

República Federativa do Brasil
Ministério de Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

(21) PI 0806861-5 A2



* B R P I 0 8 0 6 8 6 1 A 2 *

(22) Data de Depósito: 01/02/2008
(43) Data da Publicação: 05/08/2014
(RPI 2274)

(51) *Int.Cl.:*
A61K 38/18
A61P 35/00

(54) Título: ANTAGONISTAS DE ATIVINA-ACTRIIA E
USOS PARA TRATAR OU PREVENIR CÂNCER DE
MAMA

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 01/02/2007 US 60/899.070,
25/10/2007 US 61/000.540

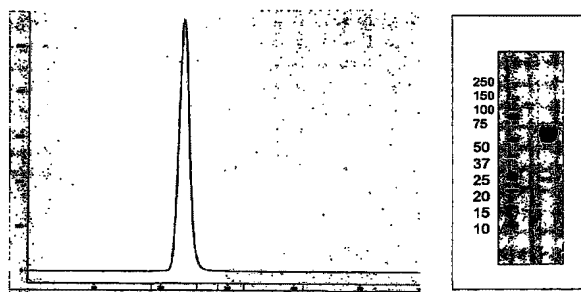
(73) Titular(es): Acceleron Pharma Inc.

(72) Inventor(es): Jasbir Seehra, John Knopf, Ravindra Kumar

(74) Procurador(es): Nellie Anne Daniel-Shores

(86) Pedido Internacional: PCT US2008001429 de
01/02/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/094708de
07/08/2008



"ANTAGONISTAS DE ATIVINA-ACTRIIA E USOS PARA TRATAR OU PREVENIR CÂNCER DE MAMA"

Referência cruzada a pedidos relacionados

Este pedido reivindica o benefício para pedido de patente provisório U.S. 60/899.070, depositado em 1 de fevereiro de 2007, e pedido de patente provisório U.S. 61/000.54, depositado em 25 de outubro de 2007. Todos os preceitos dos pedidos suprarreferidos estão incorporados aqui pela referência.

Antecedentes da invenção

Câncer de mama é o tipo mais comum de câncer entre as mulheres nos países ocidentais, afetando mais que 180.000 mulheres nos estados Unidos a cada ano. A doença surge na glândula mamária, ou mama, que é constituída de um sistema de duto de derivação. Cada glândula mamária, ou mama, contendo 15 a 20 seções denominadas lobos, e cada lobo contém uma série de dutos derivados que drenam para o mamilo. Células epiteli-ais que revestem cada duto são responsáveis pela produção de leite. Acredita-se que o câncer de mama invasivo seja originado de epitélio normal da unidade duto/lobular terminal através de uma série de lesões proliferativas cada vez mais anormais. Uma vez que o tumor adquire a capacidade de metastisar, as células cancerígenas da mama se espalham para outros órgãos, tornando o tratamento cada vez mais difícil. Os locais mais comuns de metástase de câncer de mama são o pulmão, fígado e ossos. As metástases ósseas são comumente associadas com dor severa, perda óssea e maior risco de fraturas. Muitas terapias antiestrogênicas usadas no tratamento de câncer de mama são também associadas com perda óssea acelerada.

Pacientes diagnosticados com câncer de mama tipicamente são submetidos a cirurgia e/ou radioterapia para tratar o tumor primário, seguido por terapia adjuvante para tratar qualquer célula cancerígena que possa ter espalhado para locais distantes. A terapia adjuvante consiste em quimioterapia citotóxica e/ou terapia endócrina. Embora a quimioterapia tenha sido efetiva no tratamento de vários tipos de malignidades, muitos compostos antineoplásticos induzem efeitos colaterais. Adicionalmente, muitos tumores tanto não conseguem a responder quanto se tornam resistentes à quimioterapia e terapia endócrina. Embora a terapia adjuvante tenha reduzido a taxa de mortalidade entre pacientes com câncer de mama, a taxa de sobrevivência de 10 anos para pacientes com tipos histopatológicos mais comuns de câncer de mama invasivo é ainda apenas 35 a 50 % (Weigelt et al. 2005 Nat. Rev. Cancer 5: 591-602). Adicionalmente, em virtude de pouco critério de diagnóstico, muitas mulheres que poderiam ser curadas pelo tratamento local sozinho recebem terapia adjuvante desnecessariamente.

Consequentemente, são necessários alvos moleculares mais eficientes e efetivos contra câncer de mama. Terapias alternativas que são menos tóxicas e/ou mais efetivas que

quimioterapia e terapias endócrinas melhorariam os regimes de tratamento e aumentariam a sobrevivência. Adicionalmente, agentes que podem ser usados como tratamento preventivo para pacientes que podem estar em risco de desenvolver câncer de mama invasivo ou metastático seriam úteis na clínica. É um objetivo da presente revelação, portanto, prover composições e métodos alternativos para tratar câncer de mama ou inibir ou prevenir o progresso de câncer de mama em pacientes.

Sumário da invenção

Em parte, a revelação diz respeito ao uso de antagonistas de ativina, bem como antagonistas de ActRIIa, para tratar ou prevenir câncer de mama ou perda óssea associada com câncer de mama. Em particular, a revelação fornece métodos para tratar ou prevenir câncer de mama usando uma forma solúvel de ActRIIa age como um inibidor de ativina. Embora ActRIIa solúvel possa afetar o crescimento ou sobrevivência de células cancerígenas através de um mecanismo sem ser antagonismo de ativina, agentes terapêuticos desejáveis podem no entanto ser selecionados com base no antagonismo de ativina ou antagonismo de ActRIIa, ou ambos. Tais agentes são coletivamente referidos como antagonistas de ativina-ActRIIa. Portanto, em certas modalidades, a revelação fornece métodos para usar antagonistas de ativina-ActRIIa, incluindo, por exemplo, polipeptídeos ActRIIa de ligação da ativina, polipeptídeos ActRIIa de ligação da ativina, anticorpos anti-ativina, anticorpos anti-ActRIIa, anticorpos anti-ActRIIa, aptâmeros e moléculas pequenos alvejados por ativina ou ActRIIa, e ácidos nucleicos que diminuem a expressão de ativina e ActRIIa, para tratar ou prevenir câncer de mama em pacientes que necessitam destes. Como descrito no pedido de patente U.S. número de série 1 1/603.485, aqui incorporado pela referência, antagonistas de ativina-ActRIIa podem ser usados para promover crescimento ósseo e aumentar a densidade óssea. Da maneira aqui descrita, tais antagonistas podem também ser usados para tratar ou prevenir câncer de mama, metástase de câncer de mama no osso e perda óssea associada com câncer de mama.

Em certos aspectos, a revelação fornece métodos para tratar ou prevenir câncer de mama usando polipeptídeos compreendendo um polipeptídeo ActRIIa de ligação da ativina solúvel que se liga à ativina. Os polipeptídeos ActRIIa podem ser formulados como uma preparação farmacêutica compreendendo o polipeptídeo ActRIIa de ligação da ativina e um carreador farmacêuticamente aceitável. O polipeptídeo ActRIIa de ligação da ativina pode se ligar à ativina com uma K_D menor que 1 micromolar ou menor que 100, 10 ou 1 nanomolar. Opcionalmente, o polipeptídeo ActRIIa de ligação da ativina liga seletivamente ativina versus GDF11 e/ou GDF8 e, opcionalmente, com uma K_D que é pelo menos 10 vezes, 20 vezes ou 50 vezes menor com relação a ativina do que com relação a GDF11 e/ou GDF8. Embora sem querer ficar preso a um mecanismo particular de ação, espera-se que este grau de seletividade para inibição de ativina com relação a inibição de GDF11/GDF8 seja responsável

pelos efeitos na sobrevivência ou crescimento no osso ou tumor sem um efeito consistentemente mensurável no músculo. Em muitas modalidades, um polipeptídeo ActRIIa será selecionado para causar menos que 15 %, menos que 10 % ou menos que 5 % de aumento no músculo em doses que atingem efeitos desejáveis nas células cancerígenas. A composição pode ser pelo menos 95 % pura, com relação a outros componentes de polipeptídeo, avaliada por cromatografia por exclusão de tamanho e, opcionalmente, a composição é pelo menos 98% pura. Um polipeptídeo ActRIIa de ligação da ativina para uso em uma preparação como esta pode ser qualquer um daqueles aqui revelados, tal como um polipeptídeo com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 2, 3, 7 ou 12, ou com uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % ou 99 % idêntica a uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 2, 3, 7, 12 ou 13. Um polipeptídeo ActRIIa de ligação da ativina pode incluir um fragmento funcional de um polipeptídeo ActRIIa natural, tal como um que compreende pelo menos 10, 20, 30, 50 ou 90 ou mais aminoácidos de uma sequência selecionada de SEQ ID NOs: 1-3 ou uma sequência de SEQ ID NO: 2, faltando os aminoácidos 10 a 15 do terminal C (a "cauda").

Um polipeptídeo ActRIIa de ligação da ativina solúvel pode incluir uma ou mais alterações na sequência de aminoácidos (por exemplo, no domínio de ligação de ligante) com relação a um polipeptídeo ActRIIa de ocorrência natural. Exemplos de polipeptídeos ActRIIa alterados são fornecidos em WO 2006/012627, pp. 59-60, aqui incorporado pela referência. A alteração na sequência de aminoácidos, por exemplo, pode alterar a glicosilação do polipeptídeo durante a produção em um mamífero, inseto ou outra célula eucariótica ou alterar a clivagem proteolítica do polipeptídeo com relação ao polipeptídeo ActRIIa de ocorrência natural.

Um polipeptídeo ActRIIa de ligação da ativina pode ser uma proteína de fusão que tem, como um domínio, um polipeptídeo ActRIIa (por exemplo, uma porção de ligação de ligante de uma ActRIIa) e um ou mais domínios adicionais que fornecem uma propriedade desejável, tais como melhor farmacocinética, purificação mais fácil, melhor alvejamento em tecidos particulares, 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 ou distribuição de tecido, formação de complexos de proteína, multimerização da proteína de fusão, e/ou purificação. Uma proteína de fusão de ActRIIa de ligação da ativina pode incluir um domínio Fc de imunoglobulina (tipo selvagem ou mutante) ou uma albumina sérica ou outra porção de polipeptídeo que fornece propriedades desejáveis tais como melhor farmacocinética, maior solubilidade ou maior estabilidade. In uma modalidade preferida, uma fusão ActRIIa-Fc compreende um ligante relativamente não estruturado posicionado entre o domínio Fc e o domínio ActRIIa extracelular. Este ligante não estruturado pode corresponder à região grosseiramente não estruturada de 15 aminoácidos na extremidade terminal C do

domínio extracelular de ActRIIa (a “cauda”), ou pode ser uma sequência artificial de 1, 2, 3, 4 ou 5 aminoácidos ou ter um comprimento de entre 5 e 15, 20, 30, 50 ou mais aminoácidos que são relativamente livres de estrutura secundária, ou um mistura de ambos. Um ligante pode ser rico em resíduos de glicina e prolina e, por exemplo, pode conter uma sequência
5 única de treonina/serina e glicinas ou sequências repetitivas de treonina/serina e glicinas (por exemplo, TG₄ ou SG₄ singletes ou de repetição). Uma proteína de fusão pode incluir uma subsequência de purificação, tal como um marcador de epítipo, um FLAG tag, uma sequência de poli-histidina, e uma fusão de GST. Opcionalmente, um polipeptídeo ActRIIa solúvel inclui um ou mais resíduos de aminoácidos modificados selecionados de: um amino-
10 ácido glicosilado, um aminoácido PEGlado, um aminoácido farnesilado, um aminoácido acetilado, um aminoácido biotilado, um aminoácido conjugado a uma fração lipídica, e um aminoácido conjugado a um agente de derivatização orgânico. Uma preparação farmacêutica também pode incluir um ou mais compostos adicionais tal como um composto que é usado para tratar um distúrbio ósseo. Preferivelmente, uma preparação farmacêutica é substancialmente livre de pirogênio. Em geral, é preferível que uma proteína ActRIIa seja expressa em uma linhagem celular de mamífero, que faça mediação apropriada à glicosilação natural da proteína ActRIIa, de maneira a diminuir a probabilidade de uma resposta imune desfavorável em um paciente. Linhagens celulares humanas e CHO foram usadas com sucesso e espera-se que outros sistemas de expressão de mamífero comuns sejam usados. Adicionalmente, levedura e outros tipos de células foram geneticamente alterados para expressar
20 enzimas de mamíferos que catalisam glicosilação, permitindo assim a geração de glicosilação tipo mamífera rigorosamente controlada nas proteínas expressas nestas células não mamíferas. Estas linhagens celulares recombinantes podem também ser usadas para expressar as proteínas aqui descritas.

25 Da maneira aqui descrita, proteínas ActRIIa designadas ActRIIa-Fc (uma forma com um ligante mínimo entre a porção ActRIIa e a porção Fc) têm propriedades desejáveis, incluindo ligação seletiva à ativina versus GDF8 e/ou GDF11, ligação de ligante de alta afinidade e meia-vida sérica maior que duas semanas em modelos animais. Em certas modalidades a invenção fornece métodos para tratar ou prevenir câncer de mama usando polipeptídeos
30 ActRIIa-Fc e preparações farmacêuticas compreendendo tais polipeptídeos e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

Em certos aspectos, a revelação fornece métodos para tratar ou prevenir câncer de mama usando ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo ActRIIa de ligação da ativina solúvel. Um polinucleotídeo isolado pode compreender uma sequência de codificação para
35 um polipeptídeo ActRIIa de ligação da ativina solúvel, tal como descrito anteriormente. Por exemplo, um ácido nucleico isolado pode incluir uma sequência que codifica para um domínio extracelular (por exemplo, domínio de ligação de ligante) de uma ActRIIa e uma sequên-

cia que codificaria para parte ou todo o domínio transmembrana e/ou o domínio citoplasmático de uma ActR11a, mas para um códon de parada posicionado no domínio transmembrana ou no domínio citoplasmático, ou posicionado entre o domínio extracelular e o domínio transmembrana ou domínio citoplasmático. Por exemplo, um polinucleotídeo isolado pode compreender uma sequência de polinucleotídeo ActR11a de comprimento total tal como SEQ ID NO: 4 ou 5 ou uma sequência de polinucleotídeo ActR11a de comprimento total tal como SEQ ID NO: 18, ou uma versão parcialmente truncada de ActR11a ou ActR11a, o dito polinucleotídeo isolado compreendendo adicionalmente um códon de término de transcrição em pelo menos seiscentos nucleotídeos antes do terminal 3' ou posicionado de outra forma, de maneira tal que a tradução do polinucleotídeo origina um domínio extracelular opcionalmente fundido a uma porção truncada de uma ActR11a de comprimento total. Uma sequência de ácido nucléico preferida para ActR11a é SEQ ID NO: 14. Os ácidos nucléicos usados de acordo com os métodos aqui descritos podem ser operacionalmente ligados a um promotor para expressão, e a revelação fornece células transformadas com tais polinucleotídeos recombinantes. Preferivelmente, a célula é uma célula de mamífero tal como uma célula de ovário de hamster chinês (CHO).

A revelação também fornece métodos para preparar um polipeptídeo ActR11a de ligação da ativina solúvel, que pode ser usado para tratar ou prevenir câncer de mama Um método como este pode incluir expressar quaisquer dos ácidos nucléicos (por exemplo, SEQ ID NO: 4, 5 ou 14) aqui revelados em uma célula adequada, tal como uma célula de ovário de hamster chinês (CHO). Um método como este pode compreender: a) cultivar uma célula em condições adequadas para expressão do polipeptídeo ActR11a solúvel, em que a dita célula é transformada com uma construção de expressão ActR11a solúvel; e b) recuperar o polipeptídeo ActR11a solúvel assim expresso. Polipeptídeos ActR11a solúveis podem ser recuperados como frações brutas, parcialmente purificadas ou altamente purificadas. A purificação pode ser atingida por uma série de etapas de purificação, incluindo, por exemplo, um, dois, três ou mais dos seguintes, em qualquer ordem: cromatografia de proteína A, cromatografia de troca aniônica (por exemplo, sefarose Q), cromatografia de interação hidrofóbica (por exemplo, fenilsefarose), cromatografia por exclusão de tamanho, e cromatografia de troca catiônica.

Em certos aspectos, um antagonista de ativina-ActR11a aqui revelado, tal como um polipeptídeo ActR11a de ligação da ativina solúvel, pode ser usado para tratar prevenir ou inibir câncer de mama em um sujeito incluindo, por exemplo, métodos para atrasar o início de ação do câncer de mama, inibir o progresso do câncer de mama, reduzir o tamanho do tumor, impedir o crescimento do tumor, atrasar o início de ação da metástase ou impedir a metástase, incluindo metástase no osso. Em certas modalidades, a revelação fornece métodos para diminuir ou inibir o crescimento ou sobrevivência das células cancerígenas da ma-

ma em pacientes que necessitam destes. Um método pode compreender administrar a um sujeito que necessita deste, uma quantidade efetiva de antagonista de ativina-ActRIIa. Em certos aspectos, a revelação fornece usos de antagonistas de ativina-ActRIIa para preparar um medicamento para o tratamento de um distúrbio ou condição da maneira aqui descrita. A
5 revelação também diz respeito a terapias de combinação compreendendo uns antagonistas de ativina-ActRIIa e terapia de radiação, quimioterapia (por exemplo, um agente citotóxico), e/ou terapia endócrina. O antagonista pode ser uma proteína de fusão ActRIIa-Fc, em que a proteína de fusão ActRIIa-Fc compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 90 % idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO:3.

10 Em modalidades adicionais, a presente invenção diz respeito a métodos de prevenir ou atrasar o início de ação de câncer de mama em pacientes com um ou mais fatores de risco de câncer de mama. Em algumas modalidades, a presente invenção diz respeito a métodos de prevenir ou atrasar o início de ação de doenças metastáticas em pacientes já diagnosticados com um tumor de mama primário ou com uma lesão proliferativa da mama. O
15 método de prevenir ou atrasar o início de ação de câncer de mama em um paciente humano pode compreender administrar a um paciente humano que necessita deste uma quantidade efetiva de um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste em: a) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácido pelo menos 90 % idêntica à SEQ ID NO:2; b) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácido pelo menos 90 % idêntica à
20 SEQ ID NO:3; e c) um polipeptídeo compreendendo pelo menos 50 aminoácidos consecutivos selecionados de SEQ ID NO:2.

Outras modalidades da invenção dizem respeito a um método de inibir sinalização mediada por ativina em um paciente humano com câncer de mama. Em certas modalidades, o método compreende administrar a um paciente humano uma quantidade efetiva de um
25 antagonista da ativina-ActRIIa. Em modalidades adicionais o antagonista é um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste em: a) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácido pelo menos 90 % idêntica à SEQ ID NO:2; b) um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácido pelo menos 90 % idêntica à SEQ ID NO:3; e c) um polipeptídeo compreendendo pelo menos 50 aminoácidos consecutivos selecionados de SEQ
30 ID NO:2.

Em certos aspectos, a revelação fornece um método para identificar um agente que inibe o crescimento ou sobrevivência de células cancerígenas (por exemplo, células cancerígenas da mama). O método compreende: a) identificar um agente teste que se liga a ativina ou um domínio de ligação de ligante de um polipeptídeo ActRIIa; e b) avaliar o efeito do
35 agente na proliferação, sobrevivência ou apoptose de células cancerígenas.

Descrição Resumida dos Desenhos

A figura 1 mostra a purificação de ActRIIa-hFc expressa em células CHO. A protei-

na purificação as um pico bem definido único, visualizado por coluna de classificação por tamanho (painel esquerdo) e SDS-PAGE corada com Coomassie (painel direito) (raia esquerda: padrões de peso molecular; raia direita: ActRIIa-hFc).

5 A figura 2 mostra a ligação de ActRIIa-hFc à ativina e GDF-11, medida por ensaio BiaCore™.

10 A figura 3 mostra que o tratamento com ActRIIa-mFc reduz bastante a formação de lesões metastáticas em um modelo de camundongo de câncer de mama metastático. Camundongos foram visualizados não invasivamente (anestesiados, imageamento fluorescente) cinco semanas após injeção intracardíaca de células de câncer de mama MDA-MB-231 que expressam luciferase. 12/14 camundongos tratados com o veículo apresentaram lesões metastáticas visíveis, ao passo que apenas 4/12 camundongos tratados com ActRIIa-mFc apresentaram lesões visíveis.

Descrição Detalhada da Invenção

1. Aspectos gerais

15 A superfamília de fator de crescimento transformador (TGF-beta) contém uma variedade de fatores de crescimento que compartilham elementos de sequência e motivos estruturais comuns. Sabe-se que estas proteínas exercem efeitos biológicos em uma grande variedade de tipos celulares tanto em vertebrados quanto em invertebrados. Membros da superfamília realizam importantes funções durante o desenvolvimento embrionário na formação padrão e especificação de tecido e podem influenciar uma variedade de processos de diferenciação, incluindo adipogênese, miogênese, condrogênese, cardiogênese, hematopoiese, neurogênese e diferenciação celular epitelial. A família é dividida em duas ramificações gerais: as ramificações BMP/GDF e TGF-beta/Ativina/BMP10, cujos membros têm efeitos complementares frequentemente diversos. Manipulando a atividade de um membro da família TGF-beta, é frequentemente possível causar mudanças fisiológicas significativas em um organismo. Por exemplo, as criações de gado Piedmontese e Belgian Blue carregam uma mutação perda-de-função no gene GDF8 (também chamado miostatina) que causa um aumento acentuado na massa muscular. Grobet et al., Nat Genet. 1997, 17(1):71-4. Além disso, em humanos, alelos inativos de GDF8 estão associados com maior massa muscular e, reportadamente, força excepcional. Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350:2682-8.

30 Ativinas são fatores de crescimento de polipeptídeo dimérico que pertencem à superfamília TGF-beta. Existem três formas de ativina principais (A, B, e AB) que são homo/heterodímeros de duas subunidades β estreitamente relacionadas ($\beta_A \beta_A$, $\beta_B \beta_B$, e $\beta_A \beta_B$, respectivamente). O genoma humano também codifica uma ativina C e uma ativina E, que são basicamente expressas no fígado, e formas heterodiméricas contendo β_C ou β_E também são conhecidas. Na superfamília TGF-beta, ativinas são fatores exclusivos e multifuncionais que podem estimular a produção de hormônio em células ovarianas e placentárias, auxiliar

na sobrevivência da célula neuronal, influenciar positiva ou negativamente o progresso do ciclo celular dependendo do tipo celular e induzir diferenciação mesodérmica pelo menos em embriões de anfíbios (DePaolo et al., 1991, Proc Soc Ep Biol Med. 198:500-512; Dyson et al., 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963). Além disso, observa-se que ativina B está envolvida na regulação de diferenciação de célula epitelial mamária em camundongos (Robinson and Hennighausen, 1997 Development 124; 2701-2708). Em diversos tecidos, a sinalização de ativina é antagonizada por seu heterodímero relacionado, inibina. Por exemplo, durante a liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) a partir da pituitária, ativina promove a secreção e síntese de FSH, enquanto a inibina previne a secreção e síntese de FSH. Outras proteínas que podem regular a bioatividade de ativina e/ou se ligar à ativina incluem folistatina (FS), proteína relacionada a folistatina (FSRP) e α_2 -macroglobulina.

Os sinais de TGF- β são mediados por complexos heterodiméricos de receptores de quinase serina/treonina tipo I e tipo II, que fosforilam e ativam proteínas Smad à jusante mediante estímulo de ligante (Massague, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1 :169-178). Estes receptores tipo I e tipo II são proteínas transmembranas compostas de um domínio extracelular de ligação de ligante com região rica em cisteína, um domínio transmembrana, e um domínio citoplasmático com especificidade serina/treonina predita. Os receptores tipo I são essenciais para sinalização; e receptores tipo II são exigidos para ligar elementos de ligação e para expressão de receptores tipo I. Os receptores de ativina tipo I e II formam um complexo estável após a ligação do ligante, resultando na fosforilação de receptores tipo I por receptores tipo II.

Dois receptores tipo II relacionados (ActRIIa), ActRIIa e ActRIIa, foram identificados como os receptores tipo II para ativinas (Mathews e Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano et al., 1992, Cell 68: 97-108). Além das ativinas, ActRIIa e ActRIIa podem interagir bioquimicamente com diversas outras proteínas da família TGF- β , incluindo BMP7, Nodal, GDF8, e GDF11 (Yamashita et al., 1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee e McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311; Yeo e Whitman, 2001, Mol. Cell 7: 949-957; Oh et al., 2002, Genes Dev. 16:2749-54). ALK4 é o principal receptor tipo I para ativinas, particularmente para ativina A, e ALK-7 pode servir como um receptor para ativinas igualmente, particularmente para ativina B.

Da maneira aqui descrita, um peptídeo ActRIIa solúvel (sActRIIa), que mostra substancial preferência na ligação a ativina A, ao contrário de outros membros da família TGF-beta, tal como GDF8 ou GDF11, pode ser usado para tratar ou prevenir câncer, particularmente câncer de mama. Embora sem querer ficar preso a nenhum mecanismo particular, espera-se que o efeito de sActRIIa seja causado principalmente por um efeito antagonista de ativina, dando a ligação da ativina muito forte (constante de dissociação picomolar) exibida

da pelo construção sActRIIa particular usados nestes estudos. Antagonistas de ActRIIa de
ativina incluem, por exemplo polipeptídeos ActRIIa solúvel de ligação da ativina, anticorpos
que se ligam à ativina (particularmente às subunidades de ativina A ou B, também referidas
como β A ou β B) e rompe a ligação, anticorpos que se ligam a ActRIIa e rompem a ligação
5 da ativina, proteínas não anticorpo selecionadas por ligação da ativina ou ActRIIa (ver por
exemplo, WO/2002/088171, WO/2006/055689, e WO/2002/032925 para exemplos de tais
proteínas e métodos para projeto e seleção dos mesmos), polipeptídeos randomizados se-
lecionados pela ligação da ativina ou ActRIIa, frequentemente afixados em um domínio Fc.
Duas proteínas diferentes (ou outras frações) com atividade de ligação da ativina ou ActRIIa,
10 especialmente ligantes de ativina que bloqueiam os sítios de ligação tipo I (por exemplo um
receptor de ativina tipo I solúvel) e tipo II (por exemplo um receptor de ativina tipo II solúvel),
respectivamente, podem ser ligadas uma na outra para criar uma molécula de ligação bi-
funcional. Aptâmeros de ácido nucléico, pequenas moléculas e outros agentes que inibem o
eixo de sinalização de ativina-ActRIIa podem também ser usados. Várias proteínas têm ati-
15 vidade antagonista da ativina-ActRIIa , incluindo inibina (isto é, subunidade alfa inibina) em-
bora inibina não antagonize universalmente a ativina em todos os tecidos, floistatina (por
exemplo, folistatina-288 e folistatina-315), FSRP, ativina C, alfa(2)-macroglobulina, e uma
ativina A mutante MI08A (metionina para mudar alanina na posição 108). Geralmente, for-
mas alternativas de ativina, particularmente aquelas com alterações no domínio de ligação
20 do receptor tipo I pode se ligar aos receptores tipo II e não conseguem formar um complexo
ternário ativo, agindo assim como antagonistas. Adicionalmente, ácidos nucléicos, tais como
moléculas antissentido, siRNAs ou ribozimas que inibem ativina A, B, C ou E, ou, particu-
larmente, expressão de ActRIIa, podem ser usados como antagonistas de ativina-ActRIIa. O
antagonista de ativina-ActRIIa pode ser usado para exibir seletividade para inibição de sina-
25 lização mediada por ativina versus outros elementos da família TGF-beta, e particularmente
com relação a GDF8 e GDF11. Proteínas ActRIIb solúveis se ligam a ativina, entretanto, a
proteína tipo selvagem não exhibe seletividade significativa na ligação da ativina versus
GDF8/11. Entretanto, tais polipeptídeos ActRIIb, bem como formas alteradas de ActRIIb com
propriedades de ligação diferentes ver, por exemplo, WO2006/012627, pp. 55-59, incorpo-
30 rado aqui pela referência) podem obter os efeitos desejados nas células cancerígenas. Ac-
tRIIb nativo ou alterado pode ser dado adicionado especificamente para ativina acoplando-
se com um segundo agente de ligação seletivo de ativina.

Os termos usados nesta especificação têm seus significados usuais na técnica, no
contexto desta invenção e no contexto específico onde cada termo é usado. Certos termos
35 são discutidos a seguir ou em outra parte na especificação, para fornecer orientação adicio-
nal ao profissional em descrever as composições e métodos da invenção e como preparar e
usá-las. O escopo ou significado de qualquer uso de um termo será aparente a partir do

contexto específico no qual o termo é usado.

"Cerca de" e "aproximadamente", em geral, devem significar um grau de erro aceitável para a quantidade medida, dada a natureza ou precisão das medições. Tipicamente, graus de erro exemplares estão em 20 por cento (%), preferivelmente em 10 %, e mais preferivelmente em 5 % de um valor dado ou faixa de valores.

5

Alternativamente e particularmente, em sistemas biológicos, os termos "cerca de" e "aproximadamente" podem significar valores que estão em uma ordem de magnitude, preferivelmente em 5 vezes e, mais preferivelmente, em 2 vezes de um valor dado. Quantidades numéricas aqui fornecidas são próximas, a menos que de outra forma declarada, significando que o termo "cerca de" ou "aproximadamente" podem ser inferidos quando não expressamente declarados.

10

Os métodos da invenção podem incluir etapas de comparar sequências umas com as outras, incluindo sequência tipo selvagem para um ou mais mutantes (variantes de sequência). Tais comparações compreendem tipicamente alinhamentos de sequências de polímero, por exemplo, usando programas e/ou algoritmos de alinhamento de sequência que são bem conhecidos na técnica (por exemplo, BLAST, FASTA e MEGALIGN, para citar alguns). Os versados na técnica percebem facilmente que, em tais alinhamentos, onde uma mutação contém uma inserção ou deleção de resíduo, o alinhamento de sequência introduzirá uma "folga" (tipicamente representada um hífen, ou "A") na sequência de polímero que não contém o resíduo inserto ou deletado.

15

20

"Homólogo", em todas as suas formas gramaticais e variações de ortografia, refere-se ao relacionamento entre duas proteínas que possuem uma "origem evolucionária comum," incluindo proteínas das superfamílias na mesma espécie de organismo, bem como proteínas homólogas de espécie diferente de organismo. Tais proteínas (e seus ácidos nucleicos que codificam) têm homologia de sequência refletida por sua similaridade de sequência, quer em termos de identidade percentual ou pela presença de resíduos ou motivos específicos e posições conservadas.

25

O termo "similaridade de sequência", em todas as suas formas gramaticais, refere-se ao grau de identidade ou correspondência entre as sequências de ácido nucleico ou aminoácidos que podem ou não compartilhar uