito claro sobre a massa muscular podem ser examinadas mais 5 quanto ao acúmulo de gordura e outros parâmetros metabólicos relevantes conforme acima descrito. O uso desses agentes diferentes para marcar etapas específicas no curso de transdução de sinal do receptor activina/Smad é particularmente informativo porque os cursos de sinalização para os agentes diferentes se sobrepõem em etapas diferentes. Por exemplo, a folistatina se 10 liga a e inibe a atividade de activina e GDF-11, mas não de TGF- β , enquanto que uma Smad 3 negativa dominante pode bloquear a sinalização através de ambos receptores activina e TGF- β . Smad 7 pode ter um efeito ainda mais pleiotrópico, porque ela bloqueia a sinalização através dos receptores de BMP também. Os estudos podem permitir a identificação de alvos específicos para modulação da atividade da miostatina, desse modo provendo várias estratégias para desenvolvimento de drogas ou outros agentes que modulem a transdução de sinal de miostatina e, desse modo, a atividade da miostatina.

Em particular, as linhagens transgênicas descritas aqui podem 20 ser usadas para determinar o efeito de bloqueio do funcionamento da miostatina ou do curso de sinalização de Smad pós-natalmente sobre o desenvolvimento de obesidade ou diabetes do tipo II. Por exemplo, os transgenes inibidores podem estar hibridizados nos camundongos mutantes ob/ob, db/db e A y . Na ausência de doxiciclina, um transgene inibidor não é expresso e, 25 desse modo, os animais não são distinguíveis de cada um dos camundongos mutantes de origem. Na presença de doxiciclina, o inibidor é expresso e pode bloquear a atividade da miostatina. O efeito do bloqueio da atividade da miostatina sobre o desenvolvimento das anormalidades metabólicas nesses animais mutantes pode ser examinado.

A expressão do inibidor pode ser induzida em uma idade mais nova, por exemplo, em 3 semanas de idade, para maximizar o efeito. Em adição, a atividade da miostatina pode ser bloqueada antes do momento das

anormalidades metabólicas se tornarem tão graves de modo a serem irreversíveis. Os animais podem ser mantidos em doxiciclina e avaliados em várias idades usando os testes descritos acima, incluindo aqueles relacionados ao acúmulo de gordura e metabolismo de glicose. Qualquer retardo na 5 idade na qual um ou mais resultados de teste se tornam anormais nos animais mutantes ob/ob, db/db e A^y pode ser identificado. Estudos similares podem ser realizados usando animais mais velhos, que desenvolveram alguns dos sinais de obesidade ou diabetes do tipo II, e o efeito do bloqueio da atividade de miostatina sobre vários parâmetros, incluindo peso de gordura e 10 metabolismo de glicose, pode ser determinado. Os resultados desses estudos podem ainda identificar alvos específicos que podem ser manipulados em um esforço em prevenir ou tratar obesidade ou diabetes do tipo II.

EXEMPLO 12

CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DA MIOSTATINA SOBRE A INDUÇÃO DE 15 CAQUEXIA

Este exemplo descreve métodos para a determinação do papel da transdução de sinal de miostatina no desenvolvimento e progressão de caquexia.

O curso do receptor activina e Smad pode constituir pelo menos 20 parte do curso de transdução de sinal envolvido na mediação da atividade da miostatina em indivíduos normais e, desse modo, pode estar envolvido na mediação dos efeitos que acontecem em um indivíduo devido aos níveis excessivos de miostatina. Conforme aqui descrito, caquexia, por exemplo, pode de ser mediada, pelo menos em parte, por níveis anormalmente altos de miostatina. Desse modo, métodos para manipulação de transdução de sinal 25 através do curso de Smad podem prover uma nova estratégia para o desenvolvimento de drogas para o tratamento de fraqueza muscular em geral e caquexia em particular.

O papel do curso de sinalização de Smad na caquexia pode ser 30 examinado através do exame da susceptibilidade de várias linhagens transgênicas descritas acima à caquexia, que pode ser induzida, por exemplo, por interleucina-6 (IL-6; Black e outros, *Endocrinology* 128:2657-259, 1991, que

é aqui incorporado a título de referência), fator-I de necrose de tumor (TNF-I; Ollif e outros, Cell 50:555-563, 1987, que é aqui incorporado a título de referência), ou certas células de tumor. No caso de IL-6 e TNF-I, os transgenes do inibidor podem ser cruzados em uma base de camundongo nu, então os 5 animais podem ser desafiados com células CHO que produzem IL-6 ou TNF-I, que induz fraqueza em camundongos nus quando superexpresso desta maneira. Células CHO que produzem muito IL-6 ou TNF-I podem ser preparadas usando os métodos descritos acima para geração de células com superprodução de miostatina. Por exemplo, cDNA de TNF-I pode ser克隆ado no vetor de expressão pMSXND (Lee e Nathans, J. Biol. Chem. 263:3521-3527, 1988), então as células carregando cópias amplificadas do construto de expressão podem ser selecionadas em etapas em concentrações maiores de metotrexato.

Células de tumor tal como células de carcinoma de pulmão Lewis (Matthys e outros, Eur. J. Cancer 27:182-187, 1991, que é aqui incorporado a título de referência) ou células de adenocarcinoma de colo 26 (Tanaka e outros, J. Cancer Res. 50:2290-2295, 1990, que é aqui incorporado a título de referência), que podem induzir caquexia em camundongos, podem ser também utilizadas para esses estudos. Essas linhagens de célula causam enfraquecimento grave quando crescem como tumores em camundongos. Desse modo, o efeito desses tumores pode ser examinado nos vários camundongos transgênicos descritos aqui. É reconhecido que as várias células de tumor apenas crescerão em certas bases genéticas. Por exemplo, as células de carcinoma de pulmão Lewis são rotineiramente cultivadas em 15 camundongos C57 BL/6, e as células de carcinoma de colo 26 são rotineiramente cultivadas em camundongos BALB/c. Desse modo, os transgenes podem sofrer cruzamento reversível nessas ou outras bases genéticas para permitir crescimento de células de tumor.

