

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

(22) Data de pedido: <b>2008.02.01</b>	(73) Titular(es): <b>ACCELERON PHARMA, INC.</b> <b>128 SIDNEY STREET CAMBRIDGE, MA 02139US</b>
(30) Prioridade(s): <b>2007.02.09 US 900580 P</b> <b>2007.05.31 US 932762 P</b> <b>2007.06.26 US 937365 P</b> <b>2007.10.25 US 528</b>	(72) Inventor(es): <b>JOHN KNOPF</b> US <b>JASBIR SEEHRA</b> US <b>RAVINDRA KUMAR</b> US
(43) Data de publicação do pedido: <b>2009.11.25</b>	
(45) Data e BPI da concessão: <b>2012.08.29</b> <b>237/2012</b>	(74) Mandatário: <b>MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA</b> <b>AV LIBERDADE, Nº. 69 - 3º D 1250-148 LISBOA</b> PT

(54) Epígrafe: **ANTAGONISTA DE ACTIVINA-ACTRIIA E USOS PARA PROMOVER O CRESCIMENTO ÓSSEO EM DOENTES DE CANCRO**

(57) Resumo:  
EM CERTOS ASPETOS, A PRESENTE INVENÇÃO FORNECE COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA PROMOVER O CRESCIMENTO ÓSSEO E O AUMENTO DA DENSIDADE ÓSSEA, ASSIM COMO PARA O TRATAMENTO DE MIELOMA MÚLTIPLO.

RESUMO**"ANTAGONISTA DE ACTIVINA-ACTRIIA E USOS PARA PROMOVER O  
CRESCIMENTO ÓSSEO EM DOENTES DE CANCRO"**

Em certos aspetos, a presente invenção fornece composições e métodos para promover o crescimento ósseo e o aumento da densidade óssea, assim como para o tratamento de mieloma múltiplo.

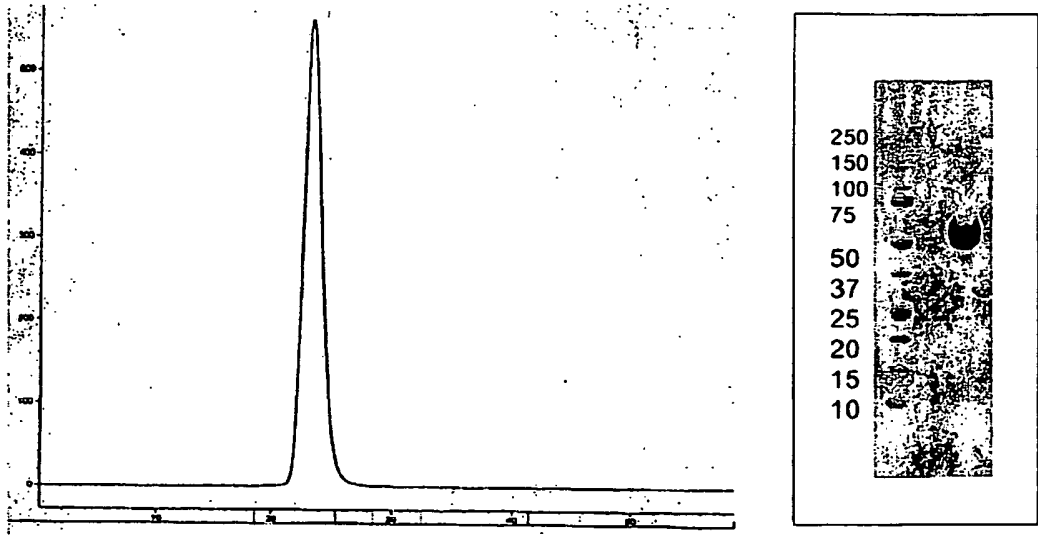


Figura 1

## DESCRIÇÃO

### **"ANTAGONISTA DE ACTIVINA-ACTRIIA E USOS PARA PROMOVER O CRESCIMENTO ÓSSRO EM DOENTES DE CANCRO"**

#### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Distúrbios ósseos, que vão desde osteoporose a fraturas, representam um conjunto de estados patológicos para os quais existem poucos agentes farmacêuticos eficazes. O tratamento concentra-se em intervenções físicas e comportamentais, incluindo imobilização, exercício e alterações na dieta. Seria vantajoso ter agentes terapêuticos que promovem o crescimento ósseo e o aumento da densidade óssea com o objetivo de tratar uma variedade de distúrbios ósseos.

O crescimento ósseo e a mineralização dependem da atividade de dois tipos de células, osteoclastos e osteoblastos, embora os condrócitos e células da vasculatura também participem em aspetos críticos destes processos. Em termos de desenvolvimento, a formação óssea ocorre por meio de dois mecanismos, ossificação endocondral e ossificação intramembranosa, com a primeira sendo responsável pela formação óssea longitudinal e a segunda responsável pela formação de ossos topologicamente planos, tais como os ossos do crânio. A ossificação endocondral requer a formação sequencial e degradação de estruturas cartilagíneas nas placas de crescimento que servem como modelo para a formação de osteoblastos, osteoclastos, a vasculatura e subsequente mineralização. Durante a ossificação intramembranosa, o osso é formado diretamente nos tecidos conetivos. Ambos os processos requerem a infiltração de osteoblastos e subsequente deposição da matriz.

As fraturas e outras ruturas estruturais do osso são curadas através de um processo que, pelo menos superficialmente se assemelha à sequência de eventos de desenvolvimento de osteogénese, incluindo a formação de tecido cartilaginoso e mineralização subsequente. O processo de consolidação da fratura pode ocorrer por duas vias. A consolidação primária ou direta do osso ocorre sem a formação de calo. A consolidação secundária ou indireta do osso ocorre com uma fase precursora de calo. A cura primária das fraturas envolve a reformação da continuidade mecânica ao longo de uma rutura bem definida. Sob condições adequadas, na reabsorção óssea, as células de reabsorção óssea à volta da rutura mostram uma resposta de reabsorção de tunelamento e estabelecem vias para a penetração de vasos sanguíneos e subsequente cura. A cura secundária dos ossos segue um processo de inflamação, formação de calo mole, mineralização do calo e remodelação do calo. Na fase de inflamação, a formação de hematoma e hemorragia resulta da rutura dos vasos sanguíneos do perióstio e do endóstio no local da lesão. As células inflamatórias invadem a área. Na fase de formação de calo mole, as células produzem novos vasos, fibroblastos, material intracelular e células de suporte, formando tecido de granulação no espaço entre os fragmentos da fratura. A união clínica ao longo da rutura é estabelecida por tecido fibroso ou cartilaginoso (calo mole). Osteoblastos são formados e medeiam a mineralização do calo mole, o qual é depois substituído por osso lamelar e sujeito aos processos de remodelação normais.

Para além das fraturas e outras perturbações da estrutura óssea, a perda de conteúdo mineral do osso e massa óssea pode ser causada por uma diversidade de condições e pode resultar em problemas médicos significativos. As mudanças na massa óssea ocorrem de forma relativamente previsível ao

longo da vida de um indivíduo. Até cerca dos 30 anos, os ossos de homens e mulheres crescem até à massa máxima por crescimento linear das placas de crescimento endocondrais e de crescimento radial. Após cerca da idade de 30 anos (para o osso trabecular, por exemplo, ossos planos tais como as vértebras e a pélvis) e a idade de 40 anos (para ossos corticais, por exemplo, ossos longos que se encontram nos membros), ocorre uma lenta perda de osso tanto em homens como em mulheres. Nas mulheres, uma fase final de perda substancial de osso também ocorre, provavelmente devido a deficiências de estrogênio na pós-menopausa. Durante esta fase, as mulheres podem perder mais 10% de massa óssea do osso cortical e 25% do compartimento trabecular. Se a perda de osso progressiva resulta numa condição patológica tal como osteoporose depende largamente da massa óssea inicial do indivíduo e se existem condições agravantes.

A perda de osso é por vezes caracterizada como um desequilíbrio no processo normal de remodelação óssea. O osso saudável está constantemente sujeito a remodelação. A remodelação começa com a reabsorção óssea pelos osteoclastos. O osso reabsorvido é depois substituído por tecido ósseo novo, que é caracterizado pela formação de colagénio pelos osteoblastos, e subsequente calcificação. Em indivíduos saudáveis, as taxas de reabsorção e de formação estão equilibradas. A osteoporose é uma doença crónica progressiva, marcada por uma alteração no sentido da reabsorção, resultando numa diminuição geral da massa óssea e mineralização óssea. A osteoporose em humanos é precedida por osteopénia clínica (densidade mineral óssea que é maior que um desvio padrão mas menos do que 2,5 desvios padrão abaixo do valor médio para osso adulto jovem). A nível mundial, aproximadamente 75 milhões de pessoas têm risco de osteoporose.

Portanto, o controlo do equilíbrio entre a atividade dos osteoclastos e dos osteoblastos pode ser útil para promover a cura de fraturas e outros danos dos ossos, bem como o tratamento de distúrbios, tais como osteoporose, associados a perda de massa óssea e de mineralização do osso.

No que respeita à osteoporose, estrogénio, calcitonina, osteocalcina com vitamina K, ou altas doses de cálcio na dieta são todos usados como intervenções terapêuticas. Outras abordagens terapêuticas para a osteoporose incluem bisfosfonatos, hormona paratiroide, calcimiméticos, estatinas, esteroides anabolizantes, lantânio e sais de estrôncio, e fluoreto de sódio. Tais terapêuticas estão, no entanto, frequentemente associadas a efeitos secundários indesejáveis.

Portanto, é um objeto da presente divulgação fornecer composições para prevenir e tratar mieloma múltiplo como indicado nas reivindicações 1 - 12.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Num primeiro aspeto, a presente invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo uma proteína de fusão ActRIIa-Fc expressa a partir de células CHO, em que a proteína de fusão ActRIIa-Fc é um dímero formado por dois polipéptidos em que cada um tem uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% ou 95% idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:7 unidos por ligação dissulfureto, e em que o dímero tem entre 3 e 5 porções de ácido siálico.

A proteína de fusão ActRIIa-Fc pode ser um dímero formado por dois polipéptidos da SEQ ID NO:7, e um ou ambos os polipéptidos podem opcionalmente ter menos um aminoácido

nas terminações amino ou carboxi do que são mostrados na SEQ ID NO:7. A proteína de fusão ActRIIa-Fc pode ser expressa de forma recombinante nas células CHO usando a sequência líder TPA da SEQ ID NO: 9. O dímero pode ter 4 porções de ácido siálico.

Em algumas formas de realização, a proteína de fusão ActRIIa-Fc tem uma semivida no soro de 25 até 32 dias em média em humanos saudáveis normais e biodisponibilidade equivalente quando administrada por via intravenosa ou por via subcutânea. A composição farmacêutica do primeiro aspecto pode ser adequada para administração subcutânea. Preferencialmente, a proteína de fusão ActRIIa-Fc é pelo menos 90% pura no que respeita a outros componentes proteicos. A proteína de fusão ActRIIa-Fc pode incluir um ou mais resíduos de aminoácidos modificados selecionados a partir de: um aminoácido glicosilado, um aminoácido PEGilado, um aminoácido farnesilado, um aminoácido acetilado, um aminoácido biotinilado, um aminoácido conjugado a uma porção lipídica, e um aminoácido conjugado a um agente orgânico derivatizante. A composição farmacêutica do primeiro aspecto pode compreender adicionalmente um agente bisfosfonato, o qual pode ser selecionado a partir de alendronato, ibandronato e risedronato.

Num segundo aspecto, a presente invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo uma proteína de fusão ActRIIa-Fc para uso no tratamento ou prevenção de mieloma múltiplo num doente humano, em que a composição farmacêutica é uma composição farmacêutica do primeiro aspecto da invenção.

Num terceiro aspecto, a invenção fornece o uso de uma proteína de fusão ActRIIa-Fc para o fabrico de um

medicamento para o tratamento ou prevenção de mieloma múltiplo num doente humano, em que a proteína de fusão ActRIIa-Fc é uma proteína de fusão ActRIIa-Fc como definido no primeiro aspeto da invenção.

Em parte, é aqui descrito que moléculas tendo atividade antagonista de activina ou de ActRIIa ("antagonistas da activina" e "antagonistas de ActRIIa", coletivamente "antagonistas de activina-ActRIIa") podem ser usadas para aumentar a densidade óssea, promover o crescimento ósseo, e/ou aumentar a resistência do osso. Em particular, é aqui descrito que uma forma solúvel de ActRIIa atua como um inibidor da sinalização de activina-ActRIIa e promove o aumento da densidade óssea, crescimento ósseo, e resistência do osso in vivo. Enquanto a maioria dos agentes farmacêuticos que promovem o crescimento ósseo ou inibem a perda de osso atua como agentes anti-catabólicos (também vulgarmente referidos como "agentes catabólicos") (por exemplo, bisfosfonatos) ou agentes anabólicos (por exemplo, hormona paratiroide, PTH, quando apropriadamente doseados), a proteína ActRIIa solúvel exhibe atividade dupla, tendo os dois efeitos anti-catabólicos e anabólicos. Assim, é aqui descrito que antagonistas da via de sinalização de activina-ActRIIa podem ser usados para aumentar a densidade óssea e promover o crescimento ósseo. Enquanto que a ActRIIa solúvel pode afetar o osso através de um outro mecanismo que não o antagonismo da activina, pode ser desejável que os agentes terapêuticos sejam selecionados com base numa atividade antagonista da activina-ActRIIa. Como aqui divulgado, antagonistas de activina-ActRIIa são eficientes na prevenção e/ou reparação de danos ósseos causados pelos tumores de mieloma múltiplo e tumores mamários, e, adicionalmente, que os antagonistas de activina-ActRIIa diminuem a carga tumoral no mieloma múltiplo. O polipéptido ActRIIa solúvel promove o



crescimento ósseo sem causar um aumento consistentemente mensurável na massa muscular.

São aqui divulgados métodos para usar antagonistas de activina-ActRIIa, incluindo, por exemplo, polipéptidos ActRIIa ligados a activina, anticorpos anti-activina, anticorpos anti-ActRIIa, moléculas pequenas direcionadas para activina ou ActRIIa e aptâmeros, e ácidos nucleicos que diminuem a expressão da activina e ActRIIa, para tratar distúrbios associados a baixa densidade óssea ou baixa resistência óssea, tal como osteoporose, ou para promover o crescimento ósseo em doentes com essa necessidade, tal como em doentes com fratura óssea. São aqui divulgados polipéptidos compreendendo um polipéptido ActRIIa de ligação a activina solúvel, que se liga a activina. Os polipéptidos ActRIIa podem ser formulados como uma preparação farmacêutica compreendendo o polipéptido ActRIIa de ligação a activina e um transportador farmacêuticamente aceitável. Preferencialmente, o polipéptido ActRIIa de ligação a activina liga-se à activina com um  $K_D$  inferior a 1 micromolar ou inferior a 100, 10 ou 1 nanomolar. Opcionalmente, o polipéptido ActRIIa de ligação a activina liga-se seletivamente a activina versus GDF11 e/ou GDF8, e preferencialmente com um  $K_D$  que é pelo menos 10 vezes, 20 vezes ou 50 vezes menor relativamente à activina do que relativamente a GDF1 I e/ou GDF8. Embora não desejando estar limitado a um mecanismo de ação particular, espera-se que este grau de seletividade para inibição da activina superior à inibição de GDF1 I/GDF8 seja responsável pelo efeito seletivo no osso sem um efeito consistentemente mensurável no músculo. Um polipéptido ActRIIa pode ser selecionado por causar menos de 15%, menos que 10% ou menos que 5% de aumento do músculo em doses que atingem efeitos desejáveis no osso. Preferencialmente, a composição é pelo menos 95% pura, em relação a outros componentes

polipeptídicos, como avaliado por cromatografia de exclusão de tamanho, e mais preferencialmente, a composição é pelo menos 98% pura. Um polipéptido ActRIIa de ligação a activina para uso na invenção pode ter uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 7 ou sequência de aminoácidos que é pelo menos 90%, 95%, 97% ou 99% idêntica a uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 7. Polipéptidos ActRIIa de ligação a activina podem incluir um fragmento funcional de um polipéptido ActRIIa natural, tal como um compreendendo pelo menos 10, 20 ou 30 aminoácidos de uma sequência selecionada a partir das SEQ ID NOs: 1-3 ou uma sequência da SEQ ID NO: 2, sem os 10 a 15 aminoácidos C-terminais (a "cauda").

Um polipéptido ActRIIa de ligação a activina solúvel pode incluir uma ou mais alterações na sequência de aminoácidos (por exemplo, no domínio de ligação a ligando) em relação a um polipéptido ActRIIa de ocorrência natural. Exemplos de polipéptidos ActRIIa alterados são fornecidos na WO 2006/012627, pp. 59-60. A alteração na sequência de aminoácidos pode, por exemplo, alterar a glicosilação do polipéptido quando produzido num mamífero, inseto ou outra célula eucariótica ou alterar a clivagem proteolítica do polipéptido em relação aos polipéptidos ActRIIa de ocorrência natural.

Um polipéptido ActRIIa de ligação a activina pode ser uma proteína de fusão que tem, como um domínio, polipéptidos ActRIIa. (por exemplo, uma porção de ligação a ligando de um ActRIIa) e um ou mais domínios adicionais que fornecem uma propriedade desejável, tal como farmacocinética melhorada, purificação mais fácil, direcionamento para tecidos específicos, etc. Por exemplo, um domínio de uma proteína de fusão pode melhorar uma ou mais de estabilidade in vivo, meia vida in vivo, absorção/administração,

localização de tecido ou formação de distribuição de complexos de proteínas, multimerização da proteína de fusão, e/ou purificação. A dimerização ou multimerização pode proporcionar um aumento de afinidade de ligação ao ligando. Uma proteína de fusão ActRIIa de ligação a activina pode incluir um domínio Fc de imunoglobulina (tipo selvagem ou mutante) ou uma albumina sérica ou outra porção polipeptídica que forneça propriedades desejáveis tais como farmacocinética melhorada, solubilidade melhorada ou estabilidade melhorada. Tipicamente, uma proteína de fusão ActRIIa-Fc da invenção será produzida como um complexo homodimérico. Opcionalmente, uma fusão ActRIIa-Fc compreende um ligante relativamente não estruturado posicionado entre o domínio Fc e o domínio extracelular de ActRIIa. Este ligante não estruturado pode corresponder a uma região não estruturada de aproximadamente 15 aminoácidos na extremidade C terminal do domínio extracelular de ActRIIa (a "cauda"), ou pode ser uma sequência artificial de 1, 2, 3, 4 ou 5 aminoácidos ou um comprimento de entre 5 e 15, 20, 30, 50 ou mais aminoácidos que são relativamente livres de estrutura secundária, ou uma mistura de ambos. Um ligando pode ser rico em resíduos de glicina e prolina e pode, por exemplo, conter sequência única de treonina/serina e glicinas ou sequências repetidas de treonina/serina e glicinas (por exemplo, singletos ou repetições TG<sub>4</sub> ou SG<sub>4</sub>). A proteína de fusão pode incluir a subsequência de purificação, tal como um epitopo tag, um FLAG tag, uma sequência de polihistidina, e uma fusão GST. Opcionalmente, um polipeptídeo ActRIIa solúvel inclui um ou mais resíduos de aminoácidos modificados selecionados a partir de: um aminoácido glicosilado, um aminoácido PEGilado, um aminoácido farnesilado, um aminoácido acetilado, um aminoácido biotinilado, um aminoácido conjugado a uma porção lipídica, e um aminoácido conjugado a um agente orgânico derivatizado. Uma preparação

farmacêutica pode também incluir um ou mais compostos adicionais tais como um composto que é usado para tratar um distúrbio do osso. Preferencialmente, uma preparação farmacêutica é substancialmente livre de pirogênios. Em geral, é preferível que uma tal proteína ActRIIa possa ser expressa numa linha de células de mamífero que medeia adequadamente a glicosilação natural da proteína ActRIIa de modo a diminuir a probabilidade de uma resposta imune desfavorável num doente Humano e linhas de células CHO têm sido usadas com sucesso, e espera-se que outros comuns sistemas de expressão de mamífero sejam úteis.

Como aqui descrito, as proteínas ActRIIa designadas ActRIIa-Fc têm propriedades desejáveis, incluindo ligação seletiva a activina versus GDF8 e/ou GDF11, alta afinidade de ligação a ligando e meia vida sérica superior a duas semanas em modelos animais. Os polipéptidos ActRIIa-Fc e as preparações farmacêuticas compreendendo esses polipéptidos e um excipiente farmacêuticamente aceitável são aqui descritos.

Ácidos nucleicos que codificam um polipéptido ActRIIa solúvel de ligação a activina são aqui divulgados. Um polinucleótido isolado pode compreender uma sequência codificante para um polipéptido ActRIIa de ligação a activina solúvel, tal como descrito acima. Por exemplo, um ácido nucleico isolado pode incluir uma sequência que codifica um domínio extracelular (por exemplo, domínio de ligação a ligando) de um ActRIIa e uma sequência que poderia codificar uma parte ou a totalidade do domínio transmembranar e/ou do domínio citoplasmático de um ActRIIa, com exceção de um codão de terminação posicionado dentro do domínio transmembranar ou no domínio citoplasmático, ou posicionado entre o domínio extracelular e o domínio transmembranar ou o domínio citoplasmático. Por exemplo, um polinucleótido isolado pode compreender uma

sequência polinucleotídica ActRIIa de comprimento total tal como as SEQ ID NO: 4 ou 5, ou uma versão parcialmente truncada, o referido polinucleótido isolado compreendendo adicionalmente um codão de terminação de transcrição pelo menos seiscentos nucleotídeos antes do terminal 3', ou posicionado de outro modo, de modo a que a tradução do polinucleótido dá origem a um domínio extracelular opcionalmente fundido a uma porção truncada de um ActRIIa de comprimento total. Uma sequência de ácido nucleico é a SEQ ID NO: 14. Os ácidos nucleicos aqui divulgados podem estar operativamente ligados a um promotor para expressão, e a divulgação fornece células transformadas com esses polinucleótidos recombinantes. Preferencialmente, a célula é uma célula de mamífero tal como uma célula CHO.

São também aqui divulgados métodos para fazer um polipéptido ActRIIa de ligação a activina, solúvel. Um tal método pode incluir a expressão de qualquer dos ácidos nucleicos (por exemplo, SEQ ID NO: 4, 5 ou 14) aqui divulgados numa célula adequada, tal como uma célula de ovário de hamster chinês (CHO). Um tal método pode compreender: a) cultivar uma célula sob condições adequadas para expressão do polipéptido ActRIIa solúvel, em que a referida célula é transformada com uma construção de expressão de ActRIIa solúvel; e b) recuperar o polipéptido ActRIIa solúvel assim expresso. Os polipéptidos ActRIIa solúveis podem ser recuperados como fração bruta, parcialmente purificada ou altamente purificada. A purificação pode ser atingida por uma série de passos de purificação, incluindo, por exemplo, um, dois ou três ou mais dos seguintes, por qualquer ordem: cromatografia de proteína A, cromatografia de troca iónica (por exemplo, Q sefarose), cromatografia de interação hidrofóbica (por exemplo, fenilsefarose), cromatografia de exclusão de tamanho, e cromatografia de troca catiónica.

Um antagonista de activina-ActRIIa aqui divulgado, tal como um polipéptido ActRIIa de ligação a activina solúvel, pode ser usado num método para promover o crescimento ósseo ou aumentar a densidade óssea num indivíduo. O tratamento de uma doença associada a baixa densidade óssea, ou a promoção do crescimento ósseo, em doentes com essa necessidade pode compreender a administração a um indivíduo com essa necessidade, de uma quantidade eficaz de antagonista de activina-ActRIIa. Também divulgados são os usos do antagonista de activina-ActRIIa para fazer um medicamento para o tratamento de uma doença ou condição como aqui descrito.

Um método para identificar um agente que estimula o crescimento do, ou aumento da mineralização do, osso pode compreender:

a) identificar um agente de teste que se liga a activina ou um domínio de ligação a ligando de um polipéptido ActRIIa; e b) avaliar o efeito do agente no crescimento do, ou na mineralização do, osso (não faz parte da invenção).

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra a purificação de ActRIIa-hFc expressa em células CHO. A proteína purifica como um pico único, bem definido.

A Figura 2 mostra a ligação de ActRIIa-hFc a activina e GDF-11, como medido pelo ensaio Biacore™.

A Figura 3 mostra um esquema para o Ensaio do Gene Reporter A-204. A Figura mostra o vetor Reporter: pGL3 (CAGA)12 (descrito em Dennler *et al*, 1998, EMBO 17: 3091 - 3100.) O motivo CAGA 12 está presente em genes responsivos TGF-Beta

(gene PAI-1), pelo que este vetor é de uso geral para fatores de sinalização através de Smad 2 e 3.

A Figura 4 mostra os efeitos de ActRIIa-hFc (diamantes) e ActRIIa-mFc (quadrados) na sinalização de GDF-8 no Ensaio de Gene Reporter A-204. Ambas as proteínas exibiram inibição substancial da sinalização mediada por GDF-8 a concentrações picomolares.

A Figura 5 mostra os efeitos de três preparações diferentes de ActRIIa-hFc em sinalização GDF-11 no Ensaio de Gene Reporter A-204.

A Figura 6 mostra exemplos de imagens DEXA de ratos BALB/c tratados com ActRIIa-mFc e de controlo, antes (painéis superiores) e após (painéis inferiores) o período de tratamento de 12 semanas. O sombreado mais pálido indica aumento da densidade óssea.

A Figura 7 mostra uma quantificação dos efeitos de ActRIIa-mFc na densidade mineral óssea em ratos BALB/c durante o período de 12 semanas. Os tratamentos foram o controlo (diamantes), dose de 2 mg/kg de ActRIIa-mFc (quadrados), dose de 6 mg/kg de ActRIIa-mFc (triângulos) e dose de 10 mg/kg de ActRIIa-mFc (círculos).

A Figura 8 mostra uma quantificação dos efeitos de ActRIIa-mFc no conteúdo mineral ósseo em ratos BALB/c durante o período de 12 semanas. Os tratamentos foram o controlo (diamantes), dose de 2 mg/kg de ActRIIa-mFc (quadrados), dose de 6 mg/kg de ActRIIa-mFc (triângulos) e dose de 10 mg/kg de ActRIIa-mFc (círculos).

A Figura 9 mostra uma quantificação dos efeitos de ActRIIa-mFc na densidade mineral óssea do osso trabecular em ratos

C57BL6 ovariectomizados (OVX) ou com operação simulada (SHAM) após mais um período de 6 semanas. Os tratamentos foram o controlo (PBS) ou a dose de 10 mg/kg de ActRIIa-mFc (ActRIIa).

A Figura 10 mostra uma quantificação dos efeitos de ActRIIa-mFc no osso trabecular em ratinhos C57BL6 ovariectomizados (OVX) durante um período de 12 semanas. Os tratamentos foram o controlo (PBS; barras claras) ou dose de 10 mg/kg de ActRIIa-mFc (ActRIIa; barras escuras).

A Figura 11 mostra uma quantificação dos efeitos de ActRIIa-mFc no osso trabecular em ratos C57BL6 com operação simulada após o período de tratamento de 6 ou 12 semanas. Os tratamentos foram o controlo (PBS; barras claras) ou dose de 10 mg/kg de ActRIIamFc (ActRIIa; barras escuras).

A Figura 12 mostra os resultados da análise pQCT de densidade óssea em ratos ovariectomizados após 12 semanas de tratamento. Os tratamentos foram o controlo (PBS; barras claras) ou ActRIIa-mFc (barras escuras) eixo do Y: mg/ccm

A Figura 13 ilustra os resultados de análise pGCT de densidade óssea em ratos com operação simulada durante 12 semanas de tratamento. Os tratamentos foram o controlo (PBS; barras claras) ou ActRIIa-mFc (barras escuras); eixo dos y mg/ccm

As Figuras 14A e 14B mostram a análise DEXA do corpo todo após 12 semanas de tratamento (A) e análise ex vivo de fêmures (B). As áreas claras representam áreas de alta densidade óssea.

A Figura 15 mostra a análise pQCT ex vivo do eixo femoral médio após tratamento de doze semanas. Os tratamentos foram



o veículo de controlo (PBS, barras escuras) e ActRIIa-mFc (barras claras). As quatro barras à esquerda mostram a densidade óssea total enquanto que as quatro barras à direita mostram a densidade óssea cortical. O primeiro par de barras em cada conjunto de quatro barras representa os dados de ratos ovariectomizados enquanto que o segundo par de barras representa os dados de ratos com operação simulada.

A Figura 16 mostra a análise pQCT *ex vivo* e conteúdo de osso diafisário do eixo femoral após tratamento de doze semanas. Os tratamentos foram o veículo controlo (PBS, barras escuras) ou ActRIIa-mFc (barras claras). As quatro barras à esquerda mostram o conteúdo ósseo total enquanto que as quatro barras à direita mostram o conteúdo ósseo cortical. O primeiro par de barras em cada conjunto de quatro barras representa os dados de ratos ovariectomizados enquanto que o segundo par de barras representa os dados de ratos com operação simulada.

A Figura 17 mostra a análise pQCT *ex vivo* do eixo femoral e espessura cortical do fémur. Os tratamentos foram o controlo (PBS, barras escuras) e ActRIIa-mFc (barras claras). As quatro barras à esquerda mostram a circunferência endosteal enquanto que as quatro barras à direita mostram a circunferência periosteal. O primeiro par de barras em cada conjunto de quatro barras representa os dados de ratos ovariectomizados enquanto que o segundo par de barras representa os dados de ratos com operação simulada.

A Figura 18 ilustra os resultados de teste mecânico de fémures após tratamento de doze semanas. Os tratamentos foram o controlo (PBS, barras escuras) e ActRIIa-mFc (barras claras). As duas barras da esquerda representam os

dados de ratos ovariectomizados enquanto as últimas duas barras representam os dados de ratos com operação simulada.

A Figura 19 mostra os efeitos de ActrIIa-mFc no volume de osso trabecular.

A Figura 20 mostra os efeitos da ActrIIa-mfc na arquitetura trabecular no fêmur distal.

A Figura 21 mostra os efeitos de ActrIIa-mFc no osso cortical.

A Figura 22 mostra os efeitos da ActrIIa-mFc na resistência mecânica do osso.

A Figura 23 mostra os efeitos das diferentes doses de ActRIIa-mFc nas características do osso para três dosagens diferentes.

A Figura 24 mostra histomorfometria do osso indicando que ActRIIa-mFc tem dupla atividade anabólica e anti-reabsorção.

A Figura 25 mostra dados histomorfométricos adicionais.

A Figura 26 mostra imagens de fêmures de rato de ratos normais e com tumor, e os efeitos do tratamento com ActRIIa-mFc na morfologia do osso no modelo de mieloma múltiplo. Os ratos com tumores de mieloma múltiplo (5T2) mostram marcada corrosão e degradação no osso comparado com ratos normais (naïve). O tratamento com ActRIIa-mFc elimina este efeito.

A Figura 27 mostra os resultados de ensaios clínicos humanos descrito no Exemplo 5, onde a área sob a curva

(AUC) e a dose de ActRIIa-hFc administrada têm uma correlação linear, independentemente do facto de ActRIIa-hFc ser administrado por via intravenosa (IV) ou subcutânea (SC).

A Figura 28 mostra uma comparação de níveis séricos de ActRIIa-hFc em doentes administrados IV ou SC.

A Figura 29 mostra os níveis de fosfatase alcalina no osso (BAP) em resposta a níveis de doses diferentes de ActRIIa-hFc. BAP é um marcador para crescimento ósseo anabólico.

A Figura 30 mostra os efeitos cooperativos de ActRIIa-mFc (RAP-011) e um agente bisfosfonato (zoledronato) em ratos.

#### DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

##### 1. Visão global

A superfamília do fator de transformação do crescimento beta (TGF-beta) contém uma diversidade de fatores de crescimento que partilham elementos de sequência e motivos estruturais comuns. Estas proteínas são conhecidas por exercerem efeitos biológicos numa grande variedade de tipos de células tanto em vertebrados como invertebrados. Membros da superfamília desempenham importantes funções durante o desenvolvimento embriogénico na formação de padrões e especificação de tecidos e podem influenciar uma variedade de processos de diferenciação, incluindo adipogénese, miogénese, condrogénese, cardiogénese, hematopoiese, neurogénese, e diferenciação das células epiteliais. A família é dividida em dois ramos gerais: os ramos BMP/GDF e TGF-beta/Activina/BMP 10, cujos membros têm diversos efeitos, muitas vezes complementares. Manipulando a atividade de um membro da família TGF-beta, é muitas vezes

possível provocar alterações fisiológicas significativas num organismo. Por exemplo, as raças de bovinos Piedmontese e Belgian Blue carregam uma mutação de perda de função no gene GDF8 (também chamado miostatina) que causa um marcado aumento na massa muscular. Grobet et al., *Nat Genet.* 1997, 17(1):71-4. Além disso, em humanos, os alelos inativos de GDF8 estão associados ao aumento da massa muscular e, alegadamente força excepcional. Schuelke et al., *N Engl J Med* 2004, 350:2682-8.

As activinas são fatores de crescimento polipeptídicos diméricos que pertencem à superfamília TGF-beta. Existem três formas principais de activina (A, B, e AB) que são homo/heterodímeros de duas subunidades  $\beta$  intimamente relacionadas ( $\beta_A\beta_A$ ,  $\beta_B\beta_B$ , e  $\beta_A\beta_B$ ). O genoma humano também codifica uma activina C e uma activina E, que são principalmente expressas no fígado. Na superfamília TGF-beta, as activinas são fatores únicos e multifuncionais que podem estimular a produção de hormonas nas células do ovário e da placenta, apoiar a sobrevivência de células neuronais, influenciar a progressão do ciclo celular positivamente ou negativamente dependendo do tipo de célula, e induzir a diferenciação mesodérmica pelo menos em embriões de anfíbios (DePaolo et al., 1991, *Proc Soc Exp Biol Med.* 198: 500-512; Dyson et al., 1997, *Curr Biol.* 7:81-84; Woodruff, 1998, *Biochem Pharmacol.* 55:953-963). Além disso, verificou-se que o fator de diferenciação eritroide (EDF) isolado a partir de células leucémicas monocíticas humanas estimuladas era idêntico à activina A (Murata et al., 1988, *PNAS*, 85:2434). Foi sugerido que a activina A atua como um regulador positivo natural da eritropoiese na medula óssea. Em vários tecidos, a sinalização da activina é antagonizada pelo seu heterodímero relacionado, a inibina. Por exemplo, durante a libertação da hormona de estimulação folicular (FSH) da

pituitária, a activina promove a secreção e síntese de FSH, enquanto que a inibina impede a secreção e a síntese de FSH. Outras proteínas que podem regular a bioatividade da activina e/ou se ligam à activina incluem a folistatina (FS), proteína relacionada com folistatina (FSRP), e  $\alpha 2$ -macroglobulina.

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

Dois recetores tipo II relacionados, ActRIIa e ActRIIb, foram identificados como recetores tipo II para activinas (Mathews and Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano et al., 1992, Cell 68:97-108). Para além das activinas, ActRIIa e ActRIIb podem interagir bioquimicamente com muitas outras famílias de proteínas TGF- $\beta$ , incluindo BMP7, Nodal, GDF8, e GDF11 (Yamashita et al., 1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee and McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311; Yeo and Whitman, 2001, Mol. Cell 7: 949-957; Oh et al., 2002, Genes Dev. 16:2749-54). ALK4 é o recetor primário tipo I para as activinas, particularmente para a

activina A, e ALK-7 pode servir também de recetor para as activinas, particularmente para a activina B.

Como aqui demonstrado, um polipéptido ActRIIa solúvel (sActRIIa), que demonstra preferência substancial pela ligação à activina A ao contrário de outros membros da família TGF-beta, tais como GDF8 ou GDF11, é eficaz para promover o crescimento ósseo e aumentar a densidade óssea in vivo. Embora não desejando estar limitado a qualquer mecanismo particular, é esperado que o efeito de sActRIIa seja causado primariamente por um efeito antagonista da activina, dada a ligação muito forte da activina (constante de dissociação picomolar) exibida pela construção particular sActRIIa usada neste estudo. Independentemente do mecanismo é evidente a partir dos dados aqui apresentados que os antagonistas ActRIIa-activina aumentam a densidade óssea em ratos normais, em modelos de rato para osteoporose e num modelo de rato de mieloma múltiplo. Deve notar-se que o osso é um tecido dinâmico, com crescimento ou redução e aumento ou diminuição da densidade dependendo de um equilíbrio de fatores que produzem o osso e estimulam a mineralização (principalmente os osteoblastos) e fatores que destroem e desmineralizam o osso (principalmente os osteoclastos). O crescimento ósseo e a mineralização podem ser aumentados aumentando os fatores produtivos, diminuindo os fatores destrutivos, ou ambos. Os termos "promover o crescimento ósseo" e "aumentar a mineralização do osso" referem-se a mudanças físicas observáveis no osso e são neutros em relação ao mecanismo pelo qual as alterações no osso ocorrem.

Os modelos de rato para a osteoporose e crescimento ósseo/densidade que foram usados nos estudos aqui descritos são considerados como sendo altamente preditivos da eficácia em humanos, e portanto, os polipéptidos ActRIIa e

outros antagonistas de Activina-ActRIIa podem ser usados para promover o crescimento ósseo e aumentar a densidade óssea em humanos. Antagonistas de activina-ActRIIa incluem, por exemplo, polipéptidos ActRIIa solúveis de ligação a activina, anticorpos que se ligam à activina (particularmente as subunidades A ou B da activina, também referidas como  $\beta$ A ou  $\beta$ B) e perturbam a ligação a ActRIIa, anticorpos que se ligam a ActRIIa e perturbam a ligação a activina, proteínas que não anticorpos selecionadas para ligação a activina ou ActRIIa (ver por exemplo, WO/2002/088171, WO/2006/055689, e WO/2002/032925 para exemplos dessas proteínas e métodos para conceção e seleção desses reagentes de ligação de afinidade não-anticorpos), e péptidos aleatórios selecionados para ligação a activina ou ActRIIa, frequentemente aposto a um domínio Fc. Duas proteínas diferentes (ou outras porções) com atividade de ligação a activina ou ActRIIa, especialmente ligantes da activina que bloqueiam os sítios de ligação tipo I (por exemplo, um recetor de activina tipo I solúvel) e tipo II (por exemplo, um recetor de activina tipo II solúvel) respetivamente, podem ser ligadas uma à outra para criar uma molécula de ligação bifuncional. Aptâmeros de ácidos nucleicos, moléculas pequenas e outros agentes que inibem o eixo de sinalização da activina-ActRIIa. Várias proteínas têm atividade antagonista de activina-ActRIIa, incluindo a inibina (i.e., subunidade alfa da inibina), embora a inibina não antagonize a activina universalmente em todos os tecidos, folistatina (por exemplo, folistatina-288 e folistatina-315). FSRP, activina C, alfa(2)-macroglobulina, e uma activina-A mutante M108A (troca de metionina por alanina na posição 108). Geralmente, formas alternativas de activina, particularmente aquelas com alterações no domínio de ligação ao recetor tipo I pode ligar-se a recetores tipo II que não conseguem formar um complexo ternário ativo, atuando assim como antagonistas. Adicionalmente, ácidos

nucleicos, tais como moléculas anti-sentido, siRNAs ou ribozimas que inibem a activina A, B, C ou E, ou, particularmente, a expressão da ActRIIa, podem ser usados como antagonistas de activina-ActRIIa. Preferencialmente, os antagonistas de activina-ActRIIa a serem usados devem exibir seletividade para a inibição da sinalização mediada por activina versus outros membros da família TGF-beta, e particularmente em relação a GDF8 e GDF11. As proteínas ActRftb solúveis ligam-se a activina, no entanto, a proteína de tipo selvagem não exibe seletividade significativa na ligação a activina versus GDF8/11, e experiências preliminares sugerem que esta proteína não fornece os efeitos desejados no osso, enquanto que causa também crescimento substancial do músculo. No entanto, formas alteradas de ActRIIb com diferentes propriedades de ligação foram identificadas (ver, por exemplo, WO 2006/012627, pp. 55-59 e estas proteínas podem atingir os efeitos desejados no osso. ActRIIb nativa ou alterada pode ser dada especificidade acrescida para activina por acoplamento com um segundo agente de ligação seletivo para activina.

Os termos usados nesta especificação geralmente têm o seu significado comum na técnica, dentro do contexto desta invenção e no contexto específico em que cada termo é usado. Certos termos são discutidos a seguir ou em qualquer outra parte da especificação, para dar orientação adicional ao praticante na descrição das composições e métodos da invenção e como fazer uso deles.

"Cerca de" e "aproximadamente" devem geralmente significar um grau aceitável de erro para a quantidade medida dada a natureza ou precisão das medições. Tipicamente, graus exemplificativos de erro são dentro de 20 por cento (%),



preferencialmente dentro de 10%, e mais preferencialmente dentro de 5% de um dado valor ou intervalo de valores.

Em alternativa, e particularmente em sistemas biológicos, os termos "cerca de" e "aproximadamente" podem significar valores que estão dentro de uma ordem de magnitude, preferencialmente dentro de 5 vezes e mais preferencialmente dentro de 2 vezes um dado valor. As quantidades numéricas dadas aqui são aproximadas, a menos que indicado em contrário, significando que o termo "cerca de" ou "aproximadamente" pode ser inferido quando não expressamente indicado.

As sequências podem ser comparadas umas com as outras, incluindo a sequência de tipo selvagem com um ou mais mutantes (sequências variantes). Essas comparações compreendem tipicamente os alinhamentos das sequências de polímeros, por exemplo, usando programas de alinhamento de sequências e/ou algoritmos que são bem conhecidos na técnica (por exemplo, BLAST, FASTA e MEGALIGN, para indicar alguns). O especialista na técnica pode facilmente apreciar que, nesses alinhamentos, quando uma mutação contém uma inserção ou deleção de um resíduo, o alinhamento da sequência vai introduzir um "gap" (tipicamente representado por um traço, ou "A") na sequência do polímero que não contém o resíduo inserido ou eliminado.

"Homólogo," em todas as suas formas gramaticais e variações de ortografia, refere-se à relação entre duas proteínas que possuem uma "origem evolutiva comum," incluindo proteínas de superfamílias nas mesmas espécies de organismos, assim como proteínas homólogas de diferentes espécies de organismos. Essas proteínas (e os seus ácidos nucleicos codificantes) têm homologia de sequência, como refletido pela sua semelhança de sequências, em termos de percentagem

de identidade ou pela presença de resíduos ou motivos específicos e posições conservadas.

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

Porém, em uso comum e no presente pedido, o termo "homólogo," quando modificado com um advérbio tal como "altamente," pode referir-se à semelhança de sequência e pode ou não relacionar-se com uma a origem evolutiva comum.

## 2. Polipéptidos ActRIIa

Como aqui usado, o termo "ActRIIa" refere-se a uma família de proteínas de recetores tipo IIa de activina (ActRIIa) de quaisquer espécies e variantes derivadas dessas proteínas ActRIIa por mutagénese ou outra modificação. A referência aqui a ActRIIa é entendida para ser uma referência a qualquer uma das formas correntemente identificadas. Membros da família ActRIIa são geralmente proteínas transmembranares, compostas de um domínio extracelular de ligação a ligando com uma região rica em cisteína, um domínio transmembranar, e um domínio citoplasmático com atividade de serina/treonina quinase prevista.

O termo "polipéptido ActRIIa" inclui polipéptidos compreendendo qualquer polipéptido de ocorrência natural de um membro da família ActRIIa assim como quaisquer variantes destes (incluindo mutantes, fragmentos, fusões, e formas peptidomimética) que retêm uma atividade útil. Por exemplo, polipéptidos ActRIIa incluem polipéptidos derivados da sequência de qualquer ActRIIa conhecido com uma sequência

pelo menos cerca de 80% idêntica à sequência de um polipéptido ActRIIa, e preferencialmente pelo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% ou maior identidade. Por exemplo, um polipéptido ActRIIa da invenção pode ligar-se a e inibir a função de uma proteína ActRIIa e/ou activina. Um polipéptido ActRIIa pode promover o crescimento ósseo e mineralização do osso. Exemplos de polipéptidos ActRIIa incluem polipéptido precursor de ActRIIa humano (SEQ ID NO: 1) e polipéptidos ActRIIa humanos solúveis (por exemplo, SEQ ID NOs: 2, 3, 7 e 12).

A sequência de proteína precursora de ActRIIa humana é como se segue:

**MGAAAKLAFVFLISCSSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEP  
 CYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSP  
 EVYFCCCEGNMCNEKFSYFP**EMEVTQPTSNPVTPKPPYYNILLYSLVPL  
 MLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLVPTQDPGPPPPSPLLGLKPLQLE  
 VKARGRFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKHEN  
 ILQFIGAEKRGTSDVDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVVSWNELCHIAE  
 TMARGLAYLHEDI PGLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFG  
 LALKFEAGKSAGDTHGQVGTTRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGL  
 VLWELASRCTAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSEDMQEVVVHKKRPVL  
 RDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMQRLTNIIT  
 TEDIVTVVTMTNVDFPPKESL (SEQ ID NO: 1)

O péptido de sinal está sublinhado; o domínio extracelular está a negrito e os sítios de glicosilação potenciais N-ligados estão sublinhados com duas linhas.

A sequência polipeptídica processada de ActRIIa humana solúvel (extracelular) é como se segue:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISG  
 SIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKD SPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP  
 EMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 2)

A "cauda" C-terminal do domínio extracelular está sublinhada. A sequência com a "cauda" eliminada (uma sequência  $\Delta 15$ ) é como se segue:

**ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISG  
SIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP  
EM (SEQ ID NO:3)**

A sequência de ácidos nucleicos que codifica a proteína precursora de ActRIIa humana é como se segue (nucleótidos 164-1705 da entrada no Genbank NM\_001616):

**ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGCCGTCCTTCTTATCTCCTGTTCTTCAGGTGC  
TATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAG  
ACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGTAACCGTGTTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCAT  
TGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCATTGAAATAGTGAAACAAGGTTGTTG**

GCTGGATGATATCAAC TGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTG  
 AAGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCA  
 GAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCATTACAA  
 CATCCTGCTCTATTCCTTGGTGCCACTTATGTTAATTGCGGGGATTGTCATTTGTGCAT  
 TTTGGGTGTACAGGCATCACAAGATGGCCTACCCTCCTGTACTTGTCCAACCTCAAGAC  
 CCAGGACCACCCCACTTCTCCATTACTAGGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAAGT  
 GAAAGCAAGGGGAAGATTTGGTTGTGTCTGGAAAGCCCAGTTGCTTAACGAATATGTGG  
 CTGTCAAATATTTCCAATACAGGACAAACAGTCATGGCAAATGAATACGAAGTCTAC  
 AGTTTGCCCTGGAATGAAGCATGAGAACATATTACAGTTCATTGGTGCAGAAAAACGAGG  
 CACCAGTGTGATGTGGATCTTTGGCTGATCACAGCATTTCATGAAAAGGGTTCACTAT  
 CAGACTTTCTTAAGGCTAATGTGGTCTCTTGAATGAACTGTGT CATATTGCAGAAACC  
 ATGGCTAGAGGATTGGCATATTTACATGAGGATATACCTGGCCTAAAAGATGGCCACAA  
 ACCTGCCATATCTCACAGGGACATCAAAGTAAAATGTGCTGTTGAAAAACAACCTGA  
 CAGCTTGCATTGCTGACTTTGGGTTGGCCTTAAAATTTGAGGCTGGCAAGTCTGCAGGC  
 GATACCCATGGACAGGTTGGTACCCGGAGGTACATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTGC  
 TATAAACTTCAAAGGGATGCATTTTTGAGGATAGATATGTATGCCATGGGATTAGTCC  
 TATGGGAAC TGGCTTCTCGCTGTACTGCTGCAGATGGACCTGTAGATGAATACATGTTG  
 CCATTTGAGGAGGAAATTGGCCAGCATCCATCTCTTGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGT  
 GCATAAAAAAAGAGGCCTGTTTTAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGAATGGCAA  
 TGCTCTGTGAAACCATTGAAGAATGTTGGGATCACGACGCAGAAGCCAGGTTATCAGCT  
 GGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCAGAGACTAACAAATATTATTACCACAGA  
 GGACATTGTAACAGTGGTCACAATGGTGACAAATGTTGACTTTCCTCCCAAAGAATCTA  
 GTCTATGA (SEQ ID NO: 4)

A sequência de ácidos nucleicos que codifica um polipéptido solúvel de ActRIIa humana (extracelular) é como se segue:

ATACTTGGTAGATCAGAAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGA  
 CAGAACCAATCAAAC TGGTGTGAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATT  
 GTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTCCATTGAAATAGTGAACAAGGTTGTTGG  
 CTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGA  
 AGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCAG  
 AGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCC (SEQ ID  
 NO: 5)

Como aqui descrito, o termo "polipéptido ActRIIa solúvel" refere-se geralmente a polipéptidos compreendendo um domínio extracelular de uma proteína ActRIIa. O termo "polipéptido ActRIIa solúvel", conforme aqui usado, inclui qualquer domínio extracelular de ocorrência natural de uma proteína ActRIIa assim como quaisquer variantes desta (incluindo mutantes, fragmentos e formas peptidomiméticas). Um polipéptido ActRIIa de ligação a activina é um que retém a capacidade de se ligar a activina, particularmente activina AA, AB ou BB. Preferencialmente, um polipéptido ActRIIa de ligação a activina vai ligar-se à activina AA com uma constante de dissociação de 1 nM ou inferior. As sequências de aminoácidos da proteína precursora de ActRIIa humana são fornecidas abaixo. O domínio extracelular de uma proteína ActRIIa liga-se a activina e é geralmente solúvel, e assim pode ser denominado um polipéptido ActRIIa de ligação a activina, solúvel. Exemplos de polipéptidos ActRIIa de ligação a activina, solúveis, incluem o polipéptido solúvel ilustrado nas SEQ ID NOs: 2, 3, 7, 12 e 13. A SEQ ID NO:7 é referida como ActRIIa-hFc, e é descrita adicionalmente nos Exemplos. Outros exemplos de polipéptidos ActRIIa de ligação a activina, solúveis, compreendem uma sequência de sinal para além do domínio extracelular de uma proteína ActRIIa, por exemplo, sequência líder de melitina de abelha (SEQ ID NO: 8), a líder do activador de plasminogénio tecidual (TPA) (SEQ ID NO: 9) ou a líder de ActRIIa nativa (SEQ ID NO: 10). O polipéptido ActRIIa-hFc ilustrado na SEQ ID NO:13 usa uma líder TPA.

Fragmentos de polipéptidos ActRIIa funcionalmente ativos podem ser obtidos por análise de polipéptidos produzidos de forma recombinante a partir do fragmento correspondente do ácido nucleico que codifica um polipéptido ActRIIa. Para além disso, os fragmentos podem ser sintetizados

quimicamente usando técnicas conhecidas na técnica tais como química t-Boc ou f-Moc de fase sólida Merrifield convencional. Os fragmentos podem ser produzidos (de forma recombinante ou por síntese química) e testados para identificar aqueles fragmentos peptídico que podem funcionar como antagonistas (inibidores) da proteína ActRIIa ou sinalização mediada por activina.

Variantes funcionalmente ativas de polipéptidos ActRIIa podem ser obtidas por análise de bibliotecas de polipéptidos modificados de forma recombinante produzidos a partir de ácidos nucleicos mutagenizados correspondentes que codificam um polipéptido ActRIIa. As variantes podem ser produzidas e testadas para identificar aquelas que podem funcionar como antagonistas (inibidores) da proteína ActRIIa ou sinalização mediada por activina. Uma variante funcional dos polipéptidos ActRIIa pode compreender uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75% idêntica a uma sequência de aminoácidos selecionada a partir da SEQ ID NOs: 2 ou 3. Em certos casos, a variante funcional tem uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácidos selecionada a partir das SEQ ID NOs: 2 ou 3.

As variantes funcionais podem ser geradas por modificação da estrutura de um polipéptido ActRIIa para fins tais como melhorar a eficácia terapêutica, ou a estabilidade (por exemplo, prazo de validade em armazenamento ex vivo e resistência à degradação proteolítica in vivo). Esses polipéptidos ActRIIa modificados quando selecionados para reter a ligação activina, são considerados equivalentes funcionais dos polipéptidos ActRIIa de ocorrência natural. Polipéptidos ActRIIa modificados podem também ser produzidos, por exemplo, por substituição, deleção, ou adição de aminoácidos. Por exemplo, é razoável esperar que

uma substituição isolada de uma leucina por uma isoleucina ou valina, um aspartato por um glutamato, uma treonina por uma serina, ou uma substituição semelhante de um aminoácido por um aminoácido estruturalmente relacionado (por exemplo, mutações conservativas) não vai ter um grande efeito na atividade biológica da molécula resultante. Substituições conservativas são aquelas que ocorrem dentro de uma família de aminoácidos que são relacionados nas suas cadeias laterais. Se uma alteração na sequência de aminoácidos de todo o polipéptido ActRIIa resulta num homólogo funcional pode ser facilmente determinado avaliando a capacidade do polipéptido ActRIIa variante para produzir uma resposta em células de um modo semelhante ao do polipéptido ActRIIa de tipo selvagem.

Mutações específicas podem ser incluídas nos polipéptidos ActRIIa de modo a alterar a glicosilação do polipéptido. Essas mutações podem ser selecionadas de modo a introduzir ou eliminar um ou mais sítios de glicosilação, tais como sítios de glicosilação **ligados a O** ou ligados a N. Sítios de reconhecimento de glicosilação ligados a Asparagina geralmente compreendem uma sequência tripeptídica, asparagina-X-treonina (ou asparaginas-X-serina) (em que "X" é qualquer aminoácido) que é especificamente reconhecida por enzimas de glicosilação celular apropriadas. A alteração pode também ser feita por adição de, ou substituição por, um ou mais resíduos de serina ou treonina na sequência de polipéptido ActRIIa de tipo selvagem (por sítios de glicosilação ligados a O). Uma diversidade de substituições ou deleções de aminoácidos numa ou em ambas a primeira ou terceira posições de aminoácido de um sítio de reconhecimento de glicosilação (e/ou eliminação do aminoácido na segunda posição) resulta na não glicosilação na sequência tripeptídica modificada. Outro meio para aumentar o número de porções de hidrato de carbono num



polipéptido ActRIIa é por acoplamento químico ou enzimático dos glicósidos ao polipéptido ActRIIa. Dependendo do modo de acoplamento usado, o(s) açúcar(es) podem ser anexados à (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo livres; (c) grupos sulfidrilo livres tais como os da cisteína; (d) grupos hidroxilo livres tais como os da serina, treonina, ou hidroxiprolina; (e) resíduos aromáticos tais como os da fenilalanina, tirosina, ou triptofano; ou (f) o grupo amida da glutamina. Estes métodos são descritos na WO 87/05330 publicada em Sep. 11, 1987, e em Aplin and Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306. A remoção de uma ou mais porções de hidrato de carbono presentes num polipéptido ActRIIa pode ser realizada quimicamente e/ou enzimaticamente. A desglicosilação química pode envolver, por exemplo, a exposição do polipéptido ActRIIa ao composto ácido trifluorometanosulfônico, ou um composto equivalente. Este tratamento resulta na clivagem da maioria ou de todos os açúcares exceto o açúcar de ligação (N-acetilglucosamina ou N-acetilgalactosamina), deixando a sequência de aminoácidos intacta. A desglicosilação química é adicionalmente descrita por Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 e por Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131. A clivagem enzimática das porções de hidrato de carbono nos polipéptidos ActRIIa pode ser conseguida usando uma diversidade de endo- e exoglicosidases como descrito por Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. A sequência de um polipéptido ActRIIa pode ser ajustada, como apropriado, dependendo do tipo de sistema de expressão usado, como mamífero, levedura, inseto e células vegetais podem todos introduzir diferentes padrões de glicosilação que podem ser afetados pela sequência de aminoácidos do péptido. Em geral, as proteínas ActRIIa para uso em humanos vai ser expressa numa linha de células de mamífero que fornece glicosilação adequada, tal como HEK293 ou linhas de células CHO, embora

outras linhas celulares de expressão de mamífero, linhas celulares de leveduras com enzimas de glicosilação modificadas e células de inseto se espera que também sejam úteis.

É aqui descrito um método para gerar mutantes, particularmente conjuntos de mutantes combinatórios de um polipéptido ActRIIa, assim como mutantes de truncação; grupos de mutantes combinatórios são especialmente úteis para identificação de sequências variantes funcionais. O objetivo da análise de tais bibliotecas combinatórias pode ser gerar, por exemplo, variantes de polipéptidos ActRIIa que podem atuar como agonistas ou como antagonistas, ou em alternativa, que possuem novas catividades no seu conjunto. Uma variedade de ensaios de rastreio são fornecidas abaixo, e esses ensaios podem ser usados para avaliar as variantes. Por exemplo, uma variante do polipéptido ActRIIa pode ser analisada em relação à sua capacidade para se ligar a um ligando ActRlla, para prevenir a ligação de um ligando ActRIIa a um polipéptido ActRIIa ou para interferir com a sinalização causada por um ligando ActRlla.

A atividade de um polipéptido ActRlla ou as suas variantes pode também ser testada num ensaio in vivo ou à base de células. Por exemplo, o efeito de uma variante do polipéptido ActRlla pode ser avaliado na expressão dos genes envolvidos na produção de osso ou destruição de osso. Isto pode, conforme necessário, ser realizado na presença de uma ou mais proteínas de ligandos ActRlla recombinantes (por exemplo, activina), e as células podem ser transfectadas de modo a produzir um polipéptido ActRlla e/ou variantes destes, e opcionalmente, um ligando ActRlla. Do mesmo modo, um polipéptido ActRlla pode ser administrado a um rato ou outro animal, e a uma ou mais propriedades ósseas, tais como densidade ou volume podem ser avaliadas.

A taxa de cura para as fraturas ósseas podem também ser avaliadas. Absorciometria com Raio X de dupla energia (DEXA) é uma técnica bem estabelecida, não invasiva, quantitativa para medir a densidade óssea num animal. Em humanos, sistemas DEXA centrais podem ser usados para medir a densidade óssea na coluna e na pélvis. Estes são os melhores preditores de densidade óssea em geral. Os sistemas DEXA periféricos podem ser usados para medir a densidade óssea nos ossos periféricos, incluindo, por exemplo, os ossos das mãos, pulso, tornozelo e pé. Sistemas de imagem de raio X tradicionais, incluindo exames de TAC, podem ser usados para medir o crescimento ósseo e a consolidação de fraturas. A resistência mecânica do osso pode também ser avaliada.

Podem ser geradas variantes, derivadas de forma combinatória, que apresentam uma potência seletiva ou geralmente aumentada em relação a um polipéptido ActRIIa de ocorrência natural. Do mesmo modo, a mutagénese pode dar origem a variantes que têm semividas intracelulares dramaticamente diferentes do que o correspondente polipéptido ActRIIa de tipo selvagem. Por exemplo, a proteína alterada pode ser tornada ou mais estável ou menos estável à degradação proteolítica ou a outros processos celulares que resultam na destruição de, ou de outra forma, na inativação de um polipéptido ActRIIa nativo. Essas variantes, e os genes que as codificam, podem ser utilizadas para alterar os níveis de polipéptido ActRIIa através da modulação da semivida dos polipéptidos ActRIIa. Por exemplo, uma semivida curta pode dar origem a efeitos biológicos mais transitórios e pode permitir um controlo mais rigoroso dos níveis do polipéptido ActRIIa recombinante dentro do doente. Numa proteína de fusão Fc, as mutações podem ser feitas no ligante (se algum) e/ou na porção Fc para alterar a semivida da proteína.

Uma biblioteca combinatória pode ser produzida através de uma biblioteca degenerada de genes que codificam uma biblioteca de polipéptidos em que cada um inclui pelo menos uma porção de sequências de polipéptidos ActRIIa potenciais. Por exemplo, uma mistura de oligonucleótidos sintéticos pode ser enzimaticamente ligada a sequências de genes de tal forma que o conjunto degenerado de potenciais sequências de nucleótidos do polipéptido ActRIIa seja expressável como polipéptidos individuais, ou em alternativa, como um conjunto de proteínas de fusão maiores (por exemplo, para exibição em fagos).

Existem muitas vias através das quais a biblioteca de homólogos potenciais pode ser gerada a partir de uma sequência de oligonucleótidos degenerada. A síntese química de uma sequência de genes degenerada pode ser realizada num sintetizador automático de ADN, e os genes sintéticos são depois ligados num vetor apropriado para expressão. A síntese de oligonucleótidos degenerados é bem conhecida na técnica (ver por exemplo, Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al., (1981) *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura et al., (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al., (1984) *Science* 198:1056; Ike et al., (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477). Tais técnicas foram empregues na evolução dirigida de outras proteínas (ver, por exemplo, Scott et al., (1990) *Science* 249:386-390; Roberts et al., (1992) *PNAS USA* 89:2429-2433; Devlin et al., (1990) *Science* 249: 404-406; Cwirla et al., (1990) *PNAS USA* 87: 6378-6382; assim como as Patentes U.S. Nos: 5,223,409, 5,198,346, e 5,096,815).

Em alternativa, outras formas de mutagénese podem ser utilizada para gerar uma biblioteca combinatória. Por exemplo, variantes do polipéptido ActRIIa podem ser geradas

e isoladas a partir de uma biblioteca por rastreio usando, por exemplo, análise de mutagénese de alanina e afins (Ruf et al., (1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang et al., (1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balint et al., (1993) *Gene* 137:109-118; Grodberg et al., (1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashima et al., (1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892; Lowman et al., (1991) *Biochemistry* 30:10832-10838; e Cunningham et al., (1989) *Science* 244:1081-1085), por análise de mutagénese de ligante (Gustin et al., (1993) *Virology* 193:653-660; Brown et al., (1992) *Mol. Cell Biol.* 12:2644-2652; McKnight et al., (1982) *Science* 232:316); por mutagénese de saturação (Meyers et al., (1986) *Science* 232:613); por mutagénese de PCR (Leung et al., (1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19); ou por mutagénese aleatória, incluindo mutagénese química, etc. (Miller et al., (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSH L Press, Cold Spring Harbor, NY; e Greener et al., (1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34). A análise de mutagénese de ligante, particularmente num ambiente combinatório, é um método atrativo para identificar formas de polipéptidos ActRlla truncados (bioativas).

Uma vasta gama de técnicas são conhecidas na técnica para triar produtos genéticos de bibliotecas combinatórias feitas por mutações e truncamentos pontuais, e para triagem das bibliotecas de cADN para produtos genéticos com uma determinada propriedade. Tais técnicas serão geralmente adaptáveis para triagem rápida de bibliotecas de genes geradas pela mutagénese combinatória dos polipéptidos ActRlla. As técnicas mais amplamente usadas para triar grandes bibliotecas de genes compreendem tipicamente clonar a biblioteca de genes em vetores de expressão replicáveis, transformação em células apropriadas com os resultantes vetores de biblioteca, e expressão dos genes combinatórios sob condições nas quais a deteção de uma atividade desejada

facilita o isolamento relativamente fácil do vetor que codifica o gene cujo produto foi detetado. Ensaio preferidos incluem ensaios de ligação a activina e ensaio de sinalização celular mediada por activina.

Os polipéptidos ActRIIa da invenção podem compreender adicionalmente modificações pós-tradução para além das que estão naturalmente presentes nos polipéptidos ActRIIa. Tais modificações incluem, mas não estão limitadas a, acetilação, carboxilação, glicosilação, fosforilação, lipidação, e acilação. Como resultado, os polipéptidos ActRIIa modificados podem conter elementos que não aminoácidos, tais como polietileno glicóis, lípidos, poli ou monossacáridos, e fosfatos. Os efeitos desses elementos não-aminoácidos na funcionalidade de um polipéptido ActRIIa podem ser testados como aqui descrito para outras variantes de polipéptido ActRIIa. Quando um polipéptido ActRIIa é produzido em células por clivagem de uma forma emergente do polipéptido ActRIIa, o processamento pós-tradução pode também ser importante para a dobragem correta e/ou função da proteína. Células diferentes (tais como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 ou HEK293) têm maquinaria celular específica e mecanismos característicos para essas atividades pós-tradução e podem ser escolhidos para assegurar a correta modificação e processamento dos polipéptidos ActRIIa.

Variantes funcionais ou formas modificadas dos polipéptidos ActRIIa podem incluir proteínas de fusão com pelo menos uma porção dos polipéptidos ActRIIa e um ou mais domínios de fusão. Exemplos bem conhecidos de tais domínios de fusão incluem, mas não são limitados a, polihistidina, Glu-Glu, glutathione S transferase (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G, uma região constante da cadeia pesada de imunoglobulina (Fc), proteína de ligação a maltose (MBP),

ou albumina do soro humana. Um domínio de fusão pode ser selecionado de modo a conferir uma propriedade desejada. Por exemplo, alguns domínios de fusão são particularmente úteis para o isolamento das proteínas de fusão por cromatografia de afinidade. Para efeitos de purificação por afinidade, são usadas matrizes relevantes para a cromatografia de afinidade, tais como resinas conjugadas com glutationa, amilase., e níquel ou cobalto. Muitas dessas matrizes estão disponíveis na forma de um "kit", tais como os sistemas de purificação de Pharmacia GST e o sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil com parceiros de fusão (HIS<sub>6</sub>). Como outro exemplo, um domínio de fusão pode ser selecionado de modo a facilitar a detecção dos polipéptidos ActRIIa. Exemplos de tais domínios de detecção incluem as várias proteínas fluorescentes (por exemplo, GFP) assim como "marcadores de epitopo." Que são normalmente sequências peptídicas curtas para as quais está disponível um anticorpo específico. Marcadores de epitopo bem conhecidos para os quais anticorpos monoclonais específicos estão facilmente disponíveis incluem FLAG, hemaglutinina do vírus influenza (HA), e marcadores c-myc. Em alguns casos, os domínios de fusão têm um sítio de clivagem de protease, tal como para o Fator Xa ou Trombina, que permite que a protease relevante digira parcialmente as proteínas de fusão e desse modo libertar daí as proteínas recombinantes. As proteínas libertadas podem ser então isoladas em relação ao domínio de fusão por subsequente separação cromatográfica. Um polipéptido ActRIIa pode ser fundido com um domínio que estabilize o polipéptido ActRIIa in vivo (um domínio "estabilizador"). Por "estabilização" entende-se qualquer coisa que aumente a semivida sérica, independentemente de se for por diminuição da destruição, redução da depuração pelo rim, ou outro efeito farmacocinético. As fusões com a porção Fc de uma imunoglobulina são conhecidas por conferir propriedades

farmacocinéticas desejáveis numa ampla variedade de proteínas. Do mesmo modo, as fusões à albumina do soro humano podem conferir propriedades desejáveis. Outros tipos de domínios de fusão que podem ser selecionados incluem domínios de multimerização (por exemplo, dimerização, tetramerização) de domínios e domínios funcionais (que conferem uma função biológica adicional, tal como estimulação adicional do crescimento ósseo ou do crescimento do músculo, como desejado).

Como um exemplo específico, uma proteína de fusão pode compreender um domínio extracelular solúvel de ActRIIa fundido a um domínio Fc (por exemplo, SEQ ID NO: 6).  
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD(A)VSHEDPEVKENWY- VDG  
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A)VSNKALPVPIEKTISKAK  
 GQPREPQVYITLP- PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG  
 PFFLYSKLTVDKSRWQQGMVFSCSV- MHEALHN(A)HYTQKSLSLSPGK\*

Opcionalmente, o domínio Fc tem uma ou mais mutações em resíduos tais como Asp-265, lisina 322, e Asn-434. Em certos casos, o domínio Fc mutante com uma ou mais destas mutações (por exemplo, mutação Asp-265) tem capacidade reduzida de ligação ao recetor Fcγ em relação a um domínio Fc de tipo selvagem. Em outros casos, o domínio Fc mutante com uma ou mais destas mutações (por exemplo, mutação Asn-434) tem maior capacidade de ligação ao recetor Fc relacionado com MHC classe I (FcRN) em relação a um domínio Fc de tipo selvagem.

É entendido que diferentes elementos das proteínas de fusão podem ser arrançados de qualquer maneira que seja consistente com a funcionalidade desejada. Por exemplo, um polipéptido ActRIIa pode ser colocado no C-terminal de um domínio heterólogo, ou, em alternativa, um domínio heterólogo pode ser colocado no C-terminal a um polipéptido



ActRIIa. O domínio do polipéptido ActRIIa e o domínio heterólogo não precisam de ser adjacentes numa proteína de fusão, e domínios adicionais ou sequências de aminoácidos podem ser incluídos no C ou N terminais de qualquer domínio ou entre os domínios.

Em certas formas de realização, os polipéptidos ActRIIa da presente invenção contêm uma ou mais modificações que são capazes de estabilizar os polipéptidos ActRIIa. Por exemplo, essas modificações melhoram a semivida *in vitro* dos polipéptidos ActRIIa, melhoram a semivida circulatória dos polipéptidos ActRIIa ou reduzem a degradação proteolítica dos polipéptidos ActRIIa. Essas modificações estabilizantes incluem, mas não são limitadas a; proteínas de fusão (incluindo, por exemplo, proteínas de fusão compreendendo um polipéptido ActRIIa e um domínio estabilizador), modificações de um sítio de glicosilação (incluindo, por exemplo, a adição de um sítio de glicosilação a um polipéptido ActRIIa), e modificações da porção de hidrato de carbono (incluindo por exemplo, a remoção das porções hidrato de carbono de um polipéptido ActRIIa). No caso das proteínas de fusão, um polipéptido ActRIIa é fundido a um domínio estabilizador tal como uma molécula IgG (por exemplo, um domínio Fc). Como aqui usado, o termo "domínio estabilizador" não se refere somente a um domínio de fusão (por exemplo, Fc) como no caso das proteínas de fusão, mas também inclui modificações não proteicas tais como uma porção hidrato de carbono, ou polímero não proteico, tal como polietileno glicol.

Formas isoladas e/ou purificadas dos polipéptidos ActRIIa, podem ser isoladas em relação a, ou de outra forma substancialmente livres de, outras proteínas. Os polipéptidos ActRIIa serão geralmente produzidos por expressão de ácidos nucleicos recombinantes.

3. Ácidos nucleicos que codificam Polipéptidos ActRIIa (não faz parte da invenção)

São aqui divulgados ácidos nucleicos isolados e/ou recombinantes que codificam qualquer dos polipéptidos ActRIIa (por exemplo, os polipéptidos ActRIIa solúveis), incluindo fragmentos, variantes funcionais e proteínas de fusão aqui divulgadas. Por exemplo, a SEQ ID NO: 4 codifica os polipéptidos precursores de ActRIIa humano de origem natural, enquanto que a SEQ ID NO: 5 codifica o domínio de ActRIIa extracelular processado. Os ácidos nucleicos em questão podem ser de cadeia linear ou de cadeia dupla. Tais ácidos nucleicos podem ser moléculas de ADN ou ARN. Estes ácidos nucleicos podem ser usados, por exemplo, em métodos para produzir polipéptidos ActRIIa ou como agentes terapêuticos diretos (por exemplo, numa abordagem de terapia genética).

Em certos aspetos, os presentes ácidos nucleicos que codificam polipéptidos ActRIIa são adicionalmente entendidos para incluir ácidos nucleicos que são variantes de SEQ ID NO: 4 ou 5. Sequências de nucleótidos variantes incluem sequências que diferem num ou mais substituições, adições ou deleções de nucleotídeos, tais como variantes alélicas.

São aqui divulgados também os isolados ou sequências de ácidos nucleicos recombinantes que são pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 100% idênticos às SEQ ID NO: 4 ou 5. Um comum especialista na técnica entenderá que a sequência de ácidos nucleicos complementar às SEQ ID NO: 4 ou 5, e as variantes de SEQ ID NO: 4 ou 5 podem ser fornecidos. A sequência de ácido nucleicos aqui divulgada pode ser isolada, recombinante, e/ou fundida com uma

sequência de nucleótidos heterólogos, ou numa biblioteca ADN.

Os ácidos nucleicos podem também incluir sequências de nucleótidos que hibridam sob condições altamente restritas da sequência de nucleótidos designada na SEQ ID NO: 4 ou 5 complementa a sequência das SEQ ID NO: 4 ou 5, ou fragmentos destas. Como discutido acima, um dos comuns especialistas na técnica compreenderão rapidamente que as condições de restrição apropriadas que promovem a hibridização de ADN podem ser variáveis. Um comum especialista na técnica entenderá rapidamente que aquelas condições restritivas apropriadas que promovem hibridação de ADN podem ser variáveis. Por exemplo, pode realizar-se a hibridação a 6,0 x cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) a cerca de 45°C, seguido por uma lavagem de 2,0 x SSC a 50°C. Por exemplo, a concentração de sal no passo de lavagem pode ser selecionada a partir de um baixo rigor de cerca de 2,0 x SSC a 50 °C para um alto rigor cerca de 0,2 x SSC a 50 °C. Para além disso, a temperatura no passo de lavagem pode ser aumentada a partir de condições de baixo rigor à temperatura ambiente, cerca de 22 °C, até condições de alto rigor a cerca de 65°C. Tanto a temperatura como o sal podem variar, ou a temperatura ou a concentração de sal podem ser mantidas constantes enquanto que a outra variável é variada. São aqui descritos ácidos nucleicos os quais hibridam sob condições de baixo rigor de 6 x SSC à temperatura ambiente seguido por uma lavagem em 2 x SSC à temperatura ambiente.

Os ácidos nucleicos isolados que diferem dos ácidos nucleicos como estabelecido nas SEQ ID NOs: 4 ou 5 devido à degeneração no código genético são também aqui divulgados. Por exemplo, vários aminoácidos são designados por mais de um triplete. Codões que especificam o mesmo aminoácido, ou

sinónimos (por exemplo, CAU e CAC são sinónimos da histidina) podem resultar em mutações “silenciosas” as quais não afetam a sequência de aminoácidos da proteína. Porém, é esperado que os polimorfismos da sequência de ADN que levam a alterações na sequência de aminoácidos das proteínas em questão existirão entre as células de mamífero. Um especialista na técnica apreciará que estas variações num ou mais nucleótidos (até cerca de 3-5% dos nucleótidos) dos ácidos nucleicos que codificam uma proteína particular pode existir entre indivíduos de uma dada espécie devido a variação alélica natural.

Os ácidos nucleicos recombinantes aqui divulgados podem estar operativamente ligados a uma ou mais sequências reguladoras de nucleótidos numa construção de expressão. As sequências reguladoras de nucleótidos serão geralmente apropriadas para a célula hospedeira usada para a expressão. Numerosos tipos de vetores de expressão apropriados e sequências reguladoras adequadas são conhecidas na técnica para uma diversidade de células hospedeiras. Tipicamente, as referidas uma ou mais sequências reguladoras de nucleótidos podem incluir mas não são limitadas a, sequências promotoras, sequências de comando ou de sinal, sítios de ligação ribossômicas, sequências de início e de terminação de transcrição, sequências de iniciação e terminação de tradução, e sequências intensificadoras ou ativadoras. São contemplados promotores constitutivos ou indutíveis conhecidos na técnica.

Os promotores podem ser ou promotores de origem natural, ou promotores híbridos que combinam elementos de mais que um promotor. Uma construção de expressão pode estar presente numa célula em um epissoma, tal como um plasmídeo, ou a construção de expressão pode ser inserida num cromossoma. O vetor de expressão pode conter um gene marcador

selecionável que permite a seleção de células hospedeiras transformadas. Genes marcadores selecionáveis são bem conhecidos na técnica e irão variar com a célula hospedeira usada.

O ácido nucleico pode ser fornecido num vetor de expressão compreendendo uma sequência de nucleótidos que codificam um polipéptido ActRIIa e ligado operativamente a pelo menos uma sequência reguladora. Sequências reguladoras são reconhecidas na técnica e são selecionados para a expressão direta do polipéptido ActRIIa. Em conformidade, o termo sequência reguladora inclui promotores, potenciadores, e outros elementos de controlo de expressão. Exemplos de sequências reguladoras são descritas em Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por exemplo, qualquer de uma variedade de sequências de controlo de expressão que controlam a expressão de uma sequência de ADN quando operacionalmente ligada a ela pode ser usada nestes vetores para expressar sequências de ADN que codificam um polipéptido ActRIIa. Tais sequências de controlo de expressão úteis, incluem, por exemplo, os promotores precoces e tardios de SV40, promotor tet, promotor precoce imediato de adenovírus ou citomegalovírus, promotores de RSV, o sistema lac, o sistema trp, o sistema TAC ou TRC, promotores T7 cuja expressão é direcionada por T7 ARN polimerase, o operador principal e regiões de promotores do fago lambda, as regiões de controlo para proteína de revestimento fd, o promotor para 3-fosfoglicerato quinase ou outras enzimas glicolíticas, os promotores de fosfatase ácida, por exemplo, Pho5, os promotores fatores de acoplamento da levedura, o promotor poliedro do sistema de baculovírus e outras sequências conhecidas para controlar a expressão dos genes de células procarióticas ou eucariótica ou os seus vírus, e várias combinações destes. Deve ser

entendido que a concepção do vetor de expressão pode depender de tais fatores como a escolha da célula hospedeira a ser transformada e/ou o tipo de proteína que é desejado que seja expressada. Além disso, o número de cópia do vetor, a capacidade de controlar aquele número de cópia e a expressão de qualquer outra proteína codificada pelo vetor, tais como marcadores de antibiótico, devem também ser consideradas.

Um ácido nucleico recombinante pode ser produzida ligando o gene clonado, ou uma parte da mesma, num vetor adequado para expressão tanto em células procarióticas, células eucarióticas (levedura, das aves, inseto ou mamífero), ou ambas. Os veículos de expressão para produção de um polipéptido ActRIIa recombinante incluem plasmídeos e outros vetores. Por exemplo, vetores adequados incluem plasmídeos dos tipos: plasmídeos derivados de pBR322, plasmídeos derivados de pEMBL, plasmídeos derivados de pEX, plasmídeos derivados de pBTac e plasmídeos derivados de pUC para expressão em células procarióticas, tais como *E. coli*.

Alguns vetores de expressão de mamífero contêm sequências procarióticas para facilitar a propagação do vetor em bactérias, e uma ou mais unidades de transcrição eucarióticas que são expressas nas células eucarióticas. Os vetores derivados pCDNAI/amp, pCDNAI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo e pHyg são exemplos de vetores de expressão de mamíferos adequados para transfeção de células eucarióticas. Alguns desses vetores são modificados com sequências dos plasmídeos bacterianos, tais como pBR322, para facilitar a replicação e seleção de resistência a fármacos tanto em células procarióticas como eucarióticas. Em alternativa, derivados de vírus tais como o vírus do papiloma bovino (BPV-1), ou vírus Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP e

p205) podem ser usados para expressão transiente de proteínas em células eucarióticas. Exemplos de outros sistemas de expressão viral (incluindo retroviral) podem ser encontrados a seguir na descrição de sistemas de distribuição de terapia de genes. Os vários métodos empregues na preparação dos plasmídeos e na transformação de organismos hospedeiros são bem conhecidos na técnica. Para outros sistemas de expressão adequados tanto para as células procarióticas como eucarióticas, assim como procedimentos recombinantes gerais ver *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3<sup>a</sup> Ed., ed. por Sambrook, Fritsch e Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). Em alguns casos, pode ser desejável expressar os polipéptidos recombinantes pelo uso de um sistema de expressão de baculovírus. Exemplos desses sistemas de expressão de baculovirus incluem vetores derivados de pVL (tais como pVL1392, pVL1393 e pVL941), vetores derivados de pAcUW (tais como pAcUW1), e vetores derivados de pBlueBac (tais como pBlueBac III contendo  $\beta$ -gal).

Um vetor pode ser projetado para produção dos polipéptidos ActRIIa nas células CHO, tais como um vetor Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), vetores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) e vetores pCl-neo (Promega, Madison, Wisc.). Como será evidente, a construção de gene em questão pode ser usada para causar expressão dos polipéptidos ActRIIa em questão em células propagadas em cultura, por exemplo, para produzir proteínas, incluindo proteínas de fusão ou proteínas variantes, para purificação.

É também divulgada uma célula hospedeira transfetada com um gene recombinante incluindo uma sequência de codificação (por exemplo, SEQ ID NO: 4 ou 5) para um ou mais dos polipéptidos ActRIIa em questão. A célula hospedeira pode ser qualquer célula procariótica ou eucariótica. Por

exemplo, um polipéptido ActRIIa pode ser expressado em células bacterianas tais como *E. coli*, células de inseto (por exemplo, usando um sistema de expressão de baculovírus), levedura, ou células de mamífero. Outras células hospedeiras adequadas são conhecidas dos especialistas na técnica.

São aqui divulgados métodos de produção dos polipéptidos ActRIIa em questão. Por exemplo, a célula hospedeira transfetada com um vetor de expressão que codifica um polipéptido ActRIIa pode ser cultivada sob condições apropriadas para permitir que ocorra a expressão do polipéptido ActRIIa. O polipéptido ActRIIa pode ser segregado e isolado a partir de uma mistura de células e meio contendo o polipéptido ActRIIa. Em alternativa, o polipéptido ActRUa pode ser retido citoplasmicamente ou numa fração de membrana e as células colhidas, lisadas e a proteína isolada. Uma cultura de células inclui células hospedeiras, meios e outros subprodutos. Meios adequados para cultura de células são bem conhecidos na técnica. Os polipéptidos ActRIIa em questão podem ser isolados a partir de meio de cultura de células, de células hospedeiras, ou ambas, usando técnicas conhecidas na técnica para purificar proteínas, incluindo cromatografia conhecida de troca iônica, cromatografia de filtração em gel, ultrafiltração, eletroforese, purificação por imunoafinidade com anticorpos específicos para epitopos particulares dos polipéptidos ActRIIa e purificação por afinidade com um agente que se liga a um domínio ligado ao polipéptido ActRIIa (por exemplo, pode ser usada uma coluna de proteína A para purificar uma fusão ActRIIa-Fc). O polipéptido ActRIIa pode ser uma proteína de fusão contendo um domínio que facilita a sua purificação. A purificação pode ser obtida por uma série de passos de cromatografia de coluna, incluindo, por exemplo, três ou mais dos seguintes, por qualquer ordem:



cromatografia de proteína A, cromatografia de sefarose Q, cromatografia de fenilsefarose, cromatografia de exclusão de tamanho, e cromatografia de troca catiónica. A purificação pode ser completada com filtração de vírus e tampão de troca. Como aqui demonstrado, a proteína ActRIIa-hFc foi purificada até uma pureza de >98% como determinado por cromatografia de exclusão de tamanho e >95% como determinado por SDS PAGE. Este nível de pureza foi suficiente para obter desejáveis efeitos no osso em ratos e num perfil de segurança aceitável em rato, ratazanas e primatas não humanos.

A fusão de codificação de uma sequência de purificação líder, tal como uma sequência do local de clivagem poli-(His)/enteroquinase no N-terminal da porção desejada do polipéptido ActRIIa recombinante, pode permitir a purificação da proteína de fusão expressa por cromatografia de afinidade usando uma resina de metal  $Ni^{2+}$ . A sequência líder de purificação pode então ser subsequentemente removida por tratamento com enteroquinase para dar um polipéptido ActRIIa purificado (por exemplo, ver Hochuli et al., (1987) J. Chromatography 411 :177; e Janknecht et al., PNAS USA 88:8972).

Técnicas para fazer genes de fusão são bem conhecidas. Essencialmente, a junção de vários fragmentos de ADN que codifica diferentes sequências de polipéptidos é realizada de acordo com técnicas convencionais, empregando terminais de extremidade romba ou de extremidade em ziguezague para ligação, digestão com enzima de restrição para fornecer terminais apropriados, preenchimento dos extremos coesivos como apropriado, tratamento por fosfatase alcalina para evitar a indesejável adesão, e ligação enzimática. O gene de fusão pode ser sintetizado por técnicas convencionais incluindo sintetizadores de ADN automatizados. Em

alternativa, a amplificação de PCR de fragmentos de genes pode ser realizada usando primers de âncora que dão origem a saliências complementares entre dois fragmentos de gene consecutivos os quais podem subsequentemente ser emparelhados para gerar uma sequência de gene quiméricos (ver, por exemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

#### 4. Antagonistas de Activina e de ActRIIa Alternativos (não faz parte da invenção)

Os dados aqui apresentados demonstram que os antagonistas de sinalização de activina-ActRIIa podem ser usados para promover o crescimento ósseo e a mineralização do osso. Embora sejam aqui descritos certos polipéptidos ActRIIa solúveis, e particularmente ActRIIa-Fc, e embora esses antagonistas possam afetar o osso através de um mecanismo de antagonismo da activina (por exemplo, a inibição da activina pode ser um indicador da tendência de um agente para inibir as atividades de um espectro de moléculas, incluindo, talvez, outros membros da superfamília TGF-beta, e a tal inibição coletiva pode conduzir ao desejado efeito no osso) outros tipos de antagonistas de activina-ActRIIa espera-se que sejam úteis, incluindo anticorpos anti-activina (por exemplo, A, B, C ou E), anticorpos anti-ActRIIa, anti-sentido, RNAi ou ácidos nucleicos de ribozima que inibem a produção de ActRIIa e outros inibidores da activina ou ActRIIa, particularmente aqueles que perturbam a ligação activina-ActRIIa.

Um anticorpo que é especialmente reativo com um polipéptido ActRIIa (por exemplo, um polipéptido ActRIIa solúvel) e que ou se liga competitivamente ao ligando com o polipéptido ActRIIa ou, pelo contrário, inibe a sinalização mediada por ActRIIa, pode ser usado como um antagonista das atividades

do polipéptido ActRIIa. Do mesmo modo, um anticorpo que é especialmente reativo com um polipéptido activina A e que destrói a ligação a ActRIIa pode ser usado como um antagonista.

Usando imunogénios derivados de um polipéptido ActRIIa ou um polipéptido activina, antissoros anti-proteína/anti-péptido ou anticorpos monoclonais podem ser feitos através de protocolos padrão (ver, por exemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. por Harlow e Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Um mamífero, tal como um rato, um hamster ou coelho pode ser imunizado com uma forma imunogénica do polipéptido ActRIIa, um fragmento antigénico que é capaz de eliciar uma resposta de anticorpo, ou uma proteína de fusão. Técnicas para conferir a imunogenicidade numa proteína ou péptido incluem a conjugação com transportadores ou outras técnicas bem conhecidos na técnica. Uma porção imunogénica de um polipéptido ActRIIa ou activina pode ser administrada na presença do adjuvante. O progresso da imunização pode ser monitorizado pela detecção de tituladores de anticorpos em plasma ou soro. Um ELISA padrão de outro imunoensaio pode ser usado com o imunogénio como antigénio para medir os níveis de anticorpos.

A seguir à imunização de um animal com uma preparação antigénica de um polipéptido ActRIIa, podem ser obtidos os antissoros e, se desejado, os anticorpos policlonais podem ser isolados a partir do soro. Para produzir anticorpos monoclonais, as células produtoras de anticorpos (linfócitos) podem ser colhidas a partir de um animal imunizado e fundidas por procedimentos de fusão de células somáticas com células imortalizando as tais células de mieloma para produzir células de hibridoma. Essas técnicas são bem conhecidas na técnica, e incluem, por exemplo, a

técnica do hibridoma (originalmente desenvolvidas por Kohler e Milstein, (1975) *Nature*, 256: 495-497), a técnica do hibridoma humano das células B (Kozbar et al., (1983) *Immunology Today*, 4: 72), e a técnica do hibridoma EBV para produzir anticorpos monoclonais humanos (Cole et al., (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96). As células de hibridoma podem ser triadas imunoquimicamente para produção de anticorpos especialmente reativos com um polipéptido ActRIIa e anticorpos monoclonais isolados a partir de uma cultura compreendendo essas células de hibridoma.

O termo "anticorpo" como aqui usado é entendido para incluir fragmentos deles os quais são também especialmente reativos com o polipéptido em questão. Os anticorpos podem ser fragmentados usando técnicas convencionais e os fragmentos triados quanto à utilidade do mesmo modo descrito acima para todos os anticorpos. Por exemplo, os fragmentos F(ab)2 podem ser gerados por tratamento de anticorpo com pepsina. O fragmento resultante F(ab)2 pode ser tratado para reduzir pontes dissulfito para produzir o fragmento Fab. Os anticorpos aqui divulgados são também entendidos para incluir moléculas biespecíficas, de cadeia simples, quiméricas, humanizadas e totalmente de humano com afinidade para o polipéptido ActRIIa ou activina conferida por pelo menos uma região CDR do anticorpo. Um anticorpo pode compreender adicionalmente um marcador aí ligado e capaz de ser detetado (por exemplo, o marcador pode ser um radioisótopo, composto fluorescente, enzima ou cofator enzimático).

Um anticorpo pode ser um anticorpo recombinante, cujo termo engloba qualquer anticorpo gerado em parte por técnicas de biologia molecular, incluindo anticorpos enxertados em CDR ou quiméricos, humanos ou outros anticorpos reunidos a

partir de domínios de anticorpo da biblioteca selecionada, anticorpos de cadeia simples e anticorpos de domínio único (por exemplo, proteínas  $V_H$  humanas ou proteínas  $V_{HH}$  de camelídeo). O anticorpo pode ser um anticorpo monoclonal, e são aqui divulgados métodos para gerar novos anticorpos. Por exemplo, um método para gerar um anticorpo monoclonal que se liga especificamente a um polipéptido ActRIIa ou polipéptido activina pode compreender a administração a um rato de uma quantidade de uma composição imunogénica compreendendo o polipéptido antigénio eficaz para estimular uma resposta imune detetável, obtendo células produtoras de anticorpo (por exemplo, células do baço) a partir de rato e fundindo as células produtoras de anticorpo com células de mieloma para obter hibridomas produtores de anticorpo, e testar os hibridomas produtores de anticorpo para identificar um hibridoma que produz um anticorpo monoclonal que se liga especificamente ao antigénio. Uma vez obtido, um hibridoma pode ser propagado na cultura de células, opcionalmente em condições de cultura em que as células derivadas de hibridoma produzem o anticorpo monoclonal que se liga especificamente ao antigénio. O anticorpo monoclonal pode ser purificado a partir de cultura de células.

O adjetivo "especialmente reativo com" como usado em referência a um anticorpo é entendido para significar, como é geralmente entendido na técnica, que o anticorpo é suficientemente seletivo entre o antigénio de interesse (por exemplo; um polipéptido ActRIIa) e outros antigénios que não são de interesse que o anticorpo é útil para, no mínimo detetar a presença do antigénio de interesse num tipo particular de amostra biológica. Em certos métodos empregando o anticorpo, tais como aplicações terapêuticas, um grau mais elevado de especificidade de ligação pode ser desejável. Os anticorpos monoclonais geralmente têm uma

maior tendência (em comparação com anticorpos policlonais) para discriminar efetivamente entre os antígenos desejados e os polipéptidos de reação cruzada. Uma característica que influencia a especificidade de uma interação anticorpo:antígeno é a afinidade do anticorpo para o antígeno. Embora a especificidade desejada possa ser conseguida com uma gama de afinidades diferentes, geralmente anticorpos preferidos terão uma afinidade (uma constante de dissociação) de cerca de  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  ou inferior. Dada a extraordinária ligação forte entre activina e ActRIIa, é esperado que um anticorpo neutralizante anti-activina ou anti-ActRIIa tenha geralmente uma constante de dissociação de  $10^{-10}$  ou inferior.

Adicionalmente, as técnicas usadas para triar anticorpos de modo a identificar um anticorpo desejável pode influenciar as propriedades do anticorpo obtido. Por exemplo, se um anticorpo é para ser usado para ligar um antígeno em solução, pode ser desejável testar a ligação em solução. Uma variedade de técnicas diferentes estão disponíveis para testar a interação entre anticorpos e antígenos para identificar anticorpos particularmente desejáveis. Essas técnicas incluem ELISAs, ensaios de ligação de ressonância plasmônica de superfície (por exemplo, o ensaio de ligação Biacore™, Biacore AB, Uppsala, Suécia), ensaios em sanduíche (por exemplo, o sistema de esferas paramagnéticas da IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), western blots, ensaios de imunoprecipitação, e imunohistoquímica.

Exemplos de categorias de compostos de ácido nucleico que são antagonistas da activina ou da ActRIIa incluem ácidos nucleicos antisentido, construções RNAi e construções de ácido nucleico catalítico. Um composto de ácido nucleico

pode ser de cadeia simples ou dupla. Um composto de cadeia dupla pode também incluir regiões de saliência ou não complementaridade, em que uma ou a outra das cadeias é de cadeia simples. Um composto de cadeia simples pode incluir regiões de auto-complementaridade, significando que o composto forma uma estrutura chamada "grampo" ou "ansa pedunculada", com uma região de estrutura helicoidal dupla. Um composto de ácido nucleico pode compreender uma sequência de nucleótidos que é complementar a uma região que consiste em não mais de 1000, não mais de 500, não mais de 250, não mais de 100 ou não mais de 50, 35, 30, 25, 22, 20 ou 18 nucleótidos da sequência de ácido nucleico ActRIIa de comprimento total ou sequência de ácido nucleico de activina  $\beta$ A ou activina  $\beta$ B. A região de complementaridade terá preferencialmente pelo menos 8 nucleótidos, e opcionalmente pelo menos 10 ou pelo menos 15 nucleótidos, e opcionalmente entre 15 e 25 nucleótidos. Uma região de complementaridade pode calhar dentro de um intrão, uma sequência codificante ou uma sequência não codificante do transcrito alvo, tal como a porção da sequência codificante. Geralmente, um composto de ácido nucleico deverá ter um comprimento de cerca de 8 até cerca de 500 nucleótidos ou pares de bases de comprimentos, e opcionalmente o comprimento deve ser cerca de 14 até cerca de 50 nucleótidos. Um ácido nucleico pode ser um ADN (particularmente para uso como um antisentido), ARN ou híbrido ARN:ADN. Qualquer uma das cadeias pode incluir uma mistura de ADN e ARN, bem como formas modificadas que não podem ser facilmente classificadas como ADN ou ARN. Do mesmo modo, um composto de cadeia dupla pode ser ADN:ADN, ADN:ARN ou ARN:ARN, e qualquer uma das cadeia pode também incluir uma mistura de ADN e ARN, bem como formas modificadas que não podem ser facilmente classificadas como ADN ou ARN. Um composto de ácido nucleico pode incluir qualquer uma de uma diversidade de modificações, incluindo

uma ou modificações da estrutura (a porção de açúcar-fosfato num ácido nucleico natural, incluindo ligações internucleotídicas) ou a porção de base (a porção purina ou pirimidina de um ácido nucleico natural). Um composto de ácido nucleico antisentido irá preferencialmente ter um comprimento de cerca de 15 até cerca de 30 nucleótidos e muitas vezes contém uma ou mais modificações para melhorar características tais como a estabilidade no soro, numa célula ou num local onde o composto é igualmente para ser aplicado, tal como estômago, no caso de compostos fornecidos oralmente e pulmão para compostos inalados. No caso de uma construção de ARNi, a cadeia complementar ao transcrito alvo irá geralmente ser ARN ou modificações deste. A outra cadeia pode ser ARN, ADN ou qualquer outra variação. A porção duplex da construção "grampo" de ARNi de cadeia dupla ou de cadeia simples deverá preferencialmente ter um comprimento de 18 até 40 nucleótidos de comprimento e opcionalmente cerca de 21 até 23 nucleótidos de comprimento, desde que sirva como um substrato de Dicer. Ácidos nucleicos catalíticos ou enzimáticos podem ser ribozimas ou enzimas de ADN e podem também conter formas modificadas. Compostos de ácido nucleico podem inibir a expressão do alvo em cerca de 50%, 75%, 90% ou mais quando contactado com células sob condições fisiológicas e a uma concentração onde um controlo sem sentido ou de sentido tem pouco ou nenhum efeito. Concentrações preferidas para testar o efeito de compostos de ácido nucleico são 1,5 e 10 micromolares. Os compostos de ácido nucleico podem também ser testados quanto aos efeitos sobre, por exemplo, o crescimento ósseo e a mineralização.

##### 5. Ensaio de rastreio (não faz parte da invenção)

Polipéptidos ActRIIa (por exemplo, polipéptidos ActRIIa solúveis) e polipéptidos de activina podem ser usados para



identificar compostos (agentes) que são agonistas ou antagonistas da via de sinalização da activina-ActRIIa. Os compostos identificados por este rastreio podem ser testados para avaliar a sua capacidade para modular o crescimento ósseo ou a mineralização *in vitro*. Opcionalmente, estes compostos podem ser adicionalmente testados em modelos animais não humanos para avaliar a sua capacidade para modular o crescimento de tecido *in vivo*.

Existem numerosas abordagens para triagem de agentes terapêuticos para modular o crescimento de tecidos tendo com alvo a activina e polipéptidos ActRIIa. O rastreio de alto capacidade de compostos pode ser realizado para identificar agentes que perturbam os efeitos mediados por activina ou por ActRIIa no osso. Em certos casos, o ensaio é realizado para rastrear e identificar compostos que inibem especificamente ou reduzem a ligação de um polipéptido ActRIIa a activina. Em alternativa, o ensaio pode ser usado para identificar compostos que melhoram a ligação de um polipéptido ActRIIa à activina. Os compostos podem ser identificados quanto à sua capacidade para interagir com uma activina ou polipéptido ActRIIa.

Uma variedade de formatos de ensaios serão suficientes e, à luz da presente divulgação, aqueles não expressamente descritos aqui serão, contudo, compreendidos por um comum especialista na técnica. Como aqui descrito, os compostos de teste (agentes) podem ser criados por qualquer método químico combinatório. Em alternativa, os compostos em questão podem ser biomoléculas de ocorrência natural sintetizadas *in vivo* ou *in vitro*. Os compostos (agentes) a serem testados quanto à sua capacidade para atuarem como moduladores de crescimento de tecido podem ser produzidos, por exemplo, por bactérias, leveduras, plantas ou outros organismos (por exemplo, produtos naturais), produzidos

quimicamente (por exemplo, pequenas moléculas, incluindo peptidomiméticos), ou produzidos de modo recombinante. Os compostos de teste incluem moléculas orgânicas não peptídico, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, açúcares, hormonas, e moléculas de ácido nucleico. Num caso específico, o agente de teste é uma molécula orgânica pequena com um peso molecular inferior a cerca de 2.000 daltons.

Os compostos de teste podem ser fornecidos como entidades simples, discretas, ou fornecidos em bibliotecas de maior complexidade, tal como feitas por química combinatória. Estas bibliotecas podem compreender, por exemplo, álcoois, alogenetos de alquilo, aminas, amidas, ésteres, aldeídos, éteres e outras classes de compostos orgânicos. A apresentação dos compostos de teste ao sistema de teste pode ser ou numa forma isolada ou como misturas de compostos, especialmente nos passos de rastreio iniciais. Opcionalmente, os compostos podem ser opcionalmente derivatizados com outros compostos e ter grupos de derivação que facilitem o isolamento dos compostos. Exemplo não limitativo de grupos de derivatização incluem biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína fluorescente verde, isótopos, polihistidina, esferas magnéticas, glutathione S transferase (GST), ligantes cruzados fotoativáveis ou qualquer combinações destes.

Em muitos programas de triagem de fármacos que testam bibliotecas de compostos e extratos naturais, são desejáveis ensaios de alta capacidade com vista a maximizar o número de compostos pesquisados num determinado período de tempo. Os ensaios que são realizados em sistemas sem células, que podem ser derivados com proteínas purificadas ou semi-purificadas, são frequentemente preferidos como rastreios "primários" dado que podem ser gerados para permitir o

desenvolvimento rápido e a deteção relativamente fácil de uma alteração num alvo molecular que é mediado por um composto de teste. Além disso, os efeitos da toxicidade ou biodisponibilidade celular do composto de teste podem ser geralmente ignorados no sistema *in vitro*, sendo então o ensaio focado primariamente no efeito do fármaco sobre o alvo molecular como pode ser manifestado numa alteração da afinidade de ligação entre um polipéptido ActRIIa e a activina.

Meramente como ilustração, num ensaio de rastreio exemplificativo, o composto de interesse é contactado com um polipéptido ActRIIa isolado e purificado o qual é normalmente capaz de se ligar à activina. À mistura do composto e polipéptido ActRIIa é então adicionada uma composição contendo um ligando de ActRIIa. A deteção e quantificação de complexos ActRIIa/activina fornece um meio para determinar a eficácia do composto na inibição (ou potenciação) da formação de complexos entre o polipéptido ActRIIa e a activina. A eficácia do composto pode ser avaliada através da geração de curvas de dose-resposta a partir de dados obtidos usando várias concentrações do composto de teste. Além disso, um ensaio de controlo pode também ser realizado para dar uma linha de base para comparação. Por exemplo, num ensaio de controlo, a activina isolada e purificada é adicionada a uma composição contendo o polipéptido ActRIIa, e a formação de complexo ActRIIa/activina é quantificada na ausência do composto de teste. Deve entender-se que, em geral, a ordem pela qual os reagentes podem ser misturados pode variar, e podem ser misturados simultaneamente. Além disso, em vez das proteínas purificadas, podem ser usados extratos celulares e lisados para processar um sistema de ensaio adequado isento de células.

A formação de complexos entre o polipéptido ActRIIa e activina pode ser detetada por uma diversidade de técnicas. Por exemplo, a modulação da formação de complexos pode ser quantificada usando, por exemplo, proteínas marcadas de forma detetável tal como radiomarcadas (por exemplo,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$  ou  $^3\text{H}$ ), marcadas com fluorescência (por exemplo, FITC), ou polipéptido ActRIIa ou activina marcadas enzimaticamente, por imunoensaio, ou por deteção cromatográfica.

Ensaio de polarização de fluorescência e ensaios de transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET) podem ser usados na medição, tanto diretamente como indiretamente, do grau de interação entre um polipéptido ActRIIa e a sua proteína de ligação. Mais ainda, outros modos de deteção, tais como os baseados em guias de onda óticos (Publicação PCT WO 96/26432 e Pat. U.S. No. 5,677,196), ressonância plasmónica de superfície (SPR), sensores de carga de superfície, e sensores de força de superfície, podem ser usados.

Um ensaio de armadilha de interação, também conhecido como "ensaio de dois híbridos," pode ser usado para identificar agentes que destroem ou potenciam a interação entre um polipéptido ActRIIa e a sua proteína de ligação. Ver por exemplo, a Pat. U.S. No. 5,283,317; Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232; Madura et al. (1993) J Biol Chem 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) Biotechniques 14:920-924; e Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696). Sistemas de dois híbridos reversos podem ser usados para identificar compostos (por exemplo, moléculas pequenas ou péptidos) que dissociam as interações entre um polipéptido ActRIIa e a sua proteína de ligação. Ver por exemplo, Vidal e Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29; Vidal e

Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81; e Pat. U.S. Nos. 5,525,490; 5,955,280; e 5,965,368.

Os compostos em questão podem ser identificados pela sua capacidade de interagir com um polipéptido ActRIIa ou activina aqui divulgados. A interação entre o composto e o polipéptido ActRIIa ou activina pode ser covalente ou não covalente. Por exemplo, essa interação pode ser identificada ao nível da proteína usando métodos bioquímicos *in vitro*, incluindo foto-ligação cruzada, ligação a ligando marcado radioativamente, e cromatografia de afinidade (Jakoby WB et al., 1974, Methods in Enzymology 46: 1). Em certos casos, os compostos podem ser rastreados num ensaio baseado em mecanismo, tal como um ensaio para detetar compostos que se ligam a um polipéptido ActRIIa ou activina. Isto pode incluir um evento de ligação de fase sólida ou fase líquida. Em alternativa, o gene que codifica um polipéptido ActRIIa ou activina pode ser transfectado com um sistema repórter (por exemplo,  $\beta$ -galactosidase, luciferase, ou proteína fluorescente verde) para uma célula e rastreado em relação à biblioteca preferencialmente por um rastreio de alta capacidade ou com membros individuais da biblioteca. Outros mecanismos baseados em ensaios de ligação podem ser utilizados, por exemplo, ensaios de ligação que detetam mudanças na energia livre. Os ensaios de ligação podem ser realizados com o alvo fixo a um poço, esfera ou chip ou capturado por um anticorpo imobilizado ou resolvido por eletroforese capilar. Os compostos ligados podem ser detetados geralmente usando ressonância plasmónica colorimétrica ou de fluorescência ou de superfície.

São aqui divulgados métodos e agentes para modular (estimulando ou inibindo) a formação de osso e aumentar a massa óssea. Portanto, qualquer composto identificado pode

ser testado em células intactas ou tecidos, *in vitro* ou *in vivo*, para confirmar a sua capacidade para modular o crescimento ósseo ou a mineralização. Vários métodos conhecidos na técnica podem ser utilizados para este fim.

Por exemplo, o efeito dos polipéptidos ActRIIa ou activina ou os compostos de teste no crescimento do osso ou cartilagem pode ser determinado medindo a indução de Msx2 ou a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos em ensaios com base em células (ver, por exemplo, Daluiski et al., *Nat Genet.* 2001, 27(1):84-8; Hino et al., *Front Biosci.* 2004, 9:1520-9). Outro exemplo de ensaios à base de células inclui a análise da atividade osteogénica dos polipéptidos ActRIIa ou activina em questão e dos compostos de teste em células osteoblásticas e progenitoras mesenquimatosas. Para ilustrar, adenovírus recombinantes expressando um polipéptido activina ou ActRIIa podem ser construídos para infectar células progenitoras mesenquimatosas pluripotentes C3H 1 0Y1 /2, células preosteoblásticas C2C12, e células osteoblásticas TE-85. A atividade osteogénica é então determinada medindo a indução de fosfatase alcalina, osteocalcina, e mineralização da matriz (ver, por exemplo, Cheng et al., *J bone Joint Surg Am.* 2003, 85-A(8):1 544-52).

Ensaio *in vivo* podem ser usados para medir o crescimento de osso ou cartilagem. Por exemplo, Namkung-Matthai et al., *Bone*, 28:80-86 (2001) divulga um modelo osteoporótico em ratazana no qual é estudada a reparação óssea durante a fase inicial após uma fratura. Kubo et al., *Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 68:197-202 (1999) divulga também um modelo osteoporótico em ratazana no qual é estudada a reparação do osso durante a fase final após uma fratura.

Andersson et al., J. Endocrinol. 170:529-537 descrevem um modelo osteoporótico em rato no qual os ratos são ovariectomizados, o que faz com que os ratos percam conteúdo mineral ósseo substancial e densidade mineral óssea, com o osso trabecular a perder cerca de 50% de densidade mineral óssea. A densidade óssea pode ser aumentada nos ratos ovariectomizados pela administração de fatores tais como hormona paratiroide. Podem ser usados ensaios de consolidação da fratura que são conhecidos na técnica. Estes ensaios incluem técnica de fratura, análise histológica, e análise bioquímica, que são descritas em, por exemplo, Pat. U.S. No. 6,521,750, que divulga protocolos experimentais para causar, bem como medir, o grau das fraturas, e o processo de reparação.

#### 6. Usos Terapêuticos Exemplificativos

Antagonistas de activina-ActRIIa (por exemplo, polipéptidos ActRIIa) podem ser usados para tratar ou prevenir uma doença ou condição que está associada a destruição óssea, quer, por exemplo, por quebra, perda ou desmineralização. Como aqui demonstrado, antagonistas activina-ActRIIa, e particularmente construções ActRIIa-Fc, são eficazes no tratamento ou prevenção da perda de osso relacionada com cancro. São aqui divulgados métodos de tratamento ou prevenção de danos do osso num indivíduo com essa necessidade, através da administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficiente de um antagonista activina-ActRIIa, particularmente um polipéptido ActRIIa. Também divulgados são métodos para promover o crescimento ósseo ou mineralização num indivíduo com necessidade disso através da administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficiente de um antagonista de activina-ActRIIa, particularmente um polipéptido ActRIIa. Estes métodos são preferencialmente destinados a tratamentos

terapêuticos e profiláticos de animais, e mais preferencialmente, humanos. São aqui descritos antagonistas de activina-ActRIIa (particularmente os polipéptidos ActRIIa solúveis e anticorpos neutralizantes dirigidos para activina ou ActRIIa) para o tratamento de doenças associadas a baixa densidade óssea ou resistência óssea diminuída.

Como aqui usado, uma terapêutica que "previne" uma doença ou condição refere-se a um composto que, numa amostra estatística, reduz a ocorrência da doença ou condição na amostra tratada em relação a uma amostra controlo não tratada, ou atrasa o aparecimento ou reduz a gravidade de um ou mais sintomas da doença ou condição em relação à amostra controlo não tratada. O termo "tratar" como aqui usado inclui a profilaxia da condição indicada ou melhoramento ou eliminação da condição uma vez que tenha sido estabelecida. Em ambos os casos, prevenção ou tratamento podem ser discernidos no diagnóstico fornecido por um médico e do resultado pretendido com a administração do agente terapêutico.

A divulgação descreve métodos para induzir a formação de osso e/ou cartilagem, prevenir a perda de osso, aumentar a mineralização óssea ou prevenir a desmineralização óssea. Por exemplo, os antagonistas de activina-ActRIIa em questão têm aplicação no tratamento da osteoporose e na consolidação de fraturas ósseas e deficiências da cartilagem em humanos e outros animais. Os polipéptidos ActRIIa ou activina podem ser úteis em doentes que são diagnosticados com baixa densidade óssea subclínica, como uma medida protetora contra o desenvolvimento da osteoporose.



As composições em questão podem encontrar utilidade médica na cura de fraturas ósseas e deficiências de cartilagem em humanos e outros animais. As composições em questão podem também ter uso profilático na redução de fraturas fechadas, bem como abertas e também na melhoria da fixação de articulações artificiais. A formação de osso de novo induzida por um agente osteogénico contribui para a reparação de defeitos craniofaciais por indução oncológica, induzidos por trauma, ou congénitos, e também é útil em cirurgia plástica cosmética. Em certos casos, os antagonistas de activina-ActRIIa em questão podem fornecer um ambiente para atrair células formadoras de osso, estimular o crescimento de células formadoras de osso ou induzir a diferenciação de progenitores de células formadoras de osso. Antagonistas de activina-ActRIIa podem também ser úteis no tratamento da osteoporose.

As composições da invenção podem ser aplicadas a condições caracterizadas por ou incluindo perda de osso, tais como osteoporose (incluindo osteoporose secundária), hiperparatiroidismo, doença de Cushing, doença de Paget, tirototoxicose, estado de diarreia crónica ou má absorção, acidose tubular renal, ou anorexia nervosa.

A osteoporose pode ser causada por, ou associada a, vários fatores. Ser do sexo feminino, particularmente fêmea em pós-menopausa, ter um baixo peso corporal, e levar um estilo de vida sedentário são todos fatores de risco para a osteoporose (perda da densidade mineral óssea, conduzindo a risco de fratura). Pessoas com qualquer dos seguintes perfis podem ser candidatas para tratamento com um antagonista ActRIIa: uma mulher em pós-menopausa e que não toma estrogénios ou outra terapia de substituição hormonal; uma pessoa com uma história pessoal ou materna de fratura da anca ou fumadora; um mulher na pós-menopausa que seja alta

(acima de 5 pés e 7 polegadas) ou magra (menos que 125 libras); um homem com condições clínicas associadas com perda de osso; uma pessoa usando medicações que são conhecidas por causarem perda de osso, incluindo corticosteroides tais como Prednisone™, várias medicações anticonvulsivas tais como Dilantin™ e certos barbitúricos, ou fármacos de substituição da tiroide de alta dosagem; uma pessoa com diabetes tipo 1, doença do fígado, doença renal ou uma história familiar de osteoporose; uma pessoa com renovação óssea elevada (por exemplo, excessivo colagénio em amostras de urina); uma pessoa com uma condição da tiroide, tal como hipertiroidismo; uma pessoa que sofreu uma fratura após um trauma ligeiro; uma pessoa que tenha evidência por raio-X de Fratura vertebral ou outros sinais de osteoporose.

Como notado acima, a osteoporose pode também resultar como uma condição associada a outro distúrbio ou ao uso de certos medicamentos. A osteoporose resultante de fármacos ou outra condição médica é conhecida como osteoporose secundária. Numa condição conhecida como doenças de Cushing, a quantidade excessiva de cortisol produzido pelo organismo resulta em osteoporose e fraturas. Os medicamentos mais comuns associados à osteoporose secundária são os corticosteroides, uma classe de fármacos que atua de modo semelhante ao cortisol, uma hormona produzida naturalmente pelas glândulas adrenais. Embora níveis de hormonas da tiroide adequados (que são produzidos pela glândula tiroide) sejam necessários para o desenvolvimento do esqueleto, o excesso de hormona tiroideia pode diminuir a massa óssea ao longo do tempo. Antiácidos que contêm alumínio podem conduzir à perda de osso quando tomados em altas doses por pessoas com problemas renais, particularmente aqueles submetidos a diálise. Outras medicações que podem causar osteoporose

secundária incluem fenitoína (Dilantin) e barbitúricos que são usados para prevenir convulsões; metotrexato (Rheumatrex, Immunex, Folex PFS), um fármaco para algumas formas de artrite, cancro, e doenças imunes; ciclosporina (Sandimmune, Neoral), um fármaco usado para tratar algumas doenças autoimunes e para suprimir o sistema imune em doentes com transplante de órgãos; agonistas da hormona de libertação da hormona luteinizante (Lupron, Zoladex), usados para tratar cancro da próstata e endometriose; heparina (Calciparina, Liquaemina), um medicamento anticoagulante; e colestiramina (Questran) e colestipol (Colestid), usado para tratar colesterol elevado. A perda de osso resultante da terapia do cancro é amplamente reconhecida e chamada de perda de osso induzida por terapia de cancro (CTIBL). As metástases ósseas podem criar cavidades no osso que podem ser corrigidas por tratamento com antagonistas de activina-ActRIIa.

Numa forma de realização preferida, as composições da invenção podem ser usadas em doentes de cancro. Doentes com determinados tumores (por exemplo, mieloma múltiplo) podem ser tratados com o antagonista activina-ActRIIa reivindicado mesmo na ausência de evidência de perda de osso ou metástases ósseas. Os doentes podem também ser monitorizados em relação a evidência de perda de osso ou metástases ósseas, e podem ser tratados com antagonistas de activina-ActRIIa no caso de os indicadores sugerirem um aumento do risco. Geralmente, exames DEXA são utilizados para avaliar as alterações na densidade óssea, enquanto que os indicadores de remodelação óssea podem ser usados para medir a probabilidade de metástases ósseas. Os marcadores séricos podem ser monitorizados. A fosfatase alcalina específica do osso (BSAP) é uma enzima que está presente nos osteoblastos. Os níveis sanguíneos de BSAP estão aumentados nos doentes com metástases ósseas e outras

condições que resultam no aumento da remodelação óssea. Os péptidos osteocalcina e procolagénio estão também associados a formação óssea e a metástases ósseas. Aumentos de BSAP foram detetados em doentes com metástases óssea causadas por cancro da próstata, e, em menor grau, em metástases ósseas por cancro da mama. Os níveis de Proteína morfogenética óssea-7 (BMP-7) são altos no cancro da próstata que metastizou no osso, mas não nas metástases ósseas devidas a cancro da bexiga, pele, fígado, ou pulmão. Telopéptido carboxi-terminal tipo I (ICTP) é uma reticulação encontrada no colagénio que é formada durante a reabsorção óssea. Como o osso é constantemente destruído e reformado, o ICTP pode ser encontrado em todo o corpo. No entanto, no sítio das metástases ósseas, o nível é significativamente mais elevado do que numa área de osso normal. O ICTP foi encontrado em níveis elevados em metástases ósseas devidas a cancro da próstata, do pulmão, e da mama. Outra reticulação de colagénio, o telopéptido N-terminal tipo I (NTx), é produzido ao mesmo tempo que o ICTP durante a renovação óssea. A quantidade de NTx é aumentada em metástases ósseas causadas por muitos tipos diferentes de cancro incluindo cancro do pulmão, da próstata, e da mama. Também, os níveis de NTx aumentam com a progressão das metástases ósseas. Portanto, este marcador pode ser usado para detetar metástases assim como medir a extensão da doença. Outros marcadores de reabsorção incluem pirrolidina e desoxipirrolidina. Qualquer aumento nos marcadores de reabsorção ou marcadores de metástases ósseas indicam a necessidade de terapia de antagonista de activina-ActRIIa num doente.

Os antagonistas de activina-ActRIIa podem ser administrados conjuntamente com outros agentes farmacêuticos. A administração conjunta pode ser realizada pela administração de uma co-formação simples, por administração

simultânea ou por administração em tempos diferentes. Os antagonistas de activina-ActRIIa podem ser particularmente vantajosos se administrados com outros agentes ativos no osso. Um doente pode beneficiar se receber em conjunto o antagonista activina-ActRIIa e tomando suplementos de cálcio, vitamina D, exercício apropriado e/ou, em alguns casos, outra medicação. Exemplos de outras medicações incluem, bisfosfonatos (alendronato, ibandronato e risedronato), calcitonina, estrogénios, hormona paratiroide e raloxifeno. Os bisfosfonatos (alendronato, ibandronato e risedronato), calcitonina, estrogénios e raloxifeno afetam o ciclo de remodelação óssea e são classificadas como medicações anti-reabsorção. A remodelação óssea consiste em dois estados distintos: reabsorção óssea e formação óssea. Medicações anti-reabsorção retardam ou param a porção de reabsorção óssea do ciclo de remodelação óssea mas não abrandam a porção de formação de óssea do ciclo. Como resultado, a nova formação continua a uma taxa maior do que a reabsorção óssea, e a densidade óssea pode aumentar ao longo do tempo. Teriparatida, uma forma da hormona paratiroide, aumenta a taxa de formação óssea no ciclo da remodelação óssea. O alendronato é aprovado tanto para a prevenção (5 mg por dia ou 35 mg uma vez por semana) e tratamento (10 mg por dia ou 70 mg uma vez por semana) da osteoporose pós-menopausa. O alendronato reduz a perda de osso, aumenta a densidade óssea e reduz o risco de fraturas da coluna, pulso e da anca. O alendronato também é aprovado para tratamento de osteoporose induzida por glucocorticoides em homens e mulheres como resultado do uso prolongado destas medicações (i.e., prednisona e cortisona) e para o tratamento da osteoporose no homem. O alendronato mais vitamina D está aprovado para o tratamento de osteoporose em mulheres em pós-menopausa (70 mg uma vez por semana mais vitamina D), e para o tratamento para melhorar a massa óssea em homens com osteoporose. O ibandronato está

aprovado para a prevenção e tratamento de osteoporose pós-menopausa. Tomado como uma pílula mensal (150 mg), o ibandronato deve ser tomado no mesmo dia de cada mês. O ibandronato reduz a perda de osso, aumenta a densidade óssea e reduz o risco de fraturas da coluna. O risedronato está aprovado para a prevenção e tratamento de osteoporose pós-menopausa: Tomado diariamente (5 mg dose) ou semanalmente (35 mg dose ou 35 mg dose com cálcio), o risedronato retarda a perda óssea, aumenta a densidade óssea e reduz o risco de fraturas da coluna e não da coluna. O risedronato também está aprovado para uso por homens e mulheres para prevenir e/ou tratar osteoporose induzida por glucocorticoides que resulta do uso prolongado destes medicamentos (i.e., prednisona ou cortisona). A calcitonina é uma hormona de ocorrência natural envolvida na regulação do cálcio e metabolismo ósseo. Em mulheres que já passaram a menopausa há 5 anos, a calcitonina reduz a perda óssea, aumenta a densidade óssea da coluna, e pode aliviar a dor associada a fraturas ósseas. A calcitonina reduz o risco de fraturas da coluna. A calcitonina está disponível como uma injeção (50-100 UI diariamente) ou spray nasal (200 UI diariamente). A terapia de estrogénios (TE)/terapia hormonal (HT) está aprovada para a prevenção da osteoporose. A TE demonstrou reduzir a perda de osso, aumentar a densidade óssea na região da coluna e da anca, e reduzir o risco de fraturas da anca e da coluna em mulheres pós-menopausa. A TE é administrada mais comumente na forma de uma pílula ou adesivo cutâneo que administra uma pequena dose de aproximadamente 0,3 mg por dia ou uma dose padrão de aproximadamente 0,625 mg por dia e é eficaz mesmo quando iniciada após os 70. Quando o estrogénio é tomado sozinho, pode aumentar o risco da mulher desenvolver cancro do revestimento do útero (cancro do endométrio). Para eliminar este risco, os prestadores de cuidados de saúde prescrevem a hormona progestina em combinação com estrogénio (terapia

de substituição hormonal ou HT) àquelas mulheres que têm um útero intacto. AvET/HT alivia os sintomas da menopausa e foi demonstrado ter um efeito benéfico na saúde óssea. Os efeitos secundários podem incluir sangramento vaginal, sensibilidade mamária, perturbações do humor e doença da vesícula biliar. O Raloxifene, 60 mg por dia, está aprovado para a prevenção e tratamento da osteoporose pós-menopausa. Pertence a uma classe de fármacos chamada de Moduladores seletivos dos recetores de estrogénio (SERMs) que foram desenvolvidos para fornecer os efeitos benéficos do estrogénio sem as suas desvantagens potenciais. O raloxifeno aumenta a massa óssea e reduz o risco de fraturas da coluna. Os dados não estão ainda disponíveis para demonstrar que o raloxifeno pode reduzir o risco de fratura da anca e de outras fraturas que não da coluna, a Teriparatida, uma forma da hormona paratiroide, está aprovada para o tratamento da osteoporose em mulheres em pós-menopausa e homens que estão em alto risco de fratura. Esta medicação estimula formação de osso novo e aumenta significativamente a densidade mineral óssea. Nas mulheres em pós-menopausa, a redução de fraturas foi observada na coluna, anca, pé, costelas e pulso. Nos homens, a redução de fraturas foi observada na coluna, mas não houve dados suficientes para avaliar a redução de fraturas noutros sítios. A Teriparatida é autoadministrada como uma injeção diária durante até 24 meses.

7. As Composições Farmacêuticas da invenção são definidas nas reivindicações 1-11

Em certas formas de realização, os antagonistas de activina-ActRIIa (por exemplo, polipéptidos ActRIIa) da presente invenção são formulados com um transportador farmacologicamente aceitável. Por exemplo, um polipéptido ActRIIa pode ser administrado sozinho ou como um componente

de uma formulação farmacêutica (composição farmacêutica). Os compostos em questão podem ser formulados para administração de qualquer modo conveniente para uso em medicina humana ou veterinária.

As composições podem ser administradas sistemicamente, ou localmente como um dispositivo ou implante. Quando administrada, a composição farmacêutica para uso nesta invenção é numa forma livre de pirogênios, fisiologicamente aceitável. Outros agentes terapeuticamente úteis, que não os antagonistas de ActRIIa que podem também ser opcionalmente incluídos na comparação com o descrito acima, podem ser administrados simultaneamente ou sequencialmente com os compostos em questão (por exemplo, polipéptidos ActRIIa) nos métodos da invenção.

Tipicamente, os antagonistas de ActRIIa devem ser administrados por via parentérica, e particularmente por via intravenosa ou subcutânea. Composições farmacêuticas adequadas para administração parentérica podem compreender um ou mais polipéptidos ActRIIa em combinação com uma ou mais soluções, dispersões, suspensões ou emulsões, aquosas ou não aquosas estéreis isotónicas farmacêuticamente aceitáveis, ou pós estéreis que podem ser reconstituídos em soluções ou dispersões injetáveis estéreis imediatamente antes da utilização, as quais podem conter antioxidantes, tampões, bacteriostáticos, solutos que podem tornar a formulação isotónica com o sangue do recipiente pretendido ou agentes de suspensão ou de espessamento. Exemplos de transportadores aquosos e não aquosos que podem ser empregues nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, poliois (tais como glicerol, propileno glicol, polietileno glicol, e afins), e misturas adequadas destes, óleos vegetais, tais como azeite, e ésteres orgânicos injetáveis tais como oleato de etilo. A fluidez



adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de materiais de revestimento, tais como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersões, e pelo uso de tensoativos.

Mais ainda, a composição pode ser encapsulada ou injetada numa forma para aplicar num sítio de tecido alvo (por exemplo, osso). Em certas formas de realização, as composições da presente invenção podem incluir uma matriz capaz de aplicar um ou mais compostos terapêuticos (por exemplo, polipéptidos ActRIIa) a um sítio de tecido alvo (por exemplo, osso), proporcionando uma estrutura para o tecido em desenvolvimento e otimamente capaz de ser reabsorvida pelo corpo. Por exemplo, a matriz pode proporcionar uma libertação lenta dos polipéptidos ActRIIa. Tais matrizes podem ser formadas de materiais presentemente em utilização para outras aplicações médicas implantadas.

A escolha do material de matriz é baseada na biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades mecânicas, aparência cosmética e propriedades da interface. A aplicação específica das composições em questão irá definir a formulação apropriada. Matrizes potenciais para as composições podem ser sulfato de cálcio definido quimicamente e biodegradável, fosfato tricálcico, hidroxiapatite, ácido polilático e polianidridos. Outros materiais potenciais são biodegradáveis e biologicamente bem definidos, tal como colagénio ósseo ou dérmico. Outras matrizes são feitas de proteínas puras ou componentes da matriz extracelular. Outras matrizes potenciais são não-biodegradáveis e quimicamente definidas, tais como hidroxiapatite sinterizada, biovidro, aluminatos, ou outras cerâmicas. As matrizes podem ser feitas de combinações de qualquer dos tipos de materiais acima mencionados, tais como ácido polilático e hidroxiapatita ou colagénio e

fosfato tricálcico. As biocerâmicas podem ser alteradas na composição, tais como em aluminato-fosfato de cálcio e processamento para alterar o tamanho do poro, tamanho de partícula, formato da partícula, e biodegradabilidade.

As composições da invenção podem ser administradas por via oral, por exemplo, na forma de cápsulas, hóstias, pílulas, comprimidos, pastilhas (usando uma base aromatizada, usualmente sacarose e acácia ou tragacanto), pós, grânulos, ou como uma solução ou uma suspensão num líquido aquoso ou não aquoso, ou como uma emulsão líquida óleo-em-água ou água-em-óleo, ou como um elixir ou xarope, ou como pastilhas (usando uma base inerte, tal como gelatina e glicerina, ou sacarose e acácia) e/ou como elixires e afins, cada contendo uma quantidade predeterminada de um agente como componente ativo. Um agente pode também ser administrado como um bólus, eletuário ou pasta.

Em formas de dosagem sólidas para administração oral (cápsulas, comprimidos, pílulas, drageias, pós, grânulos, e afins), um ou mais compostos terapêuticos da presente invenção podem ser misturados com um ou mais transportadores farmacologicamente aceitáveis, tais como citrato de sódio ou fosfato de dicálcio, e/ou qualquer dos seguintes: (1) enchedores ou extensores, tais como amidos, lactose, sacarose, glucose, manitol, e/ou ácido silícico; (2) ligantes, tais como, por exemplo, carboximetilcelulose, alginatos, gelatina, polivinil-pirrolidona, sacarose, e/ou acácia; (3) humectantes, tais como glicerol; (4) agentes de desintegração, tais como agar-agar, carbonato de cálcio, amido de batata ou tapioca, ácido algínico, certos silicatos, e carbonato de sódio; (5) agentes de retardamento da solução, tais como parafina; (6) aceleradores de absorção, tais como compostos de amónio quaternário; (7) agentes molhantes, tais como, por exemplo,

álcool cetílico e monoestearato de glicerol; (8) absorventes, tais como argila de caulino e bentonite; (9) lubrificantes, tais como talco, estearato de cálcio, estearato de magnésio, polietileno glicóis sólidos, lauril sulfato de sódio, e misturas destes, e (10) agentes de coloração. No caso das cápsulas, comprimidos e pílulas, as composições farmacêuticas podem também compreender agentes tamponantes. Composições sólidas de um tipo semelhante podem também ser empregues como enchedores em cápsulas de gelatina mole e dura usando excipientes como lactose ou açúcares do leite, assim como polietileno glicóis de alto peso molecular e afins.

Formas de dosagem líquidas para administração oral incluem emulsões, microemulsões, soluções, suspensões, xaropes, e elixires farmacêuticamente aceitáveis. Para além do componente ativo, as formas de dosagem líquidas podem conter diluentes inertes comumente usados na técnica, tais como água ou outros solventes, agentes de solubilização e emulsionantes, tais como álcool etílico, álcool isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, álcool benzílico, benzoato de benzilo, propileno glicol, 1,3-butileno glicol, óleos (em particular, óleo de semente de algodão, amendoim, milho, gérmen, azeitona, rícino, e sésamo), glicerol, álcool tetrahydrofurílico, polietileno glicóis e ésteres de ácidos gordos de sorbitano, e misturas destes. Para além dos diluentes inertes, as composições orais podem também incluir adjuvantes tais como agentes molhantes, agentes emulsionantes e de suspensão, edulcorantes, aromatizantes, corantes, perfumantes, e agentes conservantes.

As suspensões, para além dos compostos ativos, podem conter agentes de suspensão tais como álcoois isoestearílicos etoxilados, polioxietileno de sorbitol, e ésteres de

sorbitano, celulose microcristalina, metahidróxido de alumínio, bentonite, agar-agar e tragacanto, e misturas destes.

As composições da invenção podem também conter adjuvantes, tais como conservantes, agentes molhantes, agentes de emulsão e agentes de dispersão. A prevenção da ação dos microrganismos pode ser assegurada pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsórbico, e afins. Pode também ser desejável incluir agentes isotônicos, tais como açúcares, cloreto de sódio, e afins nas composições. Adicionalmente, a absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser conseguida pela inclusão de agentes que retardam a absorção, tais como monoestearato de alumínio e gelatina.

É entendido que o regime de dosagem é determinado pelo médico assistente considerando vários fatores que modificam a ação dos compostos em questão da invenção (por exemplo, polipéptidos ActRIIa). Os vários fatores incluem, mas não são limitados a, quantidade de peso ósseo que se deseja que seja formado, o grau de perda de densidade óssea, o sítio do dano do osso, a condição do osso danificado, a idade, sexo, e dieta do doente, a gravidade de qualquer doença que possa contribuir para a perda de osso, tempo da administração, e outros fatores clínicos. Opcionalmente, a dosagem pode variar com o tipo de matriz usada na reconstituição e os tipos de compostos na composição. A adição de outros fatores de crescimento conhecidos à composição final pode também afetar a dosagem. O progresso pode ser monitorizado por medição periódica do crescimento ósseo e/ou reparação, por exemplo, raios X (incluindo DEXA), determinações histomorfométricas, e marcação por tetraciclina.

Experiências com primatas e humanos demonstraram que os efeitos da ActRIIa-Fc no osso são detetáveis quando o composto é doseado a intervalos e quantidades suficientes para atingir concentrações séricas de cerca de 200 ng/mL, com efeitos semi-máximos nos biomarcadores ósseos anabolizantes ocorrendo a uma dosagem de 0,3 mg/kg ou o equivalente em termos de área sob a curva. Em humanos, níveis séricos de 200 ng/mL podem ser obtidos com uma dose única de 0,1 mg/kg ou maior e níveis séricos de 1000 ng/mL podem ser obtidos com uma dose única de 0,3 mg/kg ou maior. A semivida sérica da molécula observada é entre cerca de 25 e 35 dias, substancialmente mais longa que a maioria das proteínas de fusão Fc, e assim um nível sérico eficaz constante pode ser obtido, por exemplo, com uma dose de cerca de 0,05 até 0,5 mg/kg numa base semanal ou bissemanal, ou doses mais altas podem ser usadas com intervalos mais longos entre dosagens. Por exemplo, doses de 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 1,2 ou 3 mg/kg, ou valores intermédios, podem ser usados numa base mensal ou bimensal, e o efeito no osso pode ser suficientemente duradouro para que a dosagem seja necessária apenas uma vez em cada 3, 4, 5, 6, 9, 12 ou mais meses. Intervalos mais longos entre doses são adicionalmente suportados pela duração do efeito farmacodinâmico, que é mais longo que a duração do fármaco no soro. Efeitos PD são observados durante pelo menos 120 dias em doentes humanos.

A terapia genética pode ser usada para a produção in vivo de polipéptidos ActRIIa. Tal terapia pode atingir o seu efeito terapêutico através da introdução das sequências de polinucleótidos ActRIIa nas células ou tecidos com as doenças como listado acima. A administração das sequências de polinucleótidos ActRIIa pode ser conseguida usando um vetor de expressão recombinante tal como um vírus quimérico ou um sistema de dispersão coloidal. Preferido para

aplicação terapêutica das sequências de polinucleótidos ActRIIa é o uso de lipossomas direcionados.

Vários vetores virais que podem ser utilizados para terapia genética conforme aqui ensinado incluem adenovírus, vírus do herpes, vaccinia, ou, preferencialmente, um vírus de ARN tal como um retrovírus. Preferencialmente, o vetor retroviral é um derivado de um retrovírus de murino ou ave. Exemplos de vetores retrovirais nos quais um único gene exógeno pode ser inserido incluem mas não são limitados a: Vírus da leucemia murina de Moloney (MoMuLV), vírus do sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), vírus do tumor mamário murino (MuMTV), e vírus do Sarcoma de Rous (RSV). Alguns vetores retrovirais adicionais podem incorporar genes múltiplos. Todos estes vetores podem transferir ou incorporar um gene para um marcador selecionável de modo a que as células transduzidas possam ser identificadas e geradas. Vetores retrovirais podem ser tornados específicos para alvo, anexando, por exemplo, um açúcar, um glicolípido, ou uma proteína. O direcionamento preferido é realizado pelo uso de um anticorpo. Os especialistas na técnica reconhecerão que sequências específicas de polinucleótidos podem ser inseridas no genoma retroviral ou anexadas a um invólucro viral para permitir o fornecimento ao alvo específico do vetor retroviral contendo o polinucleótido ActRIIa. Numa forma de realização preferida, o vetor é direcionado para o osso ou cartilagem.

Em alternativa, células de culturas de tecidos podem ser diretamente transfectadas com plasmídeos que codificam os genes estruturais retrovirais gag, pol e env, por transfeção convencional de fosfato de cálcio. Estas células são então transfectadas com o plasmídeo vetor contendo os genes de interesse. As células resultantes libertam o vetor retroviral no meio de cultura.

Um outro sistema de administração direcionada para polinucleótidos ActRIIa é um sistema de dispersão coloidal. Os sistemas de dispersão coloidal incluem macromoléculas complexas, nanocápsulas, microsferas, esferas e sistemas de base lipídica incluindo emulsões óleo-em-água, micelas, micelas mistas, e lipossomas. Um sistema coloidal preferido é um lipossoma. Os lipossomas são vesículas de membrana artificiais que são úteis como veículos de distribuição *in vitro* e *in vivo*. ARN, ADN e viriões intactos podem ser encapsulados dentro do interior aquoso e ser aplicados a células numa forma biologicamente ativa (ver por exemplo, Fraley, et al., *Trends Biochem. Sci.*, 6:77, 1981). Os métodos para a transferência de genes eficiente usando um veículo de lipossoma, são conhecidos na técnica, ver por exemplo, Mannino, et al., *Biotechniques*, 6:682, 1988. A composição do lipossoma é normalmente uma combinação de fosfolípidos, normalmente em combinação com esteroides, especialmente colesterol. Outros fosfolípidos ou outros lípidos podem também ser usados. As características físicas dos lipossomas dependem do pH, força iónica, e da presença de catiões divalentes.

Exemplos de lípidos úteis na produção de lipossomas incluem compostos fosfatidilo, tais como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos, e gangliósidos. Fosfolípidos ilustrativos incluem fosfatidilcolina do ovo, dipalmitoilfosfatidilcolina, e distearoilfosfatidilcolina. O direcionamento dos lipossomas é também possível com base em, por exemplo, especificidade para órgãos, especificidade para células, e especificidade para organelos e é conhecido na técnica.

## EXEMPLIFICAÇÃO

Exemplo 1: Proteínas de fusão ActRIIa-Fc

Os requerentes construíram uma proteína de fusão ActRIIa solúvel que tem o domínio extracelular da ActRIIa humana fundido a um domínio Fc humano de rato com um ligante mínimo entre eles. As construções são referidas como ActRIIa-hFc e ActRIIa-mFc, respetivamente.

A ActRIIa-hFc é mostrada abaixo como purificada a partir de linhas de células CHO (SEQ ID NO: 7):

**ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG**  
**CWLDDINCYDRITDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPK**  
**PPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVLEFPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKF**  
**NWYVDQVEVHNAKTKPREEOYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYKCKVSNKALP**  
**VPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP**  
**ENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTOKLSLSL**  
**SPGK**

As proteínas ActRIIa-hFc e ActRIIa-mFc foram expressas em linhas de células CHO. Foram consideradas três sequências líder diferentes:

(i) melitina de abelha (HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 8)

(ii) Ativador de Plasminogénio Tecidual (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 9)

(iii) Nativa: MGAAAKLAFVFLISCSGA (SEQ ID NO: 10).

A forma selecionada emprega a TPA líder e tem a seguinte sequência de aminoácidos não processada:



MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCY  
GDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEG  
NMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHCPCPCAPPELLGGPSVFLFPPKPK  
DTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVVS  
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVIIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQ  
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:13)

Este polipéptido é codificado pela seguinte sequência de ácidos nucleicos:

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCT  
TCGTTTCGCCCGGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTT  
TTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGGAACCGTGTT  
ATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGG  
TTCCATTGAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAAACCTGCTATGACA  
GGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGA  
GGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCGGAGATGGAAGTCACACAG  
CCCACCTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGGAACTCACACAT  
GCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC  
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG  
GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAACCTGGTACGTGGAC  
GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG  
CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGC  
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGTCCCCATCGAGAAA  
ACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC  
CCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA  
GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG  
AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT  
ATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT  
GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT  
GTCTCCGGGTAAATGAGAATTC (SEQ ID NO:14)

Ambos ActRIIa-hFc e ActRIIa-mFc foram significativamente recetivos à expressão recombinante. Como mostrado na Figura 1, a proteína foi purificada como um único pico bem

definido de proteína. A sequenciação N-terminal revelou uma única sequência de-ILGRSTQE (SEQ ID NO: 11). A purificação pode ser conseguida por uma série de passos de cromatografia de coluna, incluindo, por exemplo, três ou mais dos seguintes, por qualquer ordem: cromatografia de proteína A, cromatografia de Q sefarose, cromatografia de fenilsefarose, cromatografia de exclusão de tamanho, e cromatografia de troca catiónica. A purificação pode ser completada com filtração viral e troca de tampão. A proteína ActRIIa-hFc foi purificada até uma pureza de >98% como determinado por cromatografia de exclusão de tamanho e >95% como determinado por SDS PAGE.

ActRIIa-hFc e ActRIIa-mFc mostraram uma alta afinidade por ligandos, particularmente activina A. GDF-11 ou Activina A ("ActA") foram imobilizados num chip Biacore CM5 usando um processo de acoplamento de amina padrão. As proteínas ActRIIa-hFc e ActRIIamFc foram fornecidas ao sistema, e a ligação foi medida. ActRIIa-hFc ligada a activina com uma constante de dissociação ( $K_D$ ) de  $5 \times 10^{-12}$ , e a proteína ligada a GDF11 com um  $K_D$  de  $9,96 \times 10^{-9}$ . Ver figura 2. ActRIIa-mFc teve um comportamento semelhante.

Um Ensaio de Gene Reporter A-204 foi usado para avaliar os efeitos das proteínas ActRIIa-hFc na sinalização por GDF-11 e Activina A. Linha de células: Rabdomiossarcoma Humano (derivado de músculo). Vetor Reporter: pGL3(CAGA) 12 (Descrito em Dennler *et al*, 1998, EMBO 17: 3091-3100.) Ver Figura 3. O motivo CAGA12 está presente em genes responsivos a TGF-Beta (gene PAI-1), pelo que este vetor é de uso geral para fatores de sinalização através de Smad2 e 3.

Dia 1: Dividir as células A-204 em placas de 48 poços.

Dia 2: células A-204 transfectadas com 10 µg de pGL3(CAGA)12 ou pGL3(CAGA)12 (10 µg)+ pRLCMV (1 µg) e Fugene.

Dia 3: Adicionar fatores (diluídos em meio + 0,1 % de BSA). Os inibidores precisam de ser pré-incubados com Fatores durante 1 hora antes de adicionar as células. 6 horas depois, as células são lavadas com PBS, e há lise das células.

Isto é seguido por um ensaio de Luciferase. Tipicamente neste ensaio, na ausência de quaisquer inibidores, a Activina A apresenta aproximadamente estimulação da expressão do gene reporter de 10 vezes e uma ED 50- 2 ng/mL. GDF-11: estimulação de 16 vezes, ED50: ~ 1,5 ng/mL. GDF-8 apresenta um efeito semelhante ao de GDF-11.

Como mostrado na figura 4, ActRIIa-hFc e ActRIIa-mFc inibem a sinalização mediada por GDF-8 em concentrações picomolares. Como mostrado na figura 5, três diferentes preparações de ActRIIa-hFc inibiram a sinalização de GDF-II com uma IC50 de aproximadamente 200 pM.

A ActRIIa-hFc foi muito estável em estudos farmacocinéticos. As ratas foram doseadas com 1 mg/kg, 3 mg/kg ou 10 mg/kg de proteína ActRIIa-hFc e os níveis plasmáticos da proteína foram medidos às 24, 48, 72, 144 e 168 horas. Num estudo separado, as ratas foram doseadas com 1 mg/kg, 10 mg/kg ou 30 mg/kg. Em ratas, a ActRIIa-hFc teve uma semivida sérica de 11-14 dias e os níveis circulantes do fármaco foram bastante elevados após duas semanas (11 µg/mL, 110 µg/mL ou 304 µg/mL para administrações iniciais de 1 mg/kg, 10 mg/kg ou 30 mg/kg, respectivamente.) Em macacos cynomolgus, a semivida

plasmática foi substancialmente maior do que 14 dias e os níveis circulantes do fármaco foram de 25 µg/mL, 304 µg/mL ou 1440 µg/mL para administrações iniciais de 1 mg/kg, 10 mg/kg ou 30 mg/kg, respetivamente. Resultados preliminares em humanos sugerem que a semivida sérica está entre cerca de 20 e 30 dias.

Exemplo 2 : ActRIIa-mFc Promove o Crescimento Ósseo In Vivo  
(não faz parte da invenção)

Ratos fêmeas normais (BALB/c) foram doseados com ActRIIa-mFc a um nível de 1 mg/kg/dose, 3 mg/kg/dose ou 10 mg/kg/dose, com as doses dadas duas vezes por semana. A densidade mineral óssea e o conteúdo mineral ósseo foram determinados por DEXA, ver figura 6.

Em ratos fêmeas BALB/c, exames DEXA mostraram um aumento significativo (>20%) na densidade mineral óssea e conteúdo como resultado do tratamento com ActRIIa-mFc. Ver figuras 7 e 8.

Portanto, o antagonismo da ActRIIa causou densidade e conteúdo ósseos aumentados em ratos fêmeas normais. Como próximo passo, o efeito da ActRIIa-mFc no osso num modelo de rato para osteoporose foi testado.

Andersson et al. (2001) estabeleceram que ratos ovariectomizados sofriam de perda de osso substancial (aproximadamente 50% de perda de osso trabecular seis semanas após a operação), e essa perda de osso nestes ratos poderia ser corrigida com agentes terapêuticos candidatos, tais como hormona paratiroide.

Os requerentes usaram ratos fêmeas C57BL6 que foram ovariectomizados (OVX) ou com operação simulada às 4-5

semanadas de idade. Oito semanas após cirurgia, o tratamento com ActRIIa-mFc (10 mg/kg, duas vezes por semana) ou controlo (PBS) foi iniciado. A densidade óssea foi medida por tomografia computadorizada.

Como mostrado na figura 9, ratos ovariectomizados não tratados mostraram perda substancial de densidade de osso trabecular em relação aos controlos simulados após seis semanas. O tratamento com ActRIIa-mFc restaurou a densidade óssea até ao nível dos ratos com operação simulada. Às 6 e 12 semanas de tratamento, a ActRIIa-mFc causou aumento substancial no osso trabecular dos ratos com OVX. Ver figura 10. Após 6 semanas de tratamento, a densidade óssea aumentou 24% em relação aos controlos com PBS. Após 12 semanas, o aumento foi de 27%.

Nos ratos com operação simulada, ActRIIa-mFc causou também um aumento substancial no osso trabecular. Ver figura 11. Após 6 e 12 semanas, o tratamento produziu um aumento de 35% em relação aos controlos.

Num conjunto adicional de experiências, ratos ovariectomizados (OVX) ou com operação simulada como descrito acima foram tratados com ActRIIa-mFc (10 mg/kg, duas vezes por semana) ou controlo (PBS) ao longo de doze semanas. Em semelhança aos resultados descritos acima para ActRIIa-mFc, ratos com OVX que receberam ActRIIa-mFc exibiram um aumento na densidade de osso trabecular de 15% a partir das quatro semanas e 25% depois das 12 semanas de tratamento (Figura 12). Ratos com operação simulada que receberam ActRIIa-mFc mostraram, de modo semelhante, um aumento na densidade de osso trabecular de 22% a partir das quatro semanas e de 32% após 12 semanas de tratamento (Figura 13).

Após doze semanas de tratamento com ActRIIa-mFc, a análise DEXA do corpo inteiro e de fêmur ex vivo mostrou que o tratamento induz um aumento na densidade óssea tanto em ratos ovariectomizados como em ratos com operação simulada (Figuras 14A and 14B, respetivamente). Estes resultados são também suportados por análise pQCT ex vivo do eixo femoral médio o que demonstrou um aumento significativo na densidade óssea total e cortical após tratamento de doze semanas com ActRIIa-mFc. Ratos ovariectomizados de controlo tratados com veículo exibiram densidades ósseas comparáveis com ratos de controlo tratados com veículo com operação simulada (Figura 15). Para além da densidade óssea, o conteúdo de osso aumentou a seguir ao tratamento com ActRIIa-mFc. A análise pQCT ex vivo do eixo femoral médio demonstrou um aumento significativo no conteúdo de osso total e cortical após tratamento de doze semanas com ActRIIa-mFc enquanto que ratos ovariectomizados e com operação simulada tratados com veículo de controlo exibiram conteúdos de osso comparáveis (Figura 16). Análise pQCT ex vivo do eixo femoral médio também mostrou que ratos tratados com ActRIIa-mFc não mostraram uma alteração na circunferência periosteal; no entanto, o tratamento com ActRIIa-mFc resultou numa diminuição na circunferência endosteal indicando um aumento na espessura cortical devido ao crescimento na superfície interna do fêmur (Figura 17).

A testagem mecânica de fémures determinou que a ActRIIa-mFc era capaz de aumentar as características extrínsecas do osso (carga máxima, rigidez e energia para quebrar) o que contribuiu para um aumento significativo nas propriedades intrínsecas (resistência final) dos ossos. Ratos ovariectomizados tratados com ActRIIa-mFc exibiram resistência óssea aumentada a níveis para além dos controlos tratados com veículo com operação simulada,

indicando uma inversão completa do fenótipo osteoporótico (Figura 18).

Estes dados demonstram que um antagonista de activina-ActRIIa pode aumentar a densidade óssea em ratos fêmeas normais e, além disso, corrigir defeitos na densidade óssea, conteúdo ósseo, e última análise resistência óssea, num modelo de rato de osteoporose.

Num conjunto adicional de experiências, os ratos foram ovariectomizados ou com simulação de operação às 4 semanas, e começaram às 12 semanas a receber ou um placebo ou ActRIIa-mFc (2 vezes/semana, 10 mg/kg) (também referido como RAP-11 nas Figuras 19-24), por um período adicional de 12 semanas. Uma diversidade de parâmetros ósseos foram avaliados. Como mostrado na Figura 19, a ActRIIa-mFc aumentou as proporções de volume de osso trabecular vertebral para volume total (BV/VT) tanto em ratos OVX como ratos com operação simulada. A ActRIIa-mFc também aumentou a arquitetura trabecular (Figura 20), aumentou a espessura cortical (Figura 21) e melhorou a resistência óssea (Figura 22). Como mostrado na Figura 23, a ActRIIa-mFc produziu efeitos desejáveis numa gama de doses desde 1 mg/kg até 10 mg/kg.

Histomorfometria óssea foi conduzida às 2 semanas em ratos com operação simulada. Estes dados, apresentados na Figura 24, demonstraram que a ActRIIa-mFc tem um efeito duplo, inibindo a reabsorção óssea e promovendo o crescimento ósseo. Deste modo, a ActRIIa-mFc estimula o crescimento ósseo (efeito anabólico) e inibe a reabsorção óssea (efeito anti-catabólico). BV = Volume ósseo; TV = volume de tecido total. BV/TV é uma medida da percentagem de volume ósseo que é mineralizado. ES = Superfície erodida; BS = Superfície óssea. ES/BS é uma medida da erosão óssea, e a

diminuição causada por RAP-011 demonstra um efeito anti-reabsorção ou anti-catabólico. Ms/Bs é a proporção de superfície de mineralização /superfície óssea, o que é um indicador de crescimento ósseo, ou efeito anabólico. De modo semelhante, a taxa de aposição mineral (MAR) e a taxa de formação óssea por superfície óssea por dia (BFR/BSd) indica crescimento ósseo. Medidas de osteoblastos (Nob/BPm) e osteoclastos (Noc/BPm) são feitas para investigar o mecanismo de ação.

Uma segunda experiência de histomorfometria óssea foi conduzida em ratos fêmeas C57BL/6, com início às doze semanas de idade. Os ratos foram doseados por via intraperitoneal duas vezes por semana com 10 mg/kg de ActRIIa-mFc durante duas semanas, quatro semanas, oito semanas ou doze semanas. Cada grupo foi sacrificado cinco dias depois da última dose e os ossos foram levados para análise. Os ratos foram marcados com calceína nove dias e dois dias antes da eutanásia. Como mostrado na Figura 25, as métricas mostram que a ActRIIamFc promove o crescimento ósseo e a mineralização e tem efeitos tanto anabólicos como anti-catabólicos. Ver por exemplo a proporção BV/TV, a proporção ES/BS e a proporção MS/BS. Os efeitos anabólicos parecem persistir ao longo do regime de dosagem, enquanto que os efeitos anti-reabsorção parecem ter uma vida mais curta nos ratos.

### Exemplo 3: A ActRIIa-mFc melhora ou previne as lesões ósseas num modelo murino de mieloma múltiplo

Doentes de mieloma múltiplo exibem um distúrbio de perda óssea caracterizado pelo aumento da atividade dos osteoclastos e diminuição da formação óssea pelos osteoblastos. O modelo 5T2MM de mieloma em ratos é baseado no uso de células tumorais (células 5T2MM) de um tipo de



tumor espontâneo que se desenvolve em ratos envelhecidos e causa efeitos em ratos que são semelhantes aos vistos em doentes de mieloma múltiplo humano. Ver, por exemplo, Vanderkerken et al., *Methods Mol Med.* 2005; 113:191-205. A ActRIIa-mFc foi testada em relação a efeitos neste modelo.

Células 5T2MM injetadas em ratos C57BI/KaLwRij promoveram um aumento na superfície dos osteoclastos, formação de lesões osteolíticas e causaram uma diminuição na área óssea. A doença óssea foi associada a uma diminuição no número de osteoblastos, superfície dos osteoblastos e uma redução na mineralização.

Ratos com as células 5T2MM foram tratados com ActRIIa-mFc (RAP-01 1) (10mg/kg, i.p. duas vezes por semana), ou um veículo, desde o momento da injeção de 5T2MM, num total de 12 semanas. Análise microCT da tíbia proximal e das vertebrae lombares demonstrou uma redução de 39% e 21% em volume de osso esponjoso ( $p < 0,001$  e  $p < 0,01$ ) e uma redução de 37% e 15% em número trabecular ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ) em ratos com 5T2MM comparado com ratos naïves. RAP-011 preveniu completamente as reduções, induzidas por 5T2MM, de volume trabecular e número tanto na tíbia ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ ) como nas vértebras ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ) quando comparado com ratos tratados com veículos. O volume ósseo foi 19% maior na tíbia ( $p = 168$ ) e 12% maior nas vértebras ( $p < 0,05$ ) de ratos tratados com RAP-01 1 quando comparado com ratos naïve. RAP-011 preveniu o desenvolvimento de lesões ósseas osteolíticas ( $p < 0,05$ ). Este efeito é ilustrado na Figura 26. Enquanto que uma avaliação preliminar dos dados não conseguiu identificar efeitos significativos na paraproteína do soro (um biomarcador de células tumorais de mieloma múltiplo) ou a carga de mieloma neste estudo, uma análise adicional indicou que a paraproteína sérica foi substancialmente reduzida em todos

exceto um dos animais tratados, e ainda que o volume de medula óssea saudável foi substancialmente aumentado, indicando uma diminuição na carga de células tumorais de mieloma.

Conseqüentemente, a ActRIIa-mFc pode ser usada para reduzir os efeitos de doença óssea resultantes de mieloma múltiplo e para tratar as próprias células tumorais.

#### Exemplo 4: Caracterização de uma Proteína ActRIIa-hFc

A proteína de fusão ActRIIa-hFc foi expressa em células CHO-DUKX B11 estavelmente transfectadas a partir de um vetor pAID4 (SV40 ori/melhorador, promotor CMV), usando a sequência líder de plasminogênio tecidual de SEQ ID NO:9. A proteína, purificada como descrito acima no Exemplo 1, tinha uma sequência da SEQ ID NO:7. A porção Fc é uma sequência Fc de IgG1 humana, como mostrado na SEQ ID NO:7. A análise de ácido siálico mostrou que a proteína continha, em média, entre cerca de 1,5 e 2,5 moles de ácido siálico por molécula de proteína de fusão ActRIIa-hFc.

Esta proteína purificada mostrou uma semivida no soro extraordinariamente longa em todos os animais testados, incluindo uma semivida de 25-32 dias em doentes humanos (ver Exemplo 5, abaixo). Adicionalmente, o material expresso em células CHO tem uma maior afinidade para o ligando activina B do que o registado para uma proteína de fusão ActRIIa-hFc expressa em células 293 humanas (del Re et al., J Biol Chem. 2004 Dec 17;279(51):53126-35.) Adicionalmente, o uso da sequência líder tPa proporcionou maior produção do que outras sequências líder e, ao contrário da ActRIIa-Fc expressa com uma sequência líder nativa, proporcionou uma sequência N-terminal altamente pura. O uso da sequência líder nativa resultou em duas

espécies principais de ActRIIa-Fc, cada uma com uma sequência N-terminal diferente.

Exemplo 5: Ensaio Clínico Humano (não faz parte da invenção)

A proteína descrita no Exemplo 4 foi administrada a doentes humanos num estudo aleatório, duplamente cego, controlado por placebo que foi conduzido para avaliar, principalmente, a segurança da proteína em mulheres saudáveis após a menopausa. Quarenta e oito indivíduos foram aleatoriamente postos em grupos de 6 para receber ou uma dose única de ActRIIa-hFc ou de placebo (5 ativos:placebo). Os níveis de dosagem variaram desde 0,01 até 3,0 mg/kg por via intravenosa (IV) e 0,03 até 0,1 mg/kg por via subcutânea (SC). Todos os indivíduos foram seguidos durante 120 dias. Os indivíduos foram excluídos da participação no estudo se tomassem medicação que afeta o metabolismo ósseo nos 6 meses antes da entrada no estudo. Avaliações de segurança foram conduzidas seguindo cada grupo para determinar aumento da dose. Para além de análises farmacocinéticas (PK), a atividade biológica da ActRIIa-hFc foi também avaliada por medição de marcadores bioquímicos de formação e reabsorção óssea, e níveis de FSH.

Não foram registados efeitos secundários graves neste estudo. Efeitos adversos (AEs) foram geralmente ligeiros e transitórios. A análise preliminar dos AEs incluiu dor de cabeça, valores laboratoriais elevados, sintomas de constipação, emese ou vómitos, intravenosa infiltração, e hematoma no sítio da injeção.

A análise PK da ActRIIa-hFc exibiu um perfil linear com a dose, e uma semivida média de aproximadamente 25-32 dias. A área sob a curva (AUC) para ActRIIa-hFc estava linearmente

relacionada com a dose, e a absorção após dosagem SC foi essencialmente completa (ver Figuras 27 e 28). Estes dados indicam que SC é uma abordagem desejável para doseamento porque proporciona biodisponibilidade equivalente e semivida sérica do fármaco ao mesmo tempo que evita picos nas concentrações séricas do fármaco associados aos primeiros dias da dosagem IV (ver Figura 28). ActRIIc-hFc causou um aumento rápido sustentado e dependente da dose nos níveis séricos da fosfatase alcalina específica do osso (BAP), que é um marcador para crescimento ósseo anabólico, e uma redução dependente da dose no telopéptido de colagénio tipo 1 C-terminal e nos níveis de fosfatase ácida 5b resistente a tartrato, que são marcadores para a reabsorção óssea. Outros marcadores, tais como P1NP mostraram resultados inconclusivos. Os níveis de BAP mostraram efeitos quase saturantes na dosagem mais elevada do fármaco, indicando que efeitos semi-máximos neste biomarcador de osso anabólico podem ser alcançados numa dosagem de 0,3 mg/kg, com aumentos variando até 3 mg/kg. Calculado como a relação entre o efeito farmacodinâmico e AUC para o fármaco, a EC50 é 51,465 (dia\*ng/mL). Ver Figura 29. Estas alterações nos biomarcadores do osso foram continuadas durante aproximadamente 120 dias nos níveis de dosagem mais elevados testados. Houve também uma redução dependente da dose nos níveis séricos de FSH consistente com a inibição da activina.

Uma dose única de ActRIIa-hFc dada a mulheres saudáveis após a menopausa foi segura e bem tolerada para a gama de níveis de dosagem testada. Os efeitos de PK e farmacodinâmica prolongados sugerem que a dosagem intermitente seria apropriada para estudos futuros. Por exemplo, dosagem com base na semivida sérica pode ser realizada mensalmente, ou pela ordem de uma vez a cada duas, três, quatro, cinco ou seis semanas. Adicionalmente,

e porque o efeito farmacodinâmico se estende para além da permanência do fármaco no soro, a dosagem poderia ser realizada com base no efeito farmacodinâmico, o que significa que a dosagem a cada três meses ou a cada dois, três, quatro, cinco, seis ou mesmo doze meses pode ser eficaz para produzir o efeito desejado nos doentes. Este ensaio clínico demonstra que, em humanos, a ActRIIa-hFc é um agente osteoanabólico com evidência biológica tanto de aumento na formação de osso como diminuição na reabsorção óssea.

#### Exemplo 6: Coadministração de ActRIIa-mFc e um Bisfosfonato

Bisfosfonatos são uma classe de fármacos que são amplamente usados para tratar distúrbios associados a baixa densidade mineral óssea, incluindo osteoporose e perda de osso relacionada com cancro. Os bisfosfonatos têm uma atividade de anti-reabsorção potente, inibindo os osteoclastos. Talvez porque os osteoclastos são necessários para a degradação óssea e crescimento ósseo, os bisfosfonatos parecem diminuir os efeitos da hormona paratiroide (PTH), um dos únicos agentes de crescimento ósseo anabólico conhecidos (Black et al., N Engl J Med. 2003 Sep 25;349(13):1207-15; Samadfam et al., Endocrinology. 2007 Jun;148(6): 2778-87.)

Para testar a utilidade do tratamento com ActRIIa-Fc em doentes que receberam previamente ou concomitantemente bisfosfonatos ou outras terapias anti-reabsorção, ratos foram testados com uma combinação de ActRIIa-mFc e zoledronato, um composto bisfosfonato. Ratos C57BL/6N de 12 semanas de idade foram tratados como se segue:

Grupo 1 PBS

Grupo 2 ActRIIa-mFc (RAP-011) (10 mg/kg) duas vezes por semana (com Grupo 3 e 4)

Grupo 3 Ácido Zoledrónico (ZOL) dose única (20 mg/kg)

Grupo 4 ZOL (1 dose), 3 dias depois ActRIIa-mFc (RAP-011) (10 mg/kg) duas vezes por semana

Grupo 5 ZOL (1 dose), 3 dias depois ActRIIa-mFc (RAP-011) (10 mg/kg) duas vezes por semana

BMD Total foi determinado por análise DEXA (PIXI) antes da dosagem e às 3 e 8 semanas de tratamento.

Como mostrado na Figura 30, a BMD total aumentou significativamente em todos os grupos de tratamento, com a combinação de ZOL e ActRIIa-mFc produzindo os maiores efeitos. Estes resultados indicam que as proteínas ActRIIa-Fc podem ser usadas para aumentar a densidade óssea, mesmo em doentes que receberam terapia com bisfosfonato.

#### Exemplo 7: ActRIIa-Fc Melhora ou Previne a Perda de Osso Causada por Metástases de Cancro da Mama (não faz parte da invenção)

Estima-se que 65 a 75 por cento dos cancros da mama metastizem no osso, causando danos substanciais na estrutura óssea, aumentando o risco de fratura e causando dor e outros efeitos secundários. Nós testámos os efeitos da ActRIIa-Fc num modelo de rato de cancro da mama que metastizou no osso.

Uma sublinha da linha celular MDA-MH-231 (clone 2287) do cancro da mama humano foi cultivada in vitro e as células foram recolhidas numa densidade de  $5 \times 10^6$  células/mL. MDA-MB-231 é uma linha celular que é altamente competente para se plantar no osso e causar danos ósseos semelhantes aos causados por metástases ósseas. 10 mL de células foram injetados na tíbia de ratos nus atímicos fêmeas com 6

semanas de idade ao dia 0 do estudo. Ao dia 10 do estudo, os ratos receberam ActRIIa-mFc (10 mg/kg/duas vezes por semana/ por via subcutânea) (n=8) ou veículo PBS (n=7). A progressão da doença foi avaliada por absorciometria com raio-X de dupla energia (PIXIMus) semanalmente. Os ratos foram tratados com ActRIIa-mFc durante 4 semanas e depois sacrificados e as tíbias (com tumor injetado e sem tumor) foram recolhidas de cada animal. As tíbias foram depois processadas e preparadas para microCT análise histológica.

A injeção intratibial de células MDA-MB-231 em ratos nus atímicos promoveu o desenvolvimento de lesões osteolíticas e da tibia injetada comparada com a perna contralateral. A análise MicroCT da tibia proximal demonstrou uma redução de 62% em volume de osso esponjoso nas tíbias com MDA-MB-231 comparado com as tíbias sem tumor em ratos tratados com veículo PBS. O tratamento com ActRIIa-mFc conduziu a um aumento de 70% ou 147% nas tíbias com tumor ou naïves respectivamente comparado com o veículo ( $P < 0,01$  para ambos). As tíbias com tumor dos ratos tratados com ActRIIa-mFc tiveram densidade de osso esponjoso semelhante às das tíbias naïve dos ratos tratado com VEH ( $p = 0,39$ ).

Assim, a ActRIIa-mFc é capaz de eliminar os danos ósseos associados à presença de células de tumor mamário no osso.

#### Exemplo 8: Proteínas ActRIIa-Fc Alternativas

Uma construção alternativa pode ter uma deleção na causa C-terminal (os últimos 15 aminoácidos do domínio extracelular da ActRIIa. A sequência para tal construção é apresentada abaixo (Porção Fc sublinhada) (SEQ ID NO: 12):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG  
CWLDDINCYDRTDCEVEKKDSPEVYFCECEGNMCNEKFSYFPMTGGGTHTCPPCPA  
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEOYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGOPRE  
POVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTPPVLDSDG  
SFFLYSKLTVDKSRWOOGNVFCSSVMHEALHNHYTOKLSLSLSPGK



**REIVINDICAÇÕES**

1. Composição farmacêutica compreendendo uma proteína de fusão ActRIIa-Fc expressa a partir de células CHO, em que a proteína de fusão ActRIIa-Fc é um dímero formado por dois polipéptidos em que cada um tem uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% ou 95% idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:7 unidos por uma ligação dissulfureto, e em que o dímero tem entre 3 e 5 porções de ácido siálico.
2. A composição farmacêutica da reivindicação 1, em que a proteína de fusão ActRIIa-Fc é um dímero formado por dois polipéptidos da SEQ ID NO:7, e em que um ou ambos os polipéptidos têm opcionalmente um aminoácido a menos nas terminações amina ou carboxi que são mostradas na SEQ ID NO:7.
3. A composição farmacêutica da reivindicação 1 ou reivindicação 2, em que a proteína de fusão ActRIIa-Fc é expressa de forma recombinante em células CHO usando a sequência líder TPA da SEQ ID NO:9.
4. A composição farmacêutica de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o dímero tem 4 porções de ácido siálico.
5. A composição farmacêutica de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a proteína de fusão ActRIIa-Fc tem uma semivida no soro de 25 até 32 dias em média, em humanos saudáveis normais e biodisponibilidade equivalente quando administrada por via intravenosa ou subcutânea.

6. A composição farmacêutica de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a composição farmacêutica é adequada para administração subcutânea.
7. A composição farmacêutica de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a proteína de fusão ActRIIa-Fc é pelo menos 90% pura no que respeita a outros componentes proteicos.
8. A composição farmacêutica de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a referida proteína de fusão ActRIIa-Fc inclui um ou mais resíduos de aminoácido modificados selecionados a partir de: um aminoácido glicosilado, um aminoácido PEGilado, um aminoácido farnesilado, um aminoácido acetilado, um aminoácido biotinilado, um aminoácido conjugado a uma porção lipídica, and um aminoácido conjugado a um agente orgânico derivatizante.
9. A composição farmacêutica de qualquer uma das reivindicações anteriores, compreendendo adicionalmente um agente bisfosfonato.
10. A composição farmacêutica da reivindicação 9, em que o agente bisfosfonato é selecionado a partir de alendronato, ibandronato e risedronato.
11. Composição farmacêutica compreendendo uma proteína de fusão ActRIIa-Fc para uso no tratamento ou prevenção de mieloma múltiplo num doente humano, em que a composição farmacêutica é como definido em qualquer uma das reivindicações 1 até 10.
12. Uso de uma proteína de fusão ActRIIa-Fc para o fabrico de um medicamento para tratamento ou prevenção de

mieloma múltiplo num doente humano, em que a proteína de fusão ActRIIa-Fc é como definido em qualquer uma das reivindicações 1 até 10.

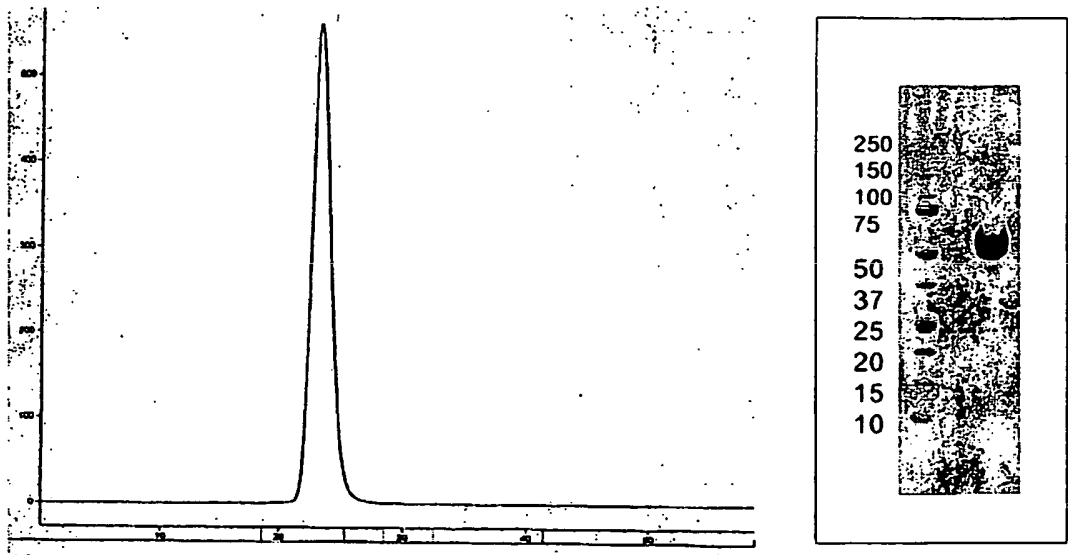


Figura 1

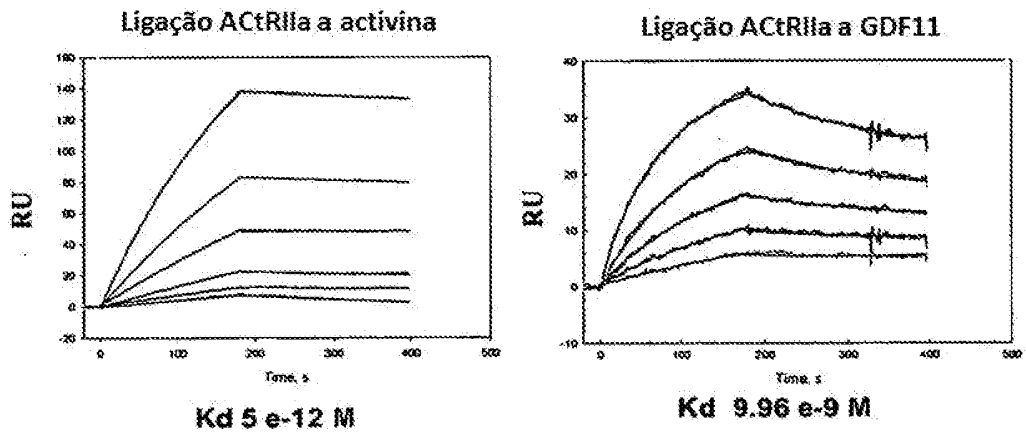


Figura 2

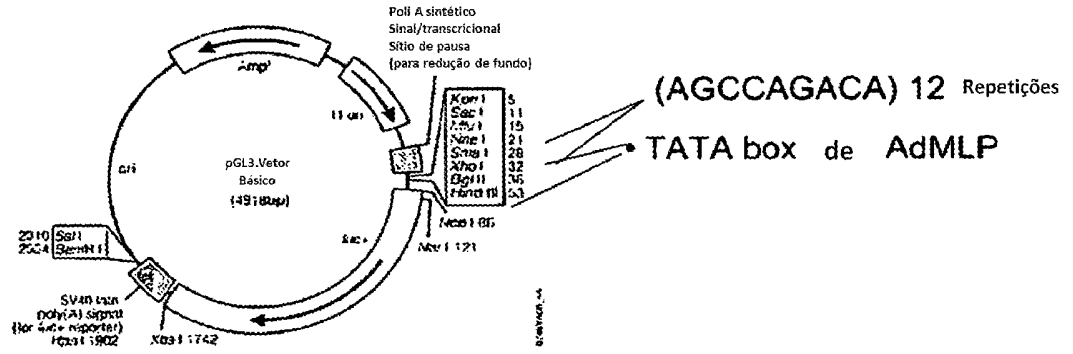


Figura 3

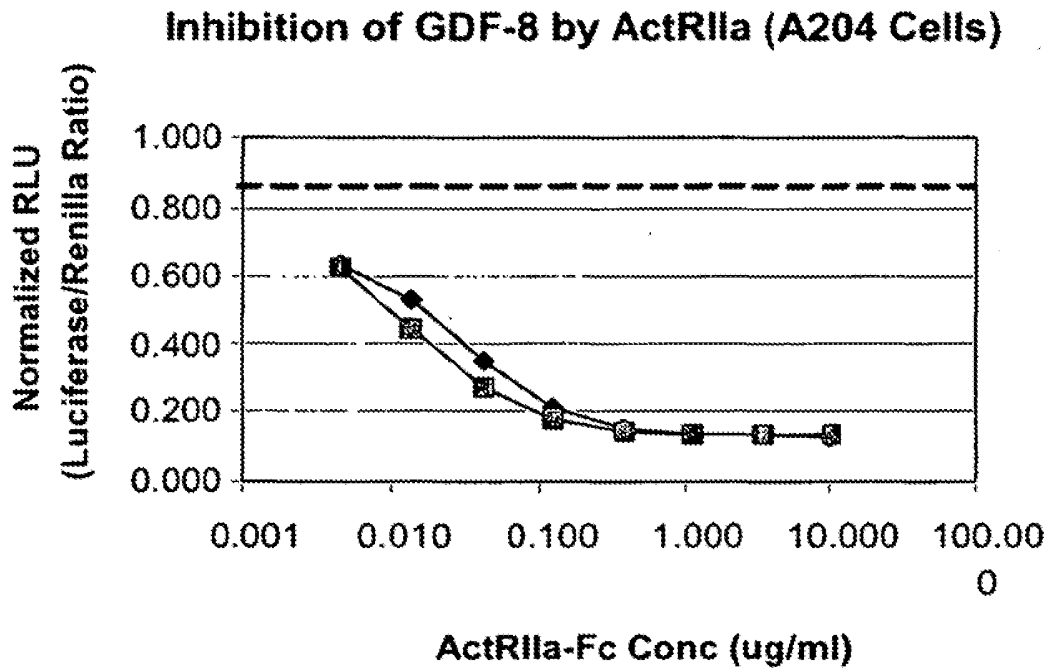


Figura 4

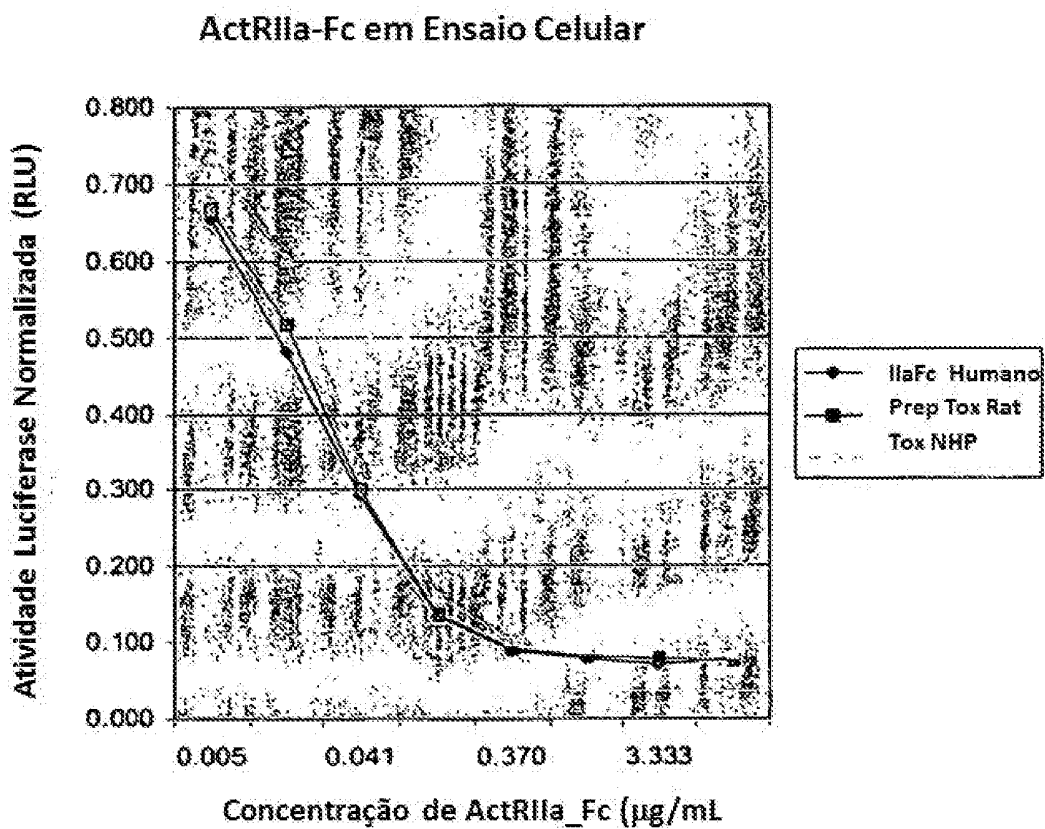


Figura 5



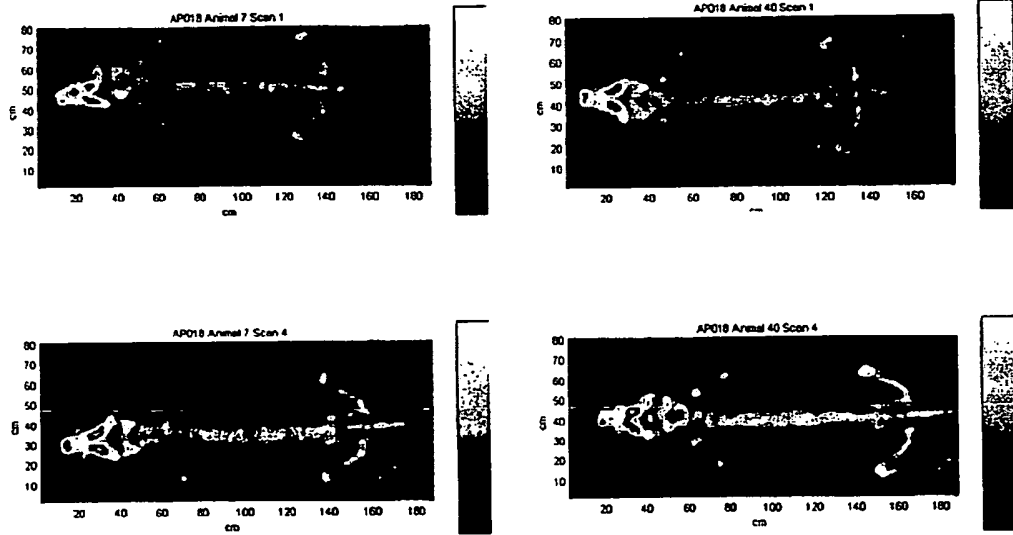


Figura 6

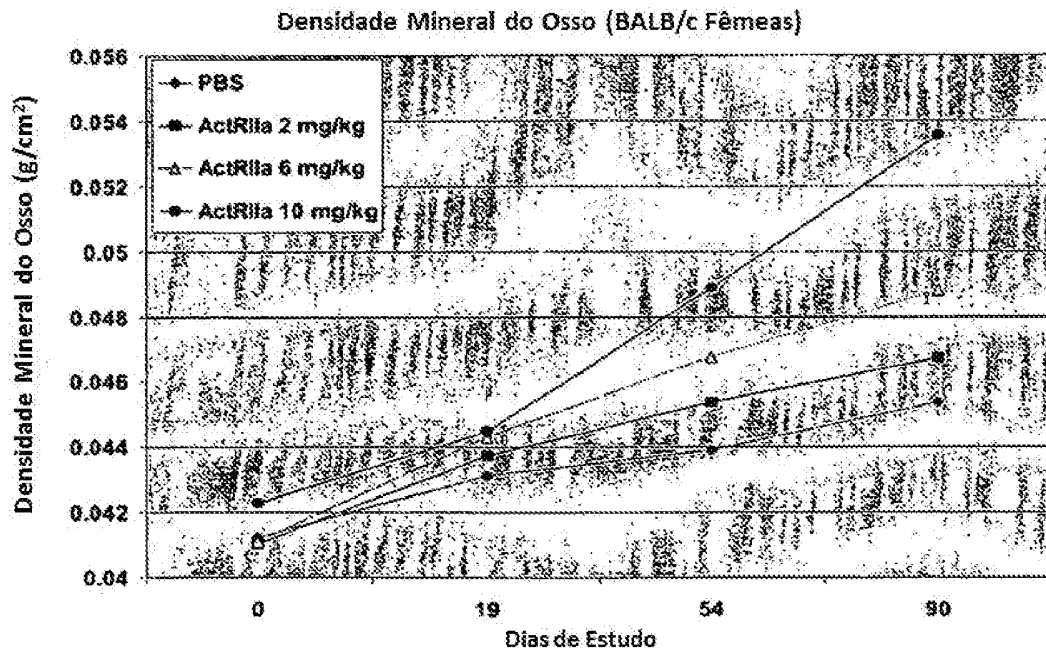


Figura 7

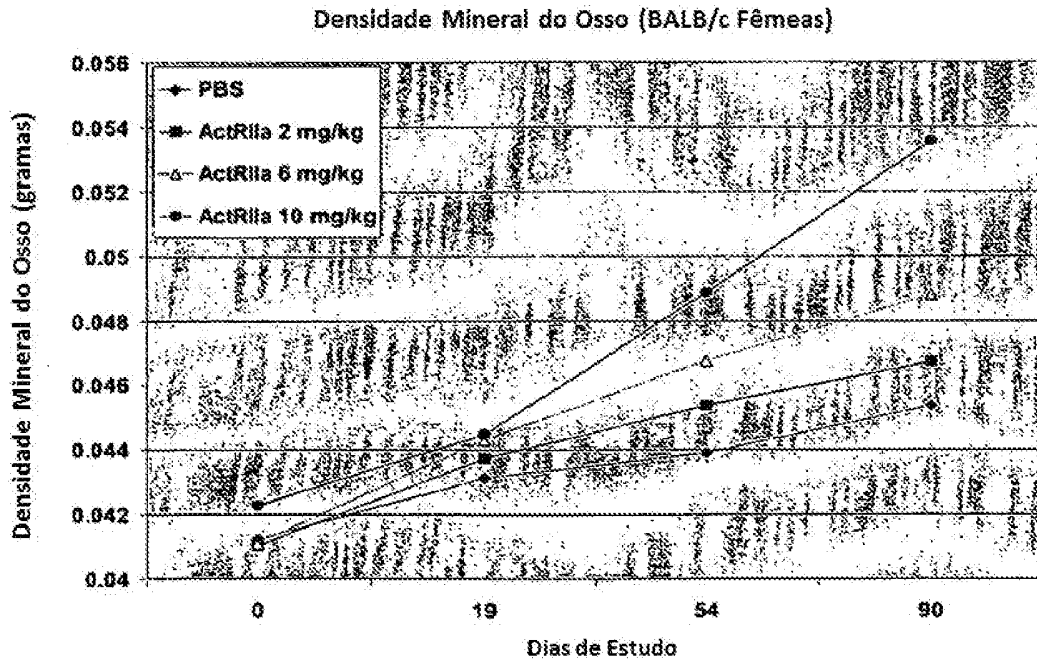


Figura 8

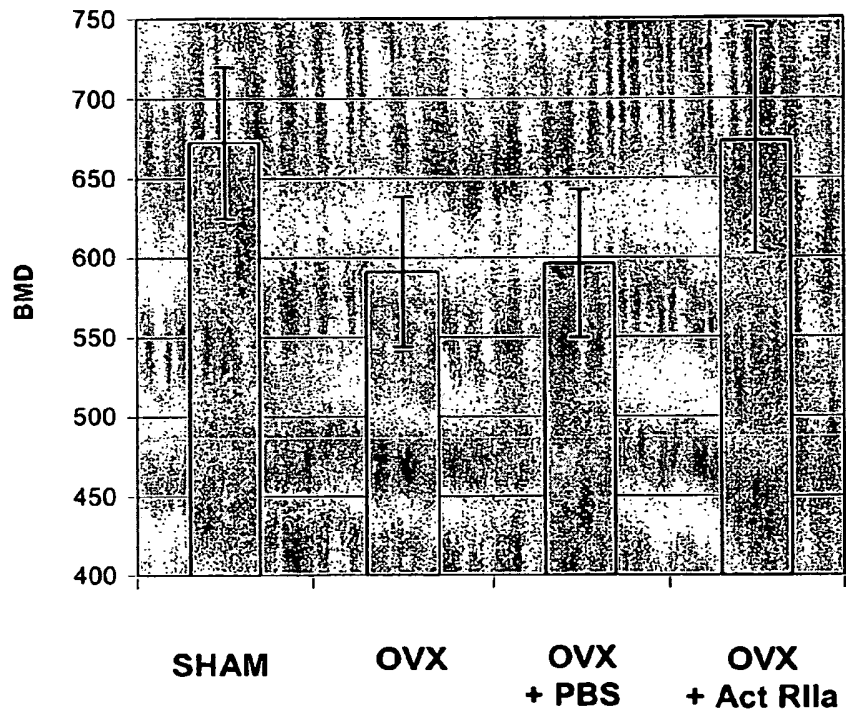


Figura 9

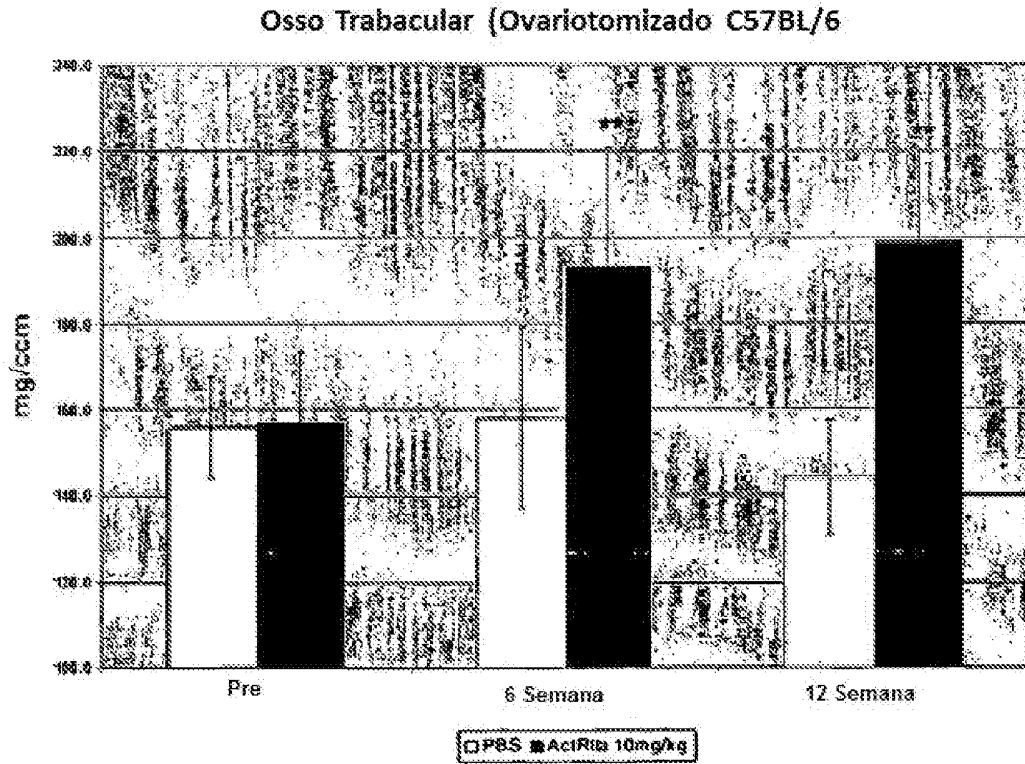


Figura 10

Osoo Trabacular (C57BL/6 Simulado)

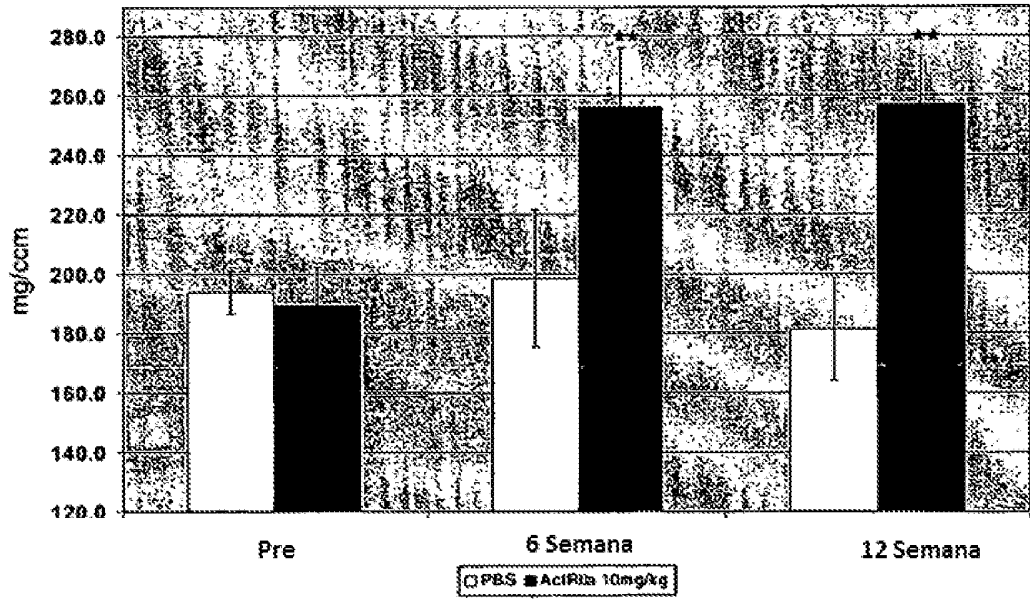


Figura 11

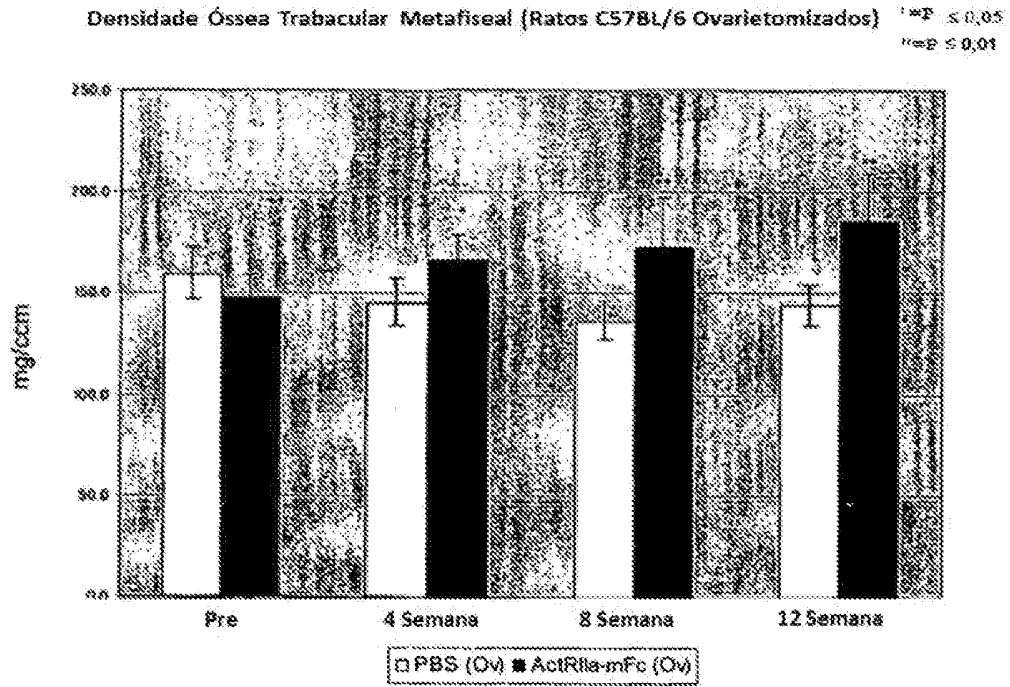


Figura 12

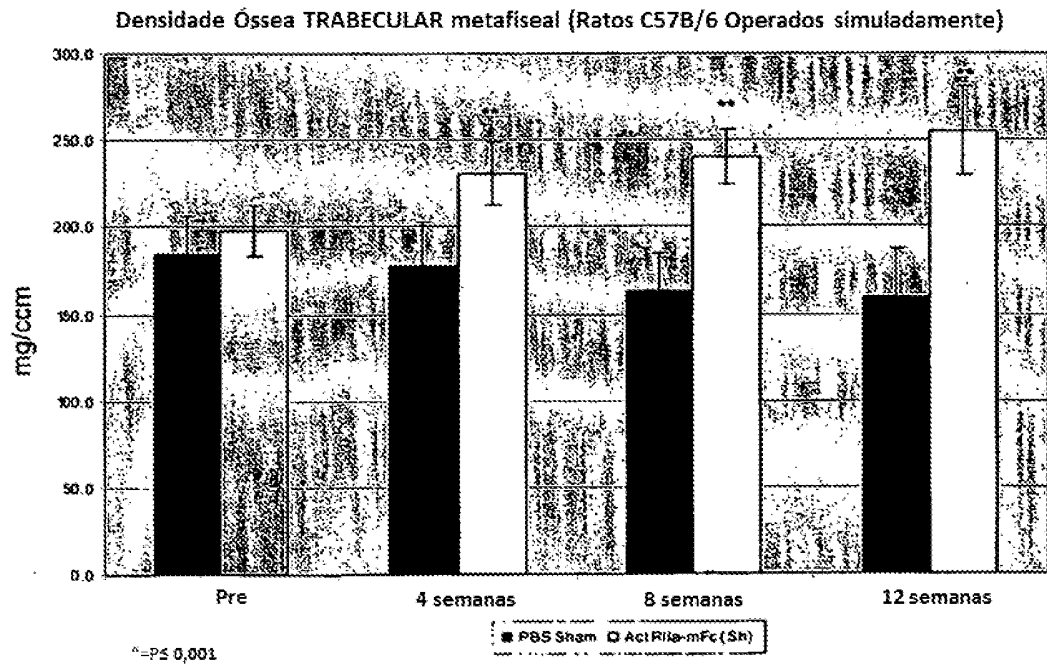


Figura 13



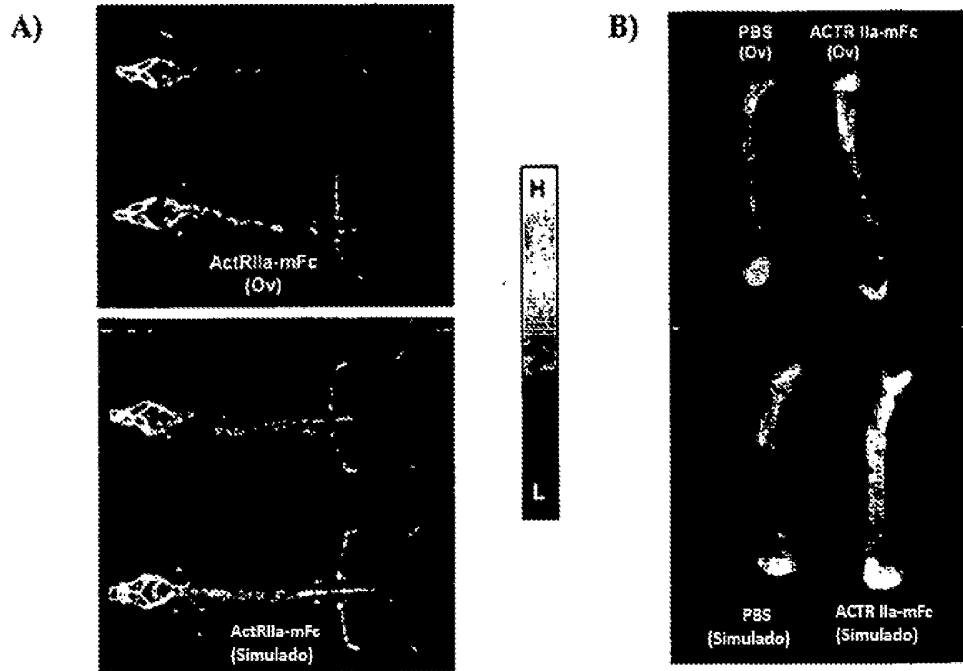


Figura 14

### Conteúdo Ósseo Diafiseal dos Fêmures

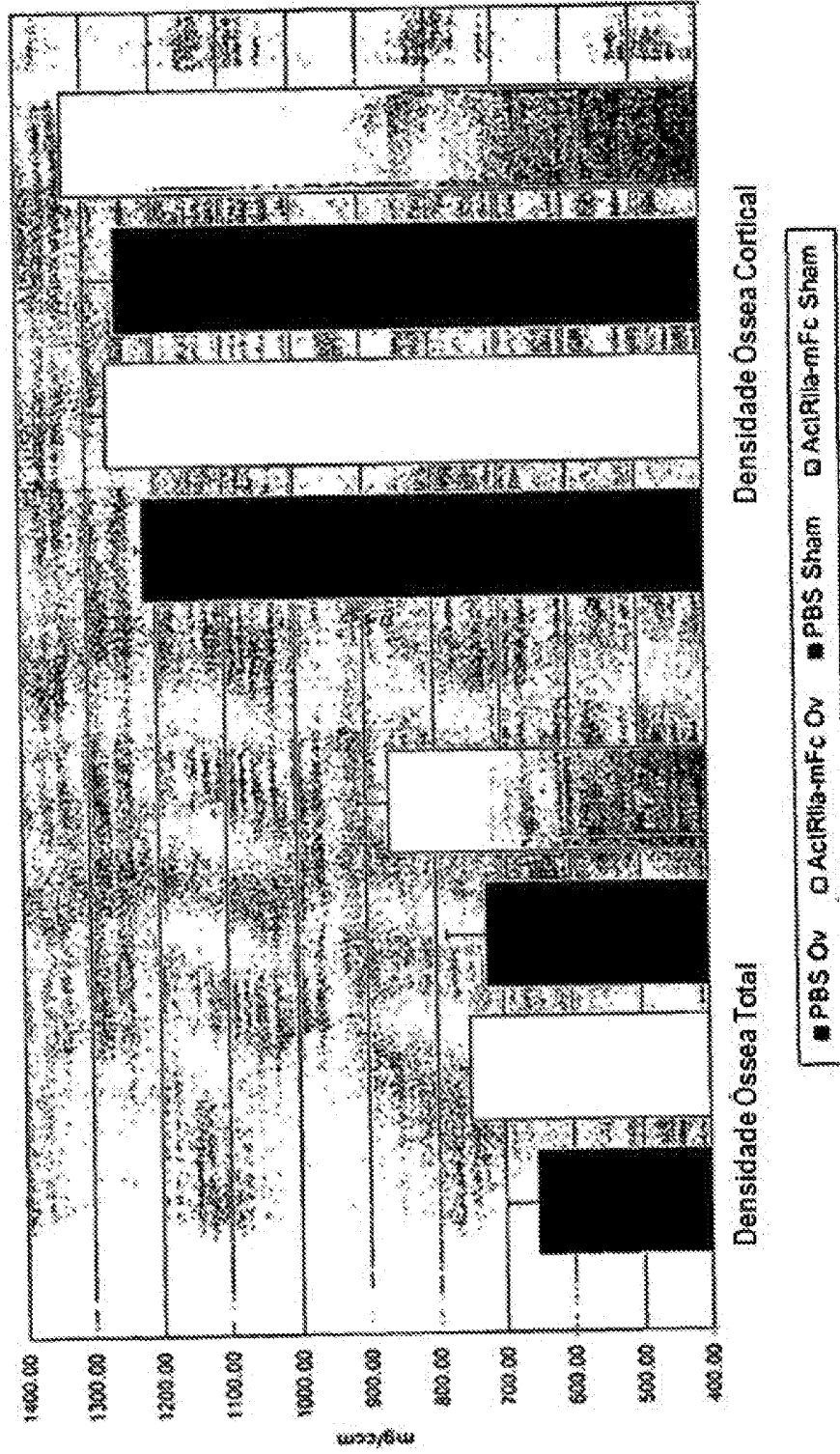


Figura 15

### Conteúdo Ósseo Diafiseal dos Fêmures

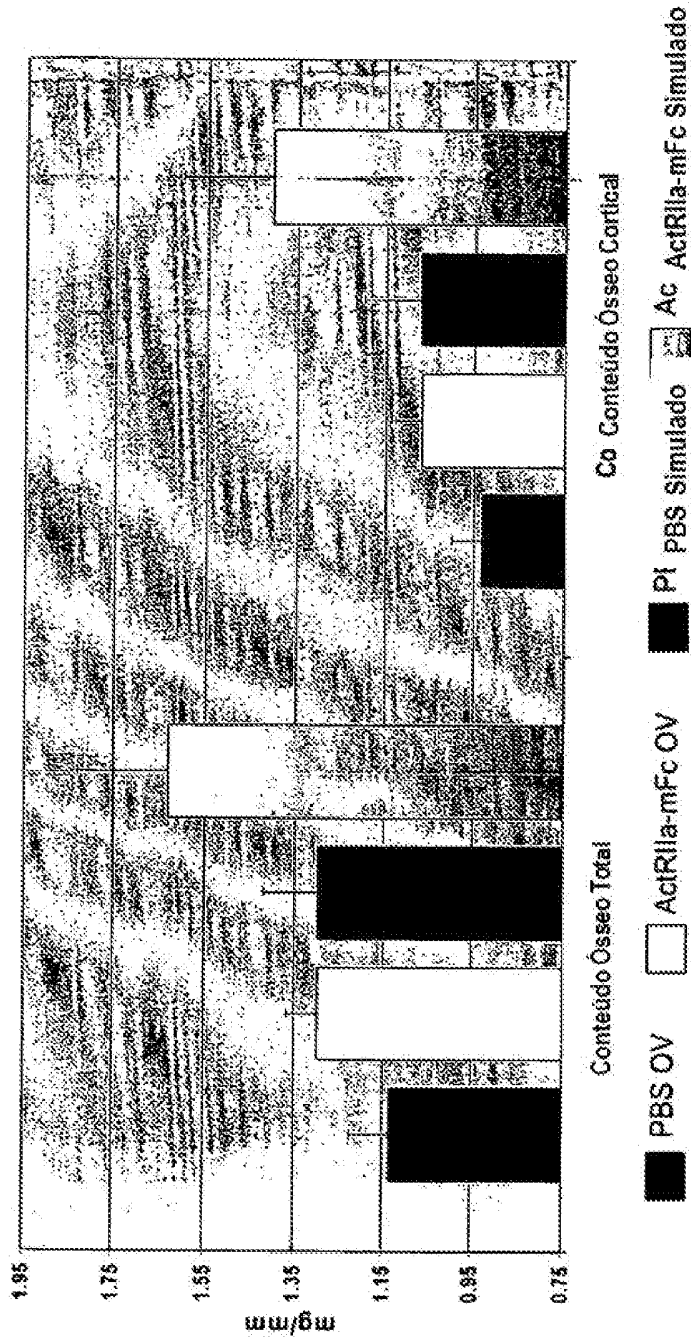


Figura 16

### Espessura Cortical Femoral Ex vivo

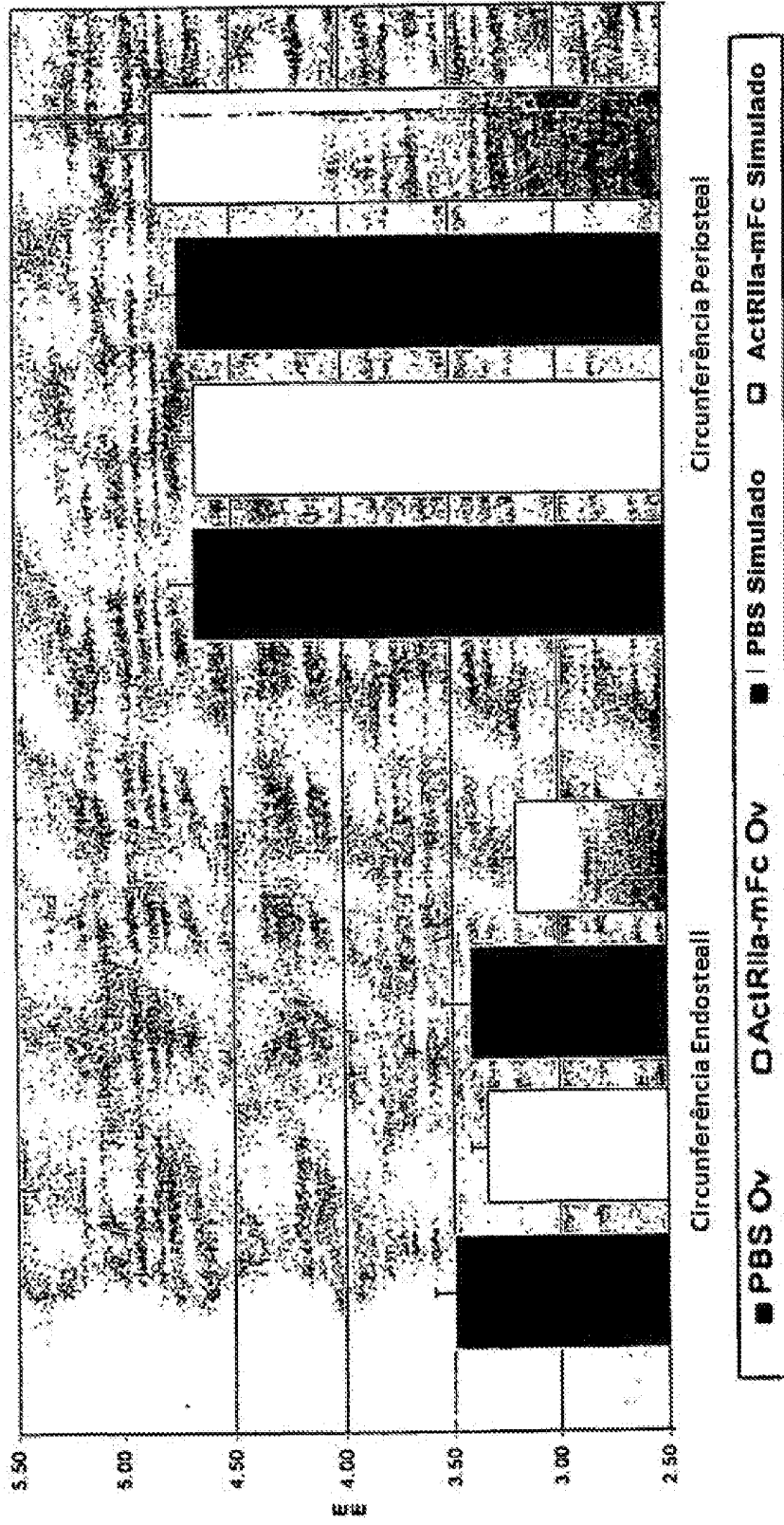


Figura 17

### Teste biomecânico de quatro pontos

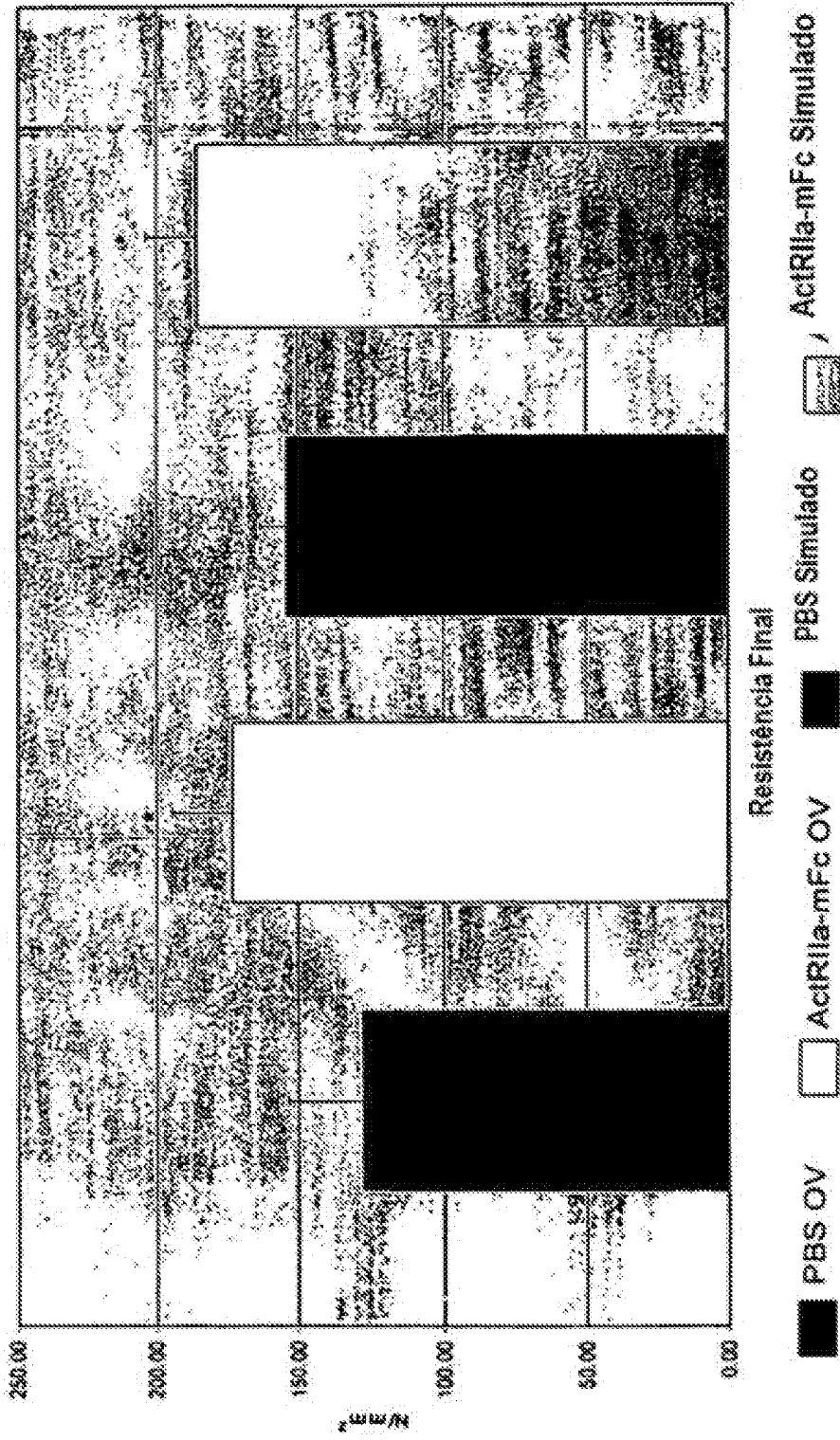
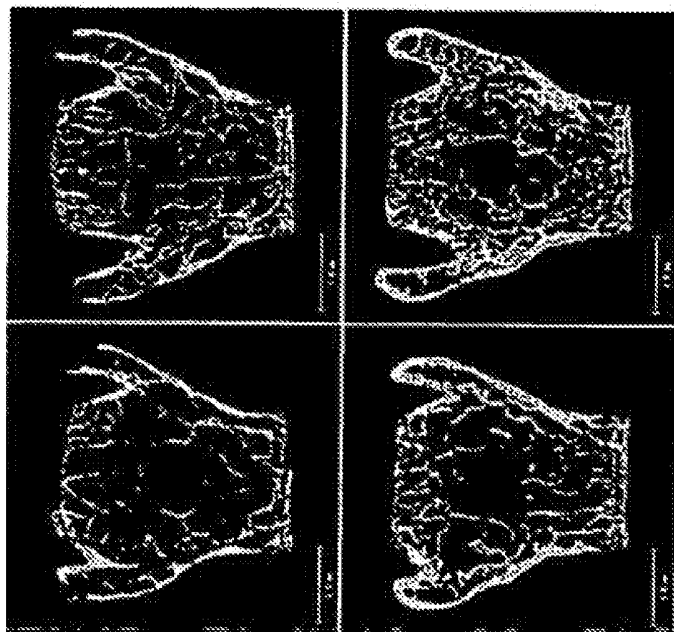


Figura 18



Dados microCT mostrados no fim do estudo (idade 24 semanas)

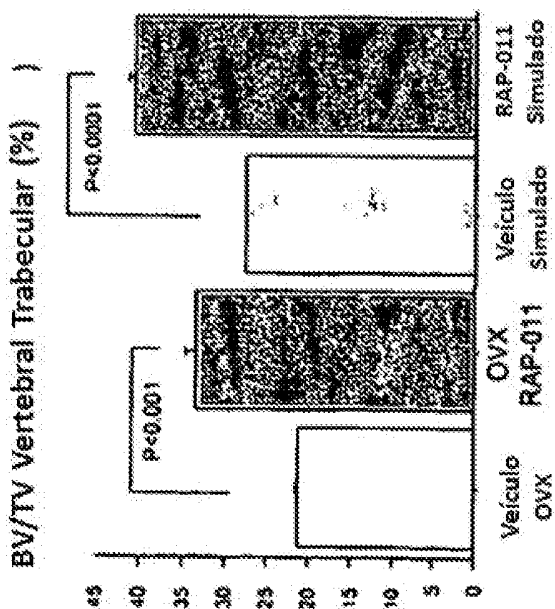
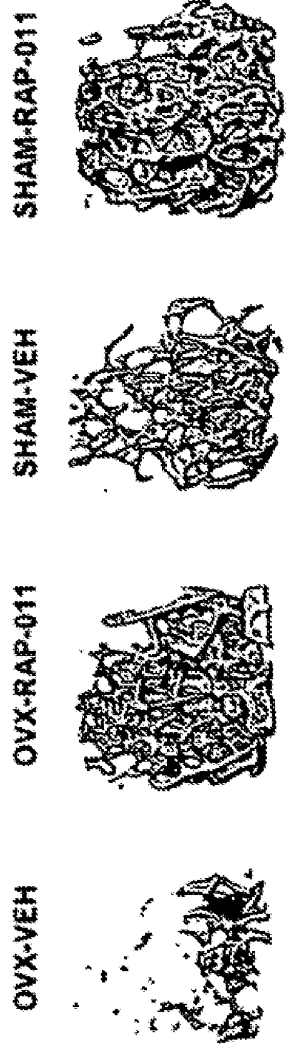


Figura 19



@ 12 weeks	OVX-VEH	OVX-RAP-011	SHAM-VEH	SHAM-RAP-011
Tb N (mm <sup>-1</sup> )	2.1 ± 0.3	3.5 ± 0.2 **	3.0 ± 0.2	4.1 ± 0.2 **
Tb Sp (µm)	486.2 ± 79	283.9 ± 21 **	332.4 ± 25	230.2 ± 12 **
Conn D (mm <sup>-3</sup> )	8.4 ± 6	85.1 ± 13.7 **	41.4 ± 14.8	131.2 ± 16.5 **

\*\*p < 0,01 vs VEH

Figura 20

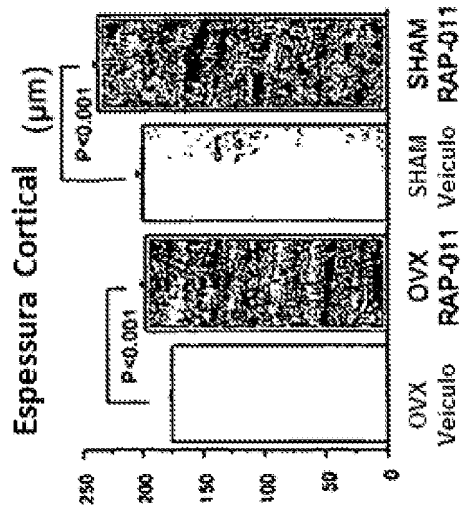
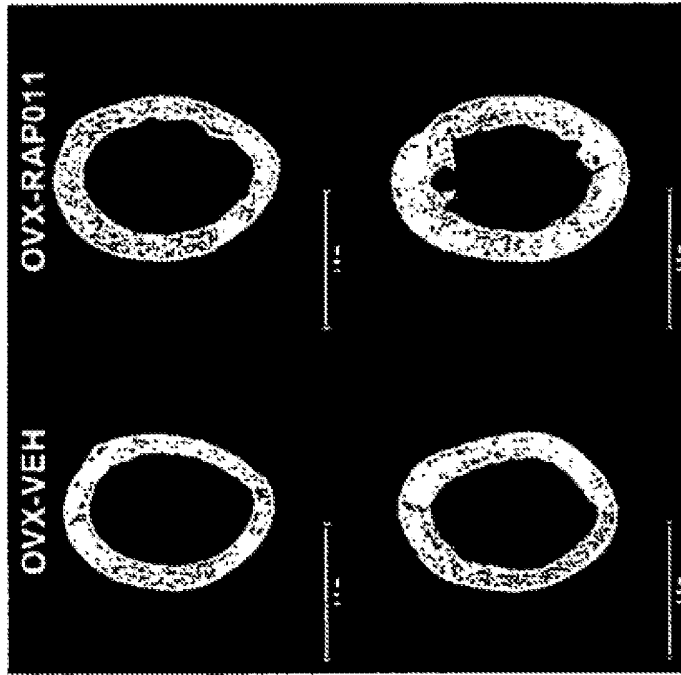
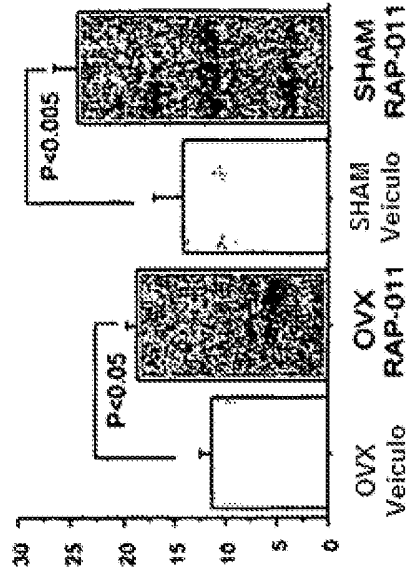


Figura 21



Energia-para-Falha Femural (N-mm)



Energia-para-Falha Vertebral (N-mm)

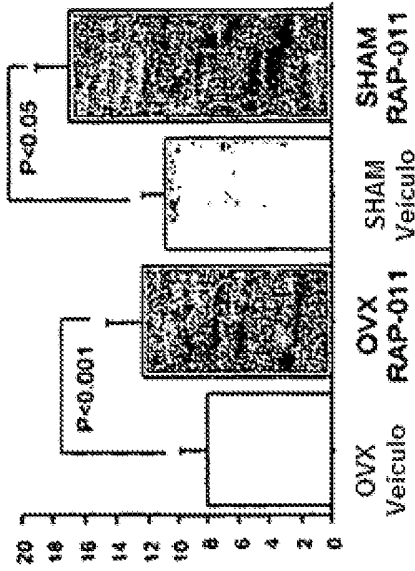


Figura 22

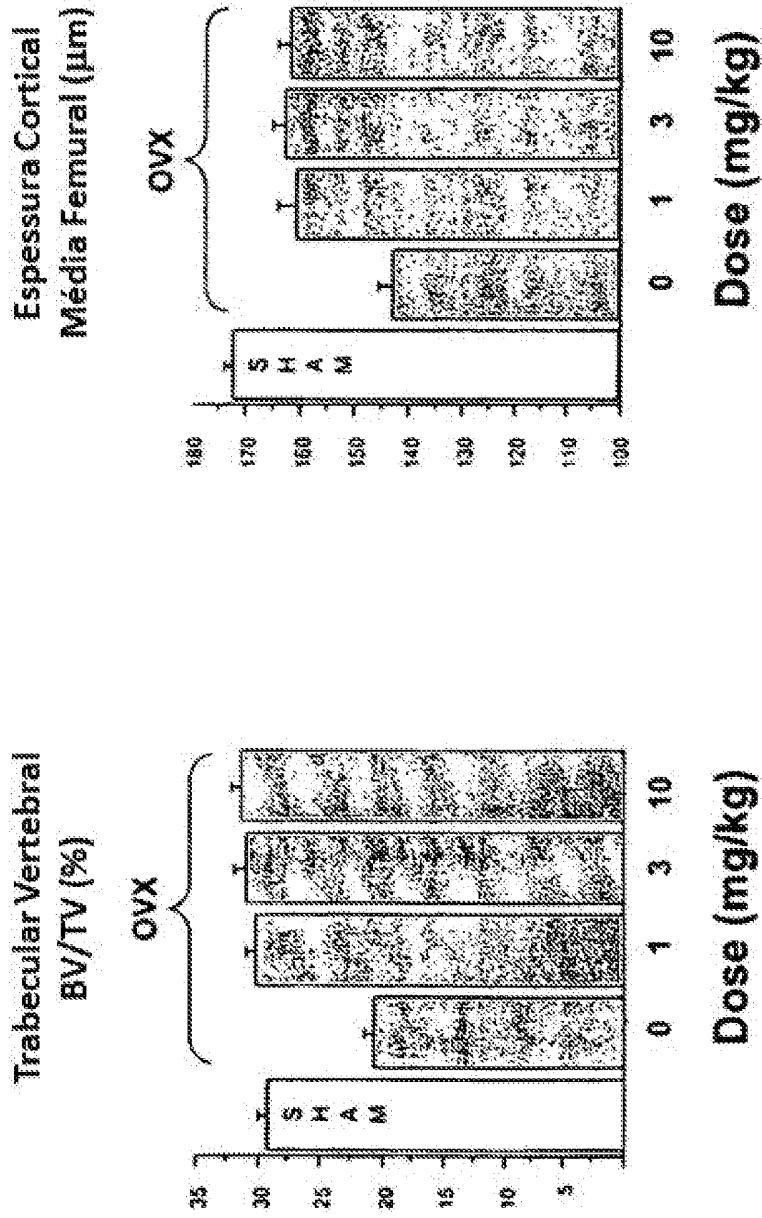


Figura 23

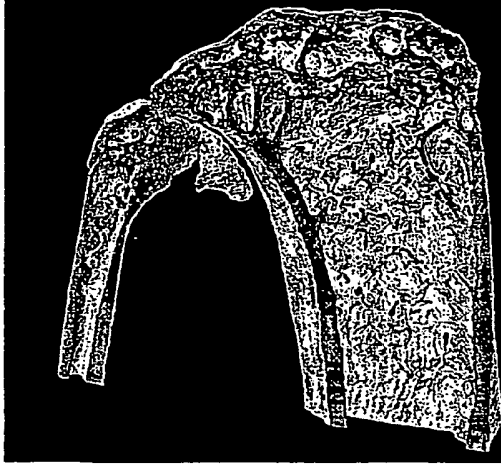
	BV/TV (%)	ES/BS (%)	Nob/BPm ( /mm)	Noc/BPm ( /mm)	Ms/Bs (%)	MAR $\mu\text{m}/\text{dia}$	BFR/BSd $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3/\text{dia}$
PBS mean	7.53	17.36	49.33	7.55	4.206	0.704	0.029
RAP-011 mean	10.88	13.93	40.89	5.34	7.546	0.852	0.065
P value	0.002	0.03	0.02	0.01	0.008	0.03	0.002

Figura 24

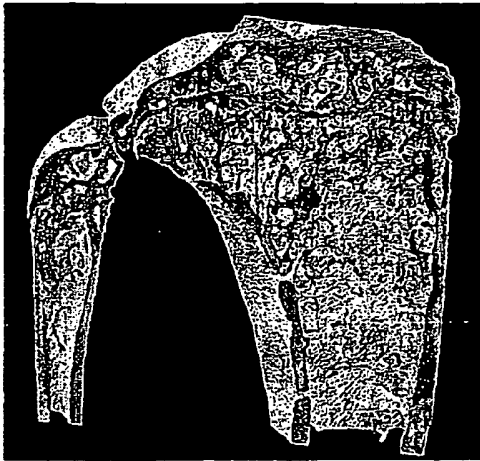
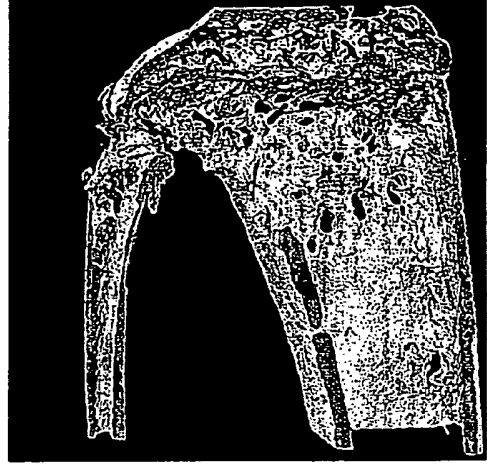
Parâmetro	2 semanas VEH (n=5)	2 semanas EAP-011 (n=6)	4 semanas VEH (n=6)	4 semanas BAP-013 (n=6)	6 semanas VEH (n=6)	6 semanas BAP-031 (n=6)	12 semanas VEH (n=6)	12 semanas BAP-031 (n=6)
Volume de osso (BV/TV), %	7.53 ± 0.35	10.88 ± 0.45*	7.88 ± 0.21	15.37 ± 1.39*	8.14 ± 0.41	14.31 ± 0.53*	4.38 ± 0.42	15.24 ± 1.08*
Superfície Osteóide (OS/BS), %	4.85 ± 0.34	5.32 ± 0.48	3.85 ± 0.41	3.88 ± 0.35	3.95 ± 0.34	3.31 ± 0.42	2.1 ± 0.46	1.81 ± 0.08
Superfície eróide (ES/BS), %	17.36 ± 0.88	11.23 ± 0.98*	13.61 ± 1.6	12.01 ± 1.39	12.38 ± 1.31	11.89 ± 0.77	8.56 ± 0.77	10.0 ± 0.34
Número de osteoblastos/área (Ob/Tar), no./mm	419.89 ± 24.33	455.31 ± 28.29	411.84 ± 44.61	457.78 ± 51.13*	485.32 ± 24.2	634.51 ± 15.35*	238.69 ± 14.2	521.86 ± 22.77*
Superfície osteóide/área/osteoblastos (Oc/TS), no./mm	35.12 ± 2.42	39.43 ± 1.84*	33.5 ± 2.53	39.14 ± 1.93	39.5 ± 1.27	38.92 ± 1.29	28.46 ± 1.32	30.24 ± 1.6
Osteoblastos no perímetro do osso (Noc/BS), %	48.33 ± 2.82	40.89 ± 1.46*	48.82 ± 4.16	41.33 ± 3.25	49.61 ± 2.87	49.2 ± 3.38	39.4 ± 2.02	36.68 ± 2.53
Número de osteoclastos/área (Oc/Tar), no./mm	55.81 ± 4.87	59.82 ± 5.84	51.42 ± 3.33	65.88 ± 6.18	45.23 ± 3.98	62.95 ± 5.18*	28.07 ± 1.88	51.15 ± 1.87*
Osteoclastos no perímetro do osso (Noc/BS), %	7.88 ± 0.33	5.34 ± 0.45*	8.28 ± 0.66	4.78 ± 0.55	6.74 ± 0.58	4.86 ± 0.4	4.88 ± 0.32	4.88 ± 0.17
Superfície Osteoclastos/área/osteoclastos (Oc/OS/BS), %	8.78 ± 0.78	6.23 ± 0.5*	6.86 ± 0.67	6.38 ± 0.62	6.38 ± 0.67	3.8 ± 0.48	6.86 ± 0.77	10.0 ± 0.34
Espessura Trabecular (TbSp), $\mu$ m	13.89 ± 1.48	15.62 ± 0.45*	13.11 ± 0.48	17.58 ± 0.78*	12.04 ± 0.5	17.29 ± 0.36*	11.18 ± 0.52	17.49 ± 1.82*
Número Trabecular (TbN), no./mm	167.74 ± 6.88	127.67 ± 7.35*	175.98 ± 9.3	88.81 ± 6.95*	187 ± 7.13	184.26 ± 3.42*	251.79 ± 10.14	88.87 ± 4.47*
Superfície de mineralização (MS/BS), %	5.56 ± 0.19	7.55 ± 0.36*	5.94 ± 0.23	8.73 ± 0.5*	5.07 ± 0.16	8.27 ± 0.22*	3.89 ± 0.27	8.7 ± 0.29*
Taxa de deposição mineral (Min/BS), %/ano	4.21 ± 0.7	7.55 ± 0.73*	4.15 ± 1.02	8.84 ± 0.77*	3.6 ± 0.68	7.37 ± 0.73*	3.86 ± 0.4	6.68 ± 0.51*
Taxa formação de osso (m <sup>3</sup> /mm <sup>2</sup> /dia)	0.704 ± 0.049	0.852 ± 0.038*	0.556 ± 0.042	0.842 ± 0.014	0.517 ± 0.02	0.801 ± 0.016*	0.476 ± 0.068	0.633 ± 0.013*
	0.029 ± 0.004	0.065 ± 0.009*	0.025 ± 0.008	0.087 ± 0.003*	0.019 ± 0.003	0.048 ± 0.004*	0.016 ± 0.002	0.038 ± 0.002*

Figura 25

Naive



5T2 (Tumor)



5T2 + RAP011

Figura 26

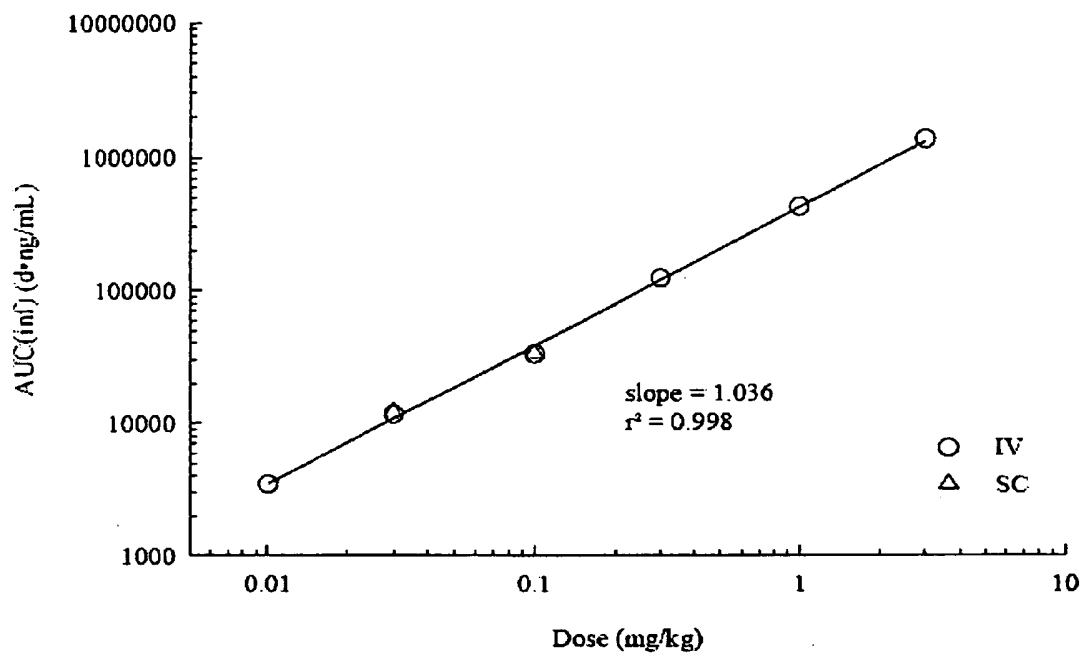


Figura 27

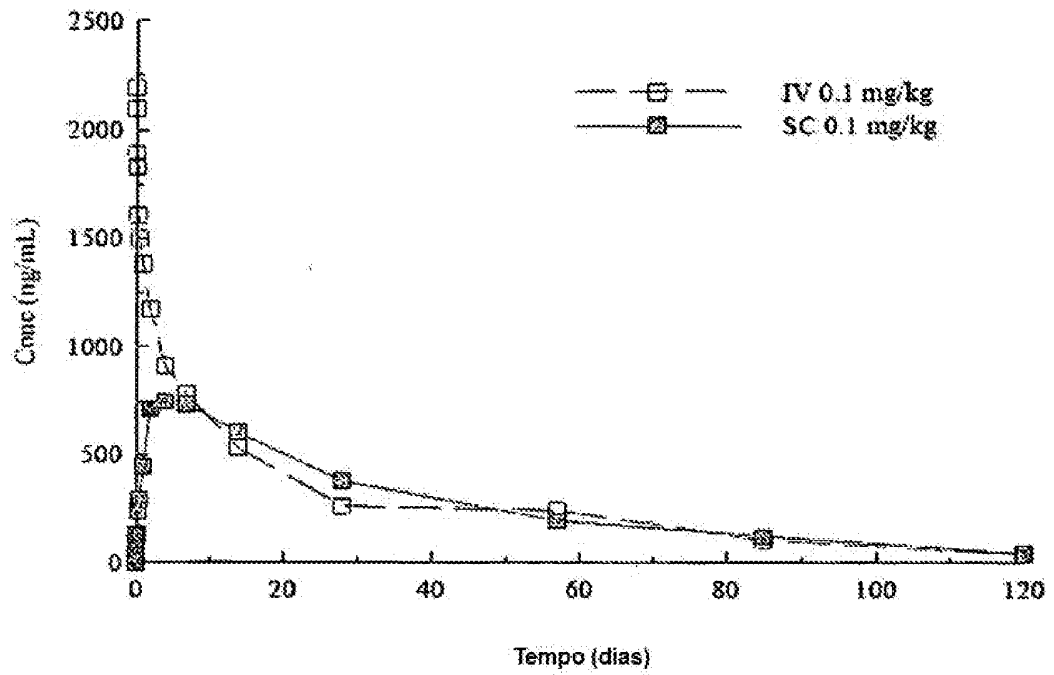


Figura 28

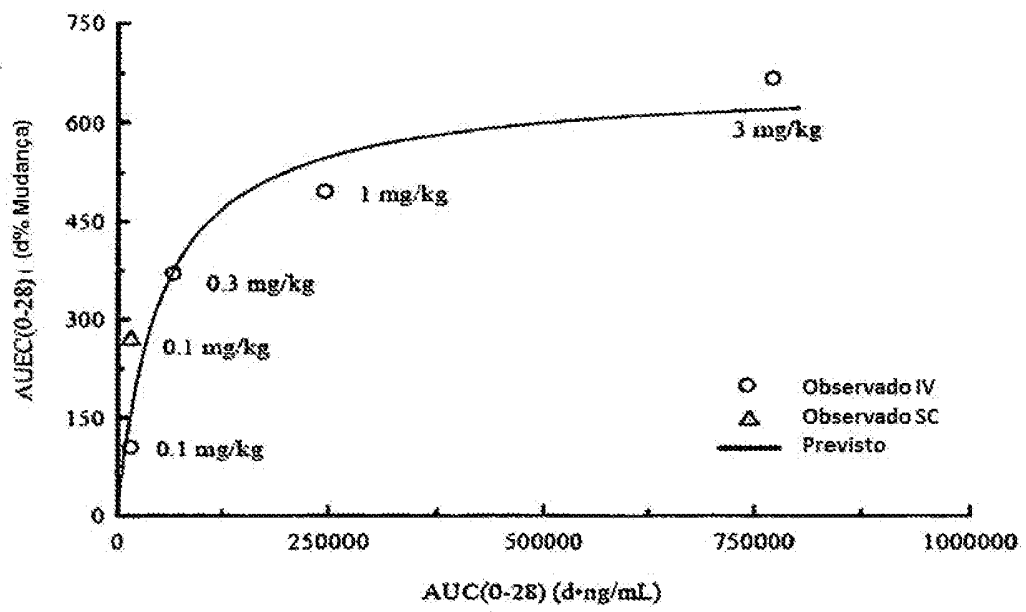


Figura 29



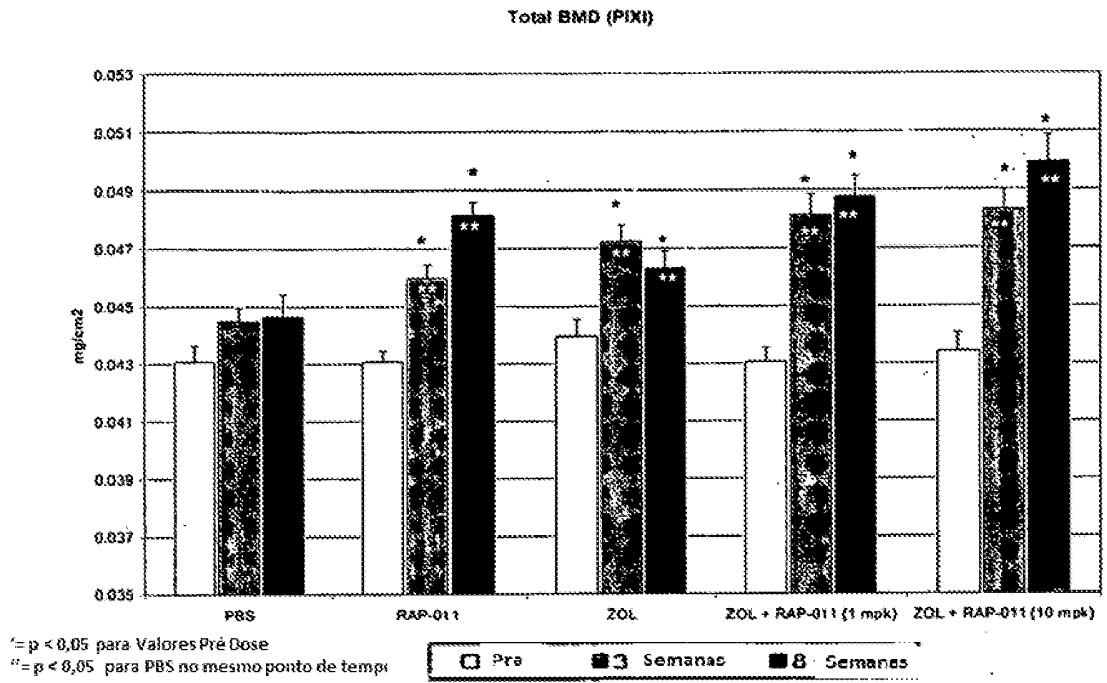


Figura 30