Vários parâmetros, incluindo peso do corpo total, peso muscular 30 individual, tamanho e número de fibra muscular, ingestão de alimento e parâmetros de soro, incluindo níveis de glicose, podem ser monitorados. Em adição, níveis de miostatina no soro e níveis de RNA de miostatina no mú-

culo podem ser examinados para confirmar que a expressão de miostatina maior está relacionada com caquexia. Os resultados desses estudos podem confirmar que a ação da miostatina está a jusante dos agentes de indução de caquexia nesses modelos experimentais. Os resultados também confirmam que o curso de sinalização de Smad é essencial para o desenvolvimento de caquexia nesses modelos, e podem mostrar que um benefício terapêutico pode ser obtido no tratamento de caquexia através de modulação do curso de sinal de Smad.

EXEMPLO 13

10 **IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO FATOR-8 (GDF-8) DE DIFERENCIACÃO DE CRESCIMENTO E RECEPTORES DE GDF-11**

Este exemplo descreve métodos para identificação e caracterização de receptores de superfície celular para GDF-8 (miostatina) e GDF-11.

15 As proteínas de GDF-8 e GDF-11 serão usadas principalmente para avaliar as atividades biológicas. A fim de identificar as células alvo potenciais para GDF-8 e GDF-11, células de ação expressando os seus receptores serão procuradas. Para este propósito, a proteína purificada será radio-iodada usando o método T cloramina, que foi usado com sucesso para rotular outros membros desta superfamília, tal como TGF- β (Cheifetz e outros, supra, 1987), activinas (Sugino e outros, J. Biol. Chem. 263:15249-15252, 1988) e BMPs (Paralkar e outros, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 88:3397-3401, 1991), para estudos de ligação de receptor. As formas maduras processadas de GDF-8 e GDF-11 contêm cada uma resíduos de tirosina múltiplos. Duas 20 abordagens diferentes serão tomadas para identificar receptores para essas proteínas.

Uma pesquisa vai determinar o número, afinidade e distribuição dos receptores. Ou células integrais cultivadas em cultura, seções congeladas de embriões ou tecidos maduros, ou frações de membrana totais preparadas a partir de tecidos ou células culturadas serão incubadas com a proteína rotulada, e a quantidade ou distribuição da proteína ligada será determinada. Para experimentos envolvendo linhagens de célula ou membranas, a 30

quantidade de ligação será determinada medindo ou a quantidade de radioatividade ligada a células no disco após várias lavagens ou, no caso de membranas, a quantidade de radioatividade sedimentada com as membranas após centrifugação ou retida com as membranas em um filtro. Para experimentos envolvendo culturas primárias, onde o número de células pode ser mais limitado, sítios de ligação serão visualizados diretamente sobrepondo com emulsão fotográfica. Para experimentos envolvendo seções congeladas, sítios de ligação de ligante serão visualizados expondo essas seções a hiperfilme Beta-max de alta resolução; se localização mais precisa for requerida, as seções serão mergulhadas em emulsão fotográfica. Para todos esses experimentos, ligação específica será determinada adicionando proteína não-rotulada em excesso como competidor (por exemplo, vide Lee and Nathans, supra, 1988).

Uma segunda abordagem será caracterizar o receptor bioquimicamente. Preparações de membrana ou células alvo potenciais cultivadas em cultura serão incubadas com ligando rotulado, e complexos de receptor/ligando serão covalentemente reticulados usando dissuccinimidil suberato, que tem sido comumente usado para identificar receptores para uma variedade de ligandos, incluindo membros da superfamília dos TGF- β (Massague and Like, J. Biol. Chem. 260:2636-2645, 1985). Complexos reticulados são separados através de eletroforese em géis de poliacrilamida SDS para procurar por faixas rotuladas na ausência, mas não na presença, de proteína não-rotulada em excesso. O peso molecular do receptor putativo será estimado subtraindo o peso molecular do ligando. Uma questão importante a qual esses experimentos vão se referir é se GDF-8 e GDF-11 sinalizam através dos receptores do tipo I e tipo II tal como muitos outros membros da superfamília do TGF- β (Massague e Weis-Garcia, supra, 1996).

Uma vez que um método para a detecção de receptores para essas moléculas ter sido conseguido, análise mais detalhada será realizada para determinar as afinidades e especificidades de ligação. Uma análise Scatchard será usada para determinar o número de sítios de ligação e constantes de dissociação. Realizando análises de competição cruzada entre

GDF-8 e GDF-11, será possível determinar se eles são capazes de se ligar ao mesmo receptor e seus parentes. Esses estudos darão uma indicação de se as moléculas sinalizam através dos mesmos receptores ou receptores diferentes. Experimentos de competição usando outros membros da família 5 do TGF- β serão realizados para determinar a especificidade. Alguns desses ligandos estão comercialmente disponíveis, e alguns outros estão disponíveis da Genetic Institute, Inc.

Para esses experimentos, uma variedade de tecidos embrionários e adultos e linhagens de célula será testada. Com base na expressão 10 específica de GDF-8 no músculo esquelético e no fenótipo de camundongos com nocaute de GDF-8, estudos iniciais focam tecido muscular embrionário e adulto para preparação de membrana e para estudos de receptor usando seções congeladas. Em adição, mioblastos serão isolados e culturados a partir de embriões em vários dias de gestação ou células satélite de músculo 15 adulto conforme descrito (Vivarelli e Cossu, *Devel. Biol.* 117:319-325, 1986; Cossu e outros, *Cell Diff.* 9:357-368, 1980). Os estudos de ligação nessas células primárias após vários dias em cultura serão realizados e sítios de ligação localizados através de auto-radiografia de modo que os sítios de ligação podem ser co-localizados com vários marcadores miogênicos, tal como 20 miosina muscular (Vivarelli e outros, *J. Cell Biol.* 107:2191-2197, 1988), e ligação correlacionada com o estado de diferenciação das células, tal como formação de miotubos multinucleados. Em adição a usar células primárias, linhagens de célula serão utilizadas para procurar por receptores. Em particular, o foco inicial será em três linhagens de célula, C1C12, L6 e P19. Mioblastos C2C12 e L6 diferenciam espontaneamente em cultura e formam miotubos dependendo das condições de crescimento particulares (Yaffe and Saxel, supra, 1977; Yaffe, supra, 1968). Células de carcinoma embrionárias 25 P19 podem ser induzidas para diferenciar em vários tipos de célula, incluindo células musculares esqueléticas na presença de DMSO (Rudnicki and McBurney, *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical approach* (E.J. Robertson, IRL Press, Cambridge, 1987). Estudos de ligação de receptor serão realizados nessas linhagens de célula sob várias condições 30

de crescimento e em vários estágios de diferenciação. Embora os estudos iniciais vão ter como foco células musculares, outros tecidos e tipos de célula serão examinados quanto à presença de receptores de GDF-8 e GDF-11.

Homodímero de GDF-8 humano recombinante (RhGDF-8) será usado nesses estudos de ligação. RhGDF-8 foi expresso usando células de CHO e purificado para aproximadamente 90% de pureza. O rhGDF-8 tinha o peso molecular esperado de 25 kDa a 27 kDa e, quando da redução, foi reduzido para o monômero de 12 kDa. Usando GDF-8 rotulado com I-125 em um ensaio de ligação de receptor-ligante, duas linhagens de célula de mioblasto, L6 e G-8, se ligaram a GDF-8. A ligação era específica uma vez que GDF-8 não-rotulado eficazmente competiu para a ligação do ligando rotulado. Esta constante de dissociação (K_d) era de 380 pM, e mioblastos L6 têm um número alto (5.000 receptores/célula) de proteínas de ligação à superfície celular. GDF-11 (BMP-11) é altamente homólogo (>90%) a GDF-8. Estudos de ligação a receptor revelaram que GDF-8 e GDF-11 se ligaram as mesmas proteínas de ligação em mioblastos L6. É importante estabelecer se GDF-8 se liga ou não ao receptor de TGF- β conhecido. TGF- β não competiu para a ligação de GDF-8, indicando que o receptor de GDF-8 é diferente do receptor de TGF- β . O receptor de GDF-8 não foi expresso em todas as linhagens de célula de mioblasto, incluindo quatro linhagens de célula de mioblasto, C2C12, G7, MLB13MYC c14 e BC3H1, que não se liga a GDF-8.

O gene ou genes codificando receptores para GDF-8 e GDF-11 podem ser obtidos. Como uma primeira etapa em direção à compreensão do mecanismo através do qual GDF-8 e GDF-11 exercem os seus efeitos biológicos, é importante clonar os genes que codificam os seus receptores. A partir dos experimentos acima, ficará mais claro se GDF-8 e GDF-11 se ligam ao mesmo receptor ou a receptores diferentes. Também haverá informação considerável com relação à distribuição de tecido de tipo de célula desses receptores. Usando esta informação, duas pesquisas diferentes serão tomadas para clonar os genes de receptor.

A primeira abordagem será usar uma estratégia de clonagem de expressão. Na verdade, esta foi a estratégia que foi originalmente usada por

Mathews and Vale (Cell 65:973-982, 1991) e Lin e outros (Cell 68:775-785, 1992) para clonar os primeiros receptores activina e TGF- β . RNA poli A selecionado do tecido ou tipo de célula que expressa o maior número relativo de sítios de ligação de alta afinidade será obtido, e usado para preparar uma
5 biblioteca de cDNA no vetor de expressão de mamífero pcDNA-1, que contém um promotor CMV e uma origem de replicação de SV40. A biblioteca será posta em placa, e as células de cada placa serão agrupadas em caldo e congeladas. Aliquotas de cada grupo serão cultivadas para preparação de DNA. Cada grupo individual será transilientemente transfetado para células
10 COS em lâminas da câmara, e as células transfetadas serão incubadas com GDF-8 ou GDF-11 iodado. Após lavagem da proteína não-ligada, os sítios de ligação de ligando serão visualizados através de auto-radiografia. Uma vez que um grupo positivo identificado, as células desse grupo serão postas em placa novamente em densidade menor, e o processo será repetido.
15 Grupos positivos serão então postos em placa, e colônias individuais serão postas em grades e novamente analisadas (Wong e outros, Science 228:810-815, 1985).

Inicialmente, usando tamanhos de grupamento de 1500 as colônias serão analisadas. A fim de ser certo de identificar um clone positivo em
20 uma mistura dessa complexidade, um experimento de controle usando TGF- β e um receptor do tipo II clonado será realizado. A seqüência de codificação para o receptor de TGF- β do tipo II será clonada para o vetor pcDNA-1, e as bactérias transformadas com este construto serão misturadas com bactérias da biblioteca da requerente em várias razões, incluindo 1:1500. O DNA preparado a partir desta mistura então será transfetado para células COS, incubado com TGF- β iodado, e visualizado através de auto-radiografia. Se sinais positivos forem observados em uma razão de 1:1500, grupos de 1500 clones serão avaliados. De outro modo, tamanhos de grupos menores correspondendo a razões nas quais o procedimento é sensível o suficiente para
25 identificar um sinal positivo nos experimentos de controle serão usados.
30

Uma segunda estratégia paralela para tentar clonar os receptores de GDF-8 e GDF-11 também será usada, levando vantagem do fato de

que a maior parte dos receptores para os membros da superfamília do TGF- β que foram identificados pertencem à família da cinase serina/treonina de alcance de membrana (Massague and Weis-Garcia, supra, 1996). Devido ao fato dos domínios citoplasmáticos desses receptores estarem relacionados em seqüência, sondas de PCR degenerado serão usadas para clonar membros desta família de receptor que são expressos em tecidos que contêm sítios de ligação para GDF-8 e GDF-11. Na verdade, esta é a abordagem que foi usada para identificar a maior parte dos membros desta família de receptor. A estratégia geral será projetar iniciadores degenerados correspondendo a regiões conservadas dos receptores conhecidos, usar esses iniciadores para PCR em cDNA preparado a partir de amostras de RNA apropriadas (mais provavelmente de músculo esquelético), subclonar os produtos de PCR, e finalmente seqüenciar os subclones individuais. Conforme as seqüências são identificadas, elas serão usadas como sondas de hibridização para eliminar clones em duplicata de análise adicional. Os receptores que são identificados serão então testados quanto à sua habilidade em se ligar a GDF-8 e GDF-11 purificado. Devido ao fato de que esse exame vai dar apenas produtos de PCR pequenos, clones de cDNA de comprimento completo serão obtidos para cada receptor a partir de bibliotecas de cDNA preparadas a partir do tecido apropriado, inseridos no vetor pcDNA-1, transfetados para células COS, e as células transfetadas serão avaliadas quanto à sua habilidade em se ligar a GDF-8 ou GDF-11 iodado. Idealmente, todo receptor que é identificado neste exame será testado quanto à sua habilidade em se ligar a esses ligantes. No entanto, o número de receptores que são identificados pode ser grande, e isolamento de todos os cDNAs de comprimento completo e teste deles pode requerer esforço considerável. É quase certo que alguns dos receptores que são identificados vão corresponder a receptores conhecidos, e para esses, ou obtenção de clones de cDNA de comprimento completo de outros investigadores ou amplificação das seqüências de codificação através de PCR baseado nas seqüências publicadas deve ser direta. Para seqüências novas, a distribuição de tecido será determinada através de análise northern blot e a maior prioridade será dire-

cionada àqueles receptores cujo padrão de expressão se assemelha o mais próximo da distribuição de sítios de ligação de GDF-8 e GDF-11 conforme acima determinado.

Em particular, é conhecido que esses receptores se encaixam
5 em duas classes, tipo I e tipo II, que podem ser distinguidas com base na seqüência e que são ambas requeridas para atividade completa. Certos ligandos não podem se ligar a receptores do tipo I na ausência de receptores do tipo II enquanto outros são capazes de ligação a ambos tipos de receptor (Massauge and Weis-Garcia, supra, 1996). Os experimentos de reticulação
10 mostrados acima devem dar alguma indicação de se ambos receptores do tipo I e tipo II estão também envolvidos na sinalização de GDF-8 e GDF-11. Se estiverem, será importante clonar ambos esses dois subtipos de receptor
15 a fim de entender totalmente como GDF-8 e GDF-11 transmitem os seus sinais. Devido ao fato de que não pode ser previsto se o receptor do tipo I é capaz de interação com GDF-8 e GDF-11 na ausência do receptor do tipo II, receptor(es) do tipo II serão clonados primeiro. Apenas após pelo menos um
20 receptor do tipo II ter sido identificado para esses ligandos, será feita uma tentativa de identificar os receptores do tipo I para GDF-8 e GDF-11. A estratégia geral será co-transfектar o receptor do tipo II com cada um dos receptores do tipo I que são identificados na avaliação de PCR, então testar as células transfetadas através de reticulação. Se o receptor do tipo I for parte
25 do complexo de receptor para GDF-8 e GDF-11, duas espécies de receptor reticulados devem ser detectadas nas células transfetadas, uma correspondendo ao receptor do tipo I e a outra correspondendo ao receptor do tipo II.

A procura por receptores de GDF-8 e GDF-11 é ainda complicada pelo fato de que pelo menos um membro da superfamília dos TGF- β , a saber, GDNF, é capaz de sinalizar através de um tipo completamente diferente de complexo de receptor envolvendo um componente ligado a GPI (GDNFR-alfa) e um receptor de tirosina cinase (c-ret; Trupp e outros, *Nature* 381:785-789, 1996); Durbec e outros, *Nature* 381:789-793, 1996; Treanor e outros, *Nature* 382:80-83, 1996; Jing e outros, *Cell* 85:1113-1124, 1996).

Embora GDNF seja o membro mais distamente relacionado da superfamília dos TGF- β , é certamente possível que outros membros da família do TGF- β possam também sinalizar através de um sistema de receptor análogo. Se GDF-8 e GDF-11 realmente sinalizam através de um complexo de receptor similar, a abordagem de avaliação de expressão deve ser capaz de identificar pelo menos o componente ligado a GPI (na verdade GDNFR-alfa foi identificado usando uma abordagem de avaliação de expressão) deste complexo. No caso de GDNF, os fenótipos similares de camundongos deficientes em GDNF e c-ret sugerem c-ret como um receptor potencial para GDNF.

EXEMPLO 14

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM NOCAUTE DE GDF-11

O fenótipo de camundongos com nocaute de GDF-11 em vários aspectos se assemelha ao fenótipo de camundongos carregando uma deleção de um receptor para alguns membros da superfamília do TGF- β , incluindo o receptor activina do tipo IIB (Act RIIB). Para determinar a função biológica do GDF-11, o gene de GDF-11 foi impedido através de marcação homóloga em células tronco embriônicas.

Uma biblioteca genômica 129 SvJ de murino foi preparada em FIXII lâmbda de acordo com as instruções fornecidas pela Stratagene (La Jolla, CA). A estrutura do gene de GDF-11 foi deduzida a partir do mapeamento de restrição e seqüenciamento parcial dos clones de fago isolados da biblioteca. Vetores para preparação do construto alvo foram gentilmente fornecidos pela Philip Soriano e Kirk Thomas. Para assegurar que os camundongos resultantes seriam nulos para funcionamento do GDF-11, a região C-terminal madura inteira foi deletada e substituída por um neo cassete. Células R1 ES foram transfectadas com o construto alvo, selecionadas com ganciclovir (2 TM) e G418 (250 Tg/ml) e analisadas através de análise Southern blot.

Marcação homóloga do gene GDF-11 foi observada em clones de célula ES duplamente resistentes 8/155 ganciclovir/G418. Seguindo a

injeção de vários clones marcados em blastócitos C57BL/6J, quimeras foram obtidas de um clone de ES que produziu filhotes heterozigotos quando cruzado com ambas fêmeas C57BL/6J e 129/SvJ. Cruzamentos de heterozigotos F1 híbridos C57BL/6J/129/SvJ produziram prole com 49 do tipo selvagem (34%), 94 heterozigotos (66%) e nenhum adulto mutante heterozigoto. 5 Similarmente, não havia quaisquer animais nulos homozigotos adultos vistos na base de 129/SvJ (32 animais do tipo selvagem (36%) e 56 mutantes heterozigotos).

Para determinar a idade na qual os mutantes homozigotos estavam morrendo, ninhadas de embriões isolados em vários estágios de gestação de fêmeas heterozigotas que tinham sido cruzadas com machos heterozigotos tiveram o genótipo identificado. Em todos os estágios embrionários examinados, embriões mutantes homozigotos estavam presentes aproximadamente na freqüência prevista de 25%. Dentre os camundongos recém-nascidos híbridos, os genótipos diferentes foram também representados na razão Mendeliana esperada de 1:2:1 (34 +/+ (28%), 61 +/- (50%) e 28 -/- (923%). Camundongos mutantes homozigotos nasceram vivos e eram capazes de respirar e mamar. Todos os mutantes homozigotos morreram, no entanto, dentro de 24 horas após o nascimento. A causa precisa da morte era desconhecida, mas a letalidade pode ter estado relacionada ao fato de que os rins em mutantes homozigotos eram ou gravemente hipoplásticos ou completamente ausentes. 10 15 20 25

Animais mutantes homozigotos eram facilmente reconhecíveis pelos seus rabos gravemente encurtados ou ausentes. Para caracterizar mais os defeitos no rabo nesses animais mutantes homozigotos, seus esqueletos foram examinados para determinar o grau de rompimento da vértebra caudal. Uma comparação das preparações de esqueleto de tipo selvagem e mutante dos embriões do último estágio e camundongos recém-nascidos, no entanto, revelou diferenças não apenas na região da cauda dos animais, mas também em muitas outras regiões também. Em quase todos os casos onde diferenças foram notadas, as anormalidades pareciam representar transformações homeóticas de segmentos vertebrais onde segmentos 30

particulares pareciam ter uma morfologia típica de mais segmentos anteriores. Essas transformações eram evidentes através do esqueleto axial se estendendo da região cervical para a região da cauda. Exceto pelos defeitos vistos no esqueleto axial, o resto do esqueleto, tal como o crânio e ossos 5 dos membros, pareciam normais.

Transformações anteriores das vértebras em animais mutantes recém-nascidos eram mais imediatamente aparentes na região torácica, onde houve um aumento drástico no número de segmentos torácicos (T). Todos os camundongos do tipo selvagem examinados mostraram o padrão 10 típico de 13 vértebras torácicas cada uma com seu par de costelas associado. Em contraste, camundongos homozigotos mutantes mostraram um aumento surpreendente no número de vértebras torácicas. Todos os mutantes homozigotos tinham 4 a 5 pares extras de costelas para um total de 17 a 18, embora em mais de 1/3 desses animais, a 18^a costela parecesse ser 15 rudimentar. Desse modo, segmentos que normalmente corresponderiam aos segmentos lombares (L) L1 a L4 ou L5 pareciam ter sido transformados em segmentos torácicos em animais mutantes.

Além disso, transformações dentro da região torácica onde uma vértebra torácica tinha uma característica de morfologia de uma outra vértebra torácica eram também evidentes. Por exemplo, em camundongos do tipo selvagem, os primeiros 7 pares de costelas se ligam ao esterno, e os 6 restantes são não ligados ou livres. Em mutantes homozigotos, houve um aumento no número de ambos pares ligados e livres de costelas para 10-11 e 7-8, respectivamente. Desse modo, os segmentos torácicos T8, T9, T10 e 25 em alguns casos até mesmo T11, os quais têm todos costelas livres em animais do tipo selvagem, foram transformados em animais mutantes para ter uma característica típica de mais segmentos torácicos anteriores, a saber, a presença de costelas ligadas ao esterno. De acordo com esta constatação, o processo espinhoso transicional e os processos articulares transicionais que 30 são normalmente encontrados em T10 nos animais do tipo selvagem foram encontrados ao invés disso em T13 em mutantes homozigotos. Transformações adicionais dentro da região torácica foram também notadas em certos

animais mutantes. Por exemplo, em camundongos do tipo selvagem, as costelas derivadas de T1 normalmente tocam o topo do esterno. No entanto, em 2/23 de camundongos híbridos e 2/3 de mutantes homozigotos 129/SvJ examinados, T2 pareceu ter sido transformado para ter uma morfologia que 5 lembra aquela de T1; isto é, nesses animais, as costelas derivadas de T2 se estendiam para tocar o topo do esterno. Nesses casos, as costelas derivadas de T1 pareciam se fundir ao segundo par de costelas. Finalmente, em 10 82% dos mutantes homozigotos, o processo espinhoso longo normalmente presente em T2 foi mudado para a posição de T3. Em certos outros mutantes homozigotos, fusão assimétrica de um par de costelas vertebroesternal foi vista em outros níveis toráxicos.

As transformações anteriores não foram restritas à região toráxica. A maior transformação anterior observada foi no nível da 6^a vértebra cervical (C6). Nos camundongos do tipo selvagem, C6 é imediatamente identificável pela presença de dois tubérculos anteriores no lado ventral. Em vários camundongos mutantes homozigotos, embora um desses dois tubérculos anteriores estivesse presente em C6, o outro estava presente na posição C7 em vez disso. Desse modo, nesses camundongos, C7 parecia ter sido parcialmente transformado para ter uma morfologia que se assemelha àquela de 15 C6. Um outro mutante homozigoto tinha 2 tubérculos anteriores em C7, mas reteve um em C6 para uma transformação completa de C7 para C6 mas uma transformação parcial de C6 para C5. Transformações do esqueleto axial também se estendendo para a região lombar. Enquanto que os animais do tipo selvagem normalmente têm apenas 6 vértebras lombares, mutantes 20 homozigotos tinham 8 a 9. Pelo menos 6 das vértebras lombares nos mutantes devem ter sido derivadas de segmentos que teriam normalmente dado origem às vértebras sacral e caudal uma vez que os dados descritos acima sugerem 4 a 5 segmentos lombares foram transformados em segmentos toráxicos. Desse modo, camundongos homozigotos mutantes tinham um 25 total de 33-34 vértebras pré-sacral comparado com 26 vértebras pré-sacral normalmente presentes em camundongos do tipo selvagem. Os padrões de vértebra pré-sacral mais comuns eram C7/T18/L8 e C7/T18/L9 para camun-

dongos mutantes comparado com C7/T13/L6 para camundongos do tipo selvagem. A presença de vértebras pré-sacrais adicionais em animais mutantes era óbvia mesmo sem exame detalhado dos esqueletos uma vez que a posição dos membros posteriores com relação aos membros anteriores estava

5 deslocada posteriormente em 7 a 8 segmentos.

Embora as vértebras sacral e caudal tenham sido também afe-
tadas nos camundongos mutantes homozigotos, a natureza exata de cada
transformação não era como prontamente identificável. Nos camundongos
do tipo selvagem, os segmentos sacrais S1 e S2 tipicamente têm processos
10 transversais amplos comparado com S3 e S4. Nos mutantes, lá não pareceu
ser uma vértebra S1 ou S2 identificável. Pelo contrário, animais mutantes
tinham várias vértebras que pareciam ter morfologia similar a S3. Em adição,
os processos transversos de todas as 4 vértebras sacrais são normalmente
fundidos um ao outro embora em recém-nascidos muitas vezes apenas fu-
15 sões das primeiras 3 vértebras sejam vistas. Em mutantes homozigotos, no
entanto, os processos transversos das vértebras sacrais eram geralmente
não fundidos. Na maior parte da região caudal, todos os animais mutantes
também tinham vértebras gravemente mal formadas com fusões extensas
de cartilagem. Embora a gravidade das fusões torne difícil contar o número
20 total de vértebras na região caudal, até 15 processos transversos foram con-
tados em vários animais. Não podia ser determinado se essas representa-
vam vértebras sacrais ou caudais nos mutantes porque critérios morfológi-
cos para distinguir S4 de vértebras caudais mesmo em animais recém-
nascidos do tipo selvagem não puderam ser estabelecidos. Não importando
25 as suas identidades, o número total de vértebras nesta região foi significa-
tivamente reduzido do número normal de aproximadamente 30. Desse modo,
embora os mutantes tivessem显著mente mais vértebras toráxicas e
lombares do que os camundongos do tipo selvagem, o número total de seg-
mentos foi reduzido nos mutantes devido ao truncamento dos rabos.

30 Camundongos heterozigotos também mostraram anormalidades
no esqueleto axial embora o fenótipo tenha sido muito mais suave do que
nos camundongos homozigotos. A anormalidade mais óbvia nos camundon-

gos heterozigotos era a presença de um segmento toráxico adicional com um par de costelas associado. Esta transformação estava presente em todos os animais heterozigotos examinados, e em todos os casos, o par adicional de costelas estava ligado ao esterno. Desse modo, T8, cuja costela associa-
5 da normalmente não toca o esterno, parecia ter sido transformado para uma morfologia característica de uma vértebra toráxica mais anterior, e L1 pare-
ceu ter sido transformado para uma morfologia característica de uma vérte-
bra toráxica posterior. Outras anormalidades indicativas de transformações
10 anteriores foram também vistas em graus variantes em camundongos hete-
rozigotos. Essas incluíam uma mudança do processo espinhoso longo ca-
racterístico de T2 por um segmento para T3, uma mudança dos processos
articulares e espinhosos de T10 para T11, uma mudança do tubérculo anterior
em C6 para C7 e transformação de T2 para T1 onde a costela associada a
T2 tocava o topo do esterno.

15 A fim de entender a base para as anormalidades na padroniza-
ção axial vistas em camundongos mutantes de GDF-11, embriões mutantes
isolados em vários estágios de desenvolvimento foram examinados, e com-
parados com embriões do tipo selvagem. Através de exame morfológico
grosseiro, embriões mutantes homozigotos isolados até o dia 9,5 de gesta-
20 ção eram imediatamente distinguíveis dos embriões do tipo selvagem cor-
respondentes. Em particular, o número de somitos presente em qualquer
estágio de desenvolvimento dado era idêntico entre os embriões mutantes e
do tipo selvagem, sugerindo que a taxa de formação de somitos estava inal-
terada nos mutantes. Por volta do dia 10,5-11,5 p.c., embriões mutantes po-
25 diam ser facilmente distinguidos dos embriões do tipo selvagem através de
deslocamento posterior do membro traseiro em 7-8 somitos. As anormalida-
des no desenvolvimento do rabo eram também imediatamente aparentes
nesse estágio. Tomados juntos, esses dados sugerem que as anormalida-
des observadas nos esqueletos mutantes representavam transformações
30 verdadeiras de identidades de segmento ao invés da inserção de segmentos
adicionais, por exemplo, através de uma taxa maior de somiotogênese.

Alterações na expressão de compartimentos contendo genes

são conhecidas por causar transformações em *Drosophila* e em vertebrados. Para ver se os padrões de expressão de genes Hox (o compartimento de vertebrado contendo genes) foram alterados em mutantes com GDF-11 nulo, o padrão de expressão de 3 genes Hox representativos, Hoxc-6, Hoxc-8 e 5 Hoxc-11, foi determinado no dia 12,5 p.c. de embriões mutantes do tipo selvagem, heterozigotos e homozigotos através da quantidade total de hibridização *in situ*. O padrão de expressão de Hoxc-6 em embriões do tipo selvagem se estendeu para as pré-vértebras 8-15 que correspondem aos segmentos torácicos T1-T8. Em mutantes homozigotos, no entanto, o padrão de 10 expressão de Hoxc-6 foi mudado posteriormente e expandido para as pré-vértebras 9-18 (T2-T11). Uma mudança similar foi vista com a sonda Hoxc-8. Em embriões do tipo selvagem, Hoxc-8 foi expresso nas pré-vértebras 13-18 (T6-T11) mas, em embriões mutantes homozigotos, Hoxc-8 foi expresso nas 15 pré-vértebras 14-22 (T7-T15). Finalmente, a expressão de Hoxc-11 foi também mudada posteriormente com o que o limite anterior de expressão mudou da pré-vértebra 28 em embriões do tipo selvagem para a pré-vértebra 36 em embriões mutantes. (Nota-se que por causa da posição do membro posterior ser também mudada posteriormente em embriões mutantes, os 20 padrões de expressão de Hoxc-11 no tipo selvagem e mutante pareciam similares com relação aos membros posteriores). Esses dados provêm mais evidência de que anormalidades do esqueleto vistas em animais mutantes representam transformações homeóticas.

O fenótipo de camundongos de GDF-11 sugeriu que o GDF-11 age logo durante a embriogênese como um regulador geral de padronização 25 axial. Para começar a examinar o mecanismo através do qual GDF-11 exerce seus efeitos, o padrão de expressão de GDF-11 em embriões de camundongo novos foi examinado através da quantidade total de hibridização *in situ*. Nesses estágios, os sítios principais de expressão de GDF-11 se relacionavam precisamente com os sítios conhecidos onde células mesodérmicas 30 são geradas. A expressão de GDF-11 foi primeiro detectada no dia 8,25-8,5 p.c. (8-10 somitos) na região de camada primitiva, que é o sítio onde as células que estão ingressando formam o mesoderma dos embrião em de-

senolvimento. A expressão foi mantida na camada primitiva no dia 8,75, mas por volta do dia 9,5 p.c., quando a raiz do rabo substitui a camada primitiva como a fonte de novas células mesoderma, a expressão de GDF-11 mudou para a raiz do rabo. Desse modo, nesses estágios iniciais, GDF-11 5 parece ser sintetizado na região do embrião em desenvolvimento onde novas células mesoderma surgem e presumivelmente adquirem a sua identidade posterior.

O fenótipo de camundongos com nocaute de GDF-11 em vários aspectos se assemelha ao fenótipo de camundongos que carregam uma 10 deleção de um receptor quanto a alguns membros da superfamília do TGF- β , o receptor activina do tipo IIB (Act RIIB). Como no caso de camundongos com nocaute de GDF-11, os camundongos com nocaute de Act RIIB têm pares extras de costelas e um espectro de defeitos de rim variando de rins 15 hipoplásticos a completa ausência de rins. A similaridade nos fenótipos desses camundongos dá origem à possibilidade de que Act RIIB possa ser um receptor para GDF-11. No entanto, Act RIIB não pode ser o único receptor para GDF-11 porque o fenótipo de camundongos com nocaute de GDF-11 é mais grave do que o fenótipo de camundongos de Act RIIB. Por exemplo, enquanto que animais com nocaute de GDF-11 têm 4-5 pares extra de costelas 20 e mostram transformação homeótica em todo o esqueleto axial, os animais com nocaute de Act RIIB têm apenas 3 pares extra de costelas e não mostram transformações em outros níveis axiais. Em adição, os dados indicam que os defeitos dos rins nos camundongos com nocaute de GDF-11 25 são também mais graves do que aqueles em camundongos com nocaute de Act RIIB. Os camundongos com nocaute de Act RIIB mostram defeitos na formação do eixo esquerdo/direito, tal como isomerismo pulmonar e uma gama de defeitos no coração que não foram ainda observados em camundongos com nocaute de GDF-11. Act RIIB pode se ligar a activinas e certos 30 BMPs, embora nenhum dos camundongos com nocaute gerados para esses ligantes mostrem defeitos na formação do eixo esquerdo/direito.

Se GDF-11 não age diretamente sobre as células mesodérmicas para estabelecer identidade de posição, os dados apresentados aqui estari-

am de acordo ou com os modelos de faixa curta ou morfogene quanto à ação de GDF-11. Isto é, GDF-11 pode agir sobre precursores mesodérmicos para estabelecer padrões de expressão de gene Hox, enquanto essas células

5 mente, GDF-11 produzido na extremidade posterior do embrião pode difundir para formar um gradiente de morfogene. Qualquer que seja o mecanismo de ação que GDF-11 possa ter, o fato de que padronização anterior/posterior bruta ainda acontece em animais com nocaute de GDF-11 sugere que o GDF-11 pode não ser o único regulador de especificação anterior/posterior.

10 Não obstante, é claro que o GDF-11 desempenha um importante papel como um regulador geral de padronização axial e que estudo adicional desta molécula vai levar a compreensões novas importantes em como identidade posicional ao longo do eixo anterior/posterior é estabelecida no embrião vertebrado.

15 Fenótipos similares são esperados nos animais com nocaute de GDF-8. Por exemplo, animais com nocaute de GDF-8 são esperados ter maior número de costelas, defeitos no rim e diferenças anatômicas quando comparado com o tipo selvagem.

20 Embora a invenção tenha sido descrita com referência aos exemplos acima, será compreendido que modificações e variações são compreendidas no espírito e escopo da invenção. Desse modo, a invenção é limitada apenas pelas reivindicações que sequem.

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo de fusão heterólogo substancialmente purificado, caracterizado pelo fato de que compreende um primeiro polipeptídeo operacionalmente ligado a um segundo polipeptídeo, o segundo polipeptídeo sendo um pró-domínio de miostatina, em que o referido domínio consiste nos resíduos de aminoácido 1 a 262 do polipeptídeo promiostatina possuindo uma sequência de aminoácidos como definida em SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 ou 20, ou uma porção funcional do pró-domínio de miostatina, em que o pró-domínio ou porção do mesmo possui uma atividade de selecionada do grupo consistindo em:
 - a) atividade inibidora de transdução de sinal de miostatina;
 - b) atividade de ligação de miostatina;
 - c) atividade de ligação de promiostatina;
 - d) atividade de localização celular; e
 - e) qualquer combinação de a), b), c) e d).
- 15 2. Polipeptídeo de fusão de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a porção de peptídeo funcional do pró-domínio de miostatina consiste dos resíduos de aminoácido de cerca de 20 a 262 do polipeptídeo de promiostatina.
- 20 3. Polipeptídeo de fusão de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a porção de peptídeo funcional do pró-domínio de miostatina consiste dos resíduos de aminoácido de cerca de 20 a 262 de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 ou 20.
- 25 4. Polipeptídeo de fusão de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o pró-domínio é um polipeptídeo de promiostatina de alelo 1 de salmão tendo uma seqüência de aminoácido conforme descrita na SEQ ID NO: 27; ou um polipeptídeo de promiostatina de alelo 2 de salmão tendo uma seqüência de aminoácido conforme descrita na SEQ ID NO: 29.
- 30 5. Polipeptídeo de fusão de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a porção funcional de peptídeo do pró-domínio de miostatina consiste em uma sequência de aminoácidos consistindo dos resí-

duos de aminoácido 1 até cerca de 44 da SEQ ID NO: 27.

6. Polipeptídeo de fusão de acordo com a reivindicação 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que a porção funcional de peptídeo do pró-domínio de miostatina consiste em uma sequência de aminoácidos consistindo dos resíduos de aminoácido 1 até cerca de 23 de SEQ ID NO: 29.

7. Polipeptídeo de fusão de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um medicamento.

8. Polipeptídeo de fusão de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o medicamento é para o tratamento ou prevenção de uma desordem de perda muscular.

9. Polipeptídeo de fusão de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a desordem de perda muscular é distrofia muscular, doença neuromuscular, caquexia ou anorexia.

10. Polinucleotídeo substancialmente purificado, caracterizado pelo fato de que codifica um polipeptídeo de fusão como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9.

11. Micro-organismo, caracterizado pelo fato de que comprehende o polinucleotídeo como definido na reivindicação 10.

12. Método de identificação de uma porção de peptídeo funcional de um pró-domínio de miostatina que interage especificamente com um peptídeo de miostatina, caracterizado pelo fato de que comprehende:

a) testar uma porção de peptídeo de um pró-domínio de miostatina quanto à habilidade em interagir especificamente com um peptídeo de miostatina; e

b) detectar uma interação específica da porção de peptídeo com o peptídeo de miostatina, desse modo identificando uma porção de peptídeo funcional do pró-domínio de miostatina, em que o pró-domínio de miostatina comprehende os resíduos de aminoácidos 1 a 262 do polipeptídeo pró-miostatina.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o dito teste é realizado em um sistema de computador usando

uma porção de peptídeo virtual de um pró-domínio de promiostatina e um peptídeo de miostatina virtual.

14. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o dito teste compreende contatar a porção de peptídeo do pró-domínio de miostatina e o peptídeo de miostatina sob condições adequadas para o pró-domínio de miostatina interagir especificamente com um peptídeo de miostatina.

FIG 2

Sequence alignment of four species (Murino, Peixe zebra, Salmão 1, Salmão 2) showing conservation of amino acids across the protein sequence. The alignment is presented in a grid with numbered positions along the top and left axes.

Key features of the alignment:

- Conservation:** Conserved amino acids are highlighted in black boxes.
- Species:** Murino (blue), Peixe zebra (red), Salmão 1 (green), Salmão 2 (orange).
- Regions:** The alignment is divided into several regions by color and sequence context.
- Conservation Trends:** High conservation is observed in the N-terminal region (residues 1-100), while significant divergence is seen in the C-terminal region (residues 100-250).

	250	260	270	
238	L A V T F P G P G E D G L N P F L E V K V T D T P K R S R R			Murino
236	L A V T S T E T G E D G L L P P F M E V K I S E G P K R H R R			Peixe zebra
20	L A V T S A E A G E - G L Q P F M E V T I S E G P K R S R R			Salmão 1
1	- - V T S T E A G E - G L Q P F M E V K I S E G P K R S R R			Salmão 2
	280	290	300	
268	D F G L D C D E H S T E S R C C C R Y P L T V D F E A F G W D			Murino
266	D S G L D C D E N S S E S R C C C R Y P L T V D F E E D F G W D			Peixe zebra
49	D S G L D C D E N S P E S R C C C R Y P L T V D F E E D F G W D			Salmão 1
28	D S G L D C D E N S P E S R C C C R Y P L T V D F E E D F G W D			Salmão 2
	310	320	330	
298	W I I A P K R Y K A N Y C S G E C E F V F L Q K Y P H T H L			Murino
296	W I I A P K R Y K A N Y C S G E C D Y M Y L Q K Y P H T H L			Peixe zebra
79	W I I A P K R Y K A N Y C S G E C E Y M H L Q K Y P H T H L			Salmão 1
58	W I I A P K R Y K A N Y C S G E C E Y M H L Q K Y P H T H L			Salmão 2
	340	350	360	
328	V H Q A N P R G S A G P C C T P T K M S P I N M L Y F N G K			Murino
326	V N K A S P R G T A G P C C T P T K M S P I N M L Y F N G K			Peixe zebra
109	V N K A N P R G T A G P C C T P T K M S P I N M L Y F N R K			Salmão 1
88	V N K A N P R G T A G P C C T P T K M S P I N M L Y F N R K			Salmão 2
	370			
358	E Q I I Y G K I P A M V V D R C G C S			Murino
356	E Q I I Y G K I P S M V V D R C G C S			Peixe zebra
139	E Q I I Y G K I P S M V V D R C G C S			Salmão 1
118	E Q I I Y G K I P S M V V D R C G C S			Salmão 2

FIG 3

RESUMO

Patente de Invenção: "**POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO COMPREENDENDO UM PRÓ-DOMÍNIO DE MIOSTATINA, POLINUCLEOTÍDEO CODIFICANDO O MESMO, MICRO-ORGANISMO COMPREENDENDO O REFERIDO 5 POLINUCLEOTÍDEO, BEM COMO MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE UMA PORÇÃO DE PEPTÍDEO FUNCIONAL DE UM PRÓ-DOMÍNIO DE MIOSTATINA".**

A presente invenção provê porções de peptídeo substancialmente purificado de um polipeptídeo de promiostatina. Por exemplo, a invenção 10 provê fragmentos proteolíticos de um polipeptídeo de promiostatina tal como um pró-domínio de miostatina ou um peptídeo de miostatina maduro, bem como porções de peptídeo funcionais de um pró-domínio de miostatina. Também é provido um polipeptídeo de promiostatina mutante, o qual é resistente à clivagem proteolítica, por exemplo, clivagem para um pró-domínio de 15 miostatina e um peptídeo de miostatina maduro. A presente invenção também provê um polinucleotídeo codificando uma porção de peptídeo de um polipeptídeo de promiostatina. Em adição, anticorpos que se ligam especificamente a uma porção de peptídeo de um polipeptídeo de promiostatina são 20 providos. A invenção provê ainda métodos de identificação de uma porção de peptídeo funcional de um polipeptídeo de promiostatina.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



1A9854AD13C8FC24

Campo 2



4349285CE9207649

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: p119857 24968400_1.txt
- Data de Geração do Código: 15-06-2015
- Hora de Geração do Código: 08:23:07
- Código de Controle:
 - Campo 1: 1A9854AD13C8FC24
 - Campo 2: 4349285CE9207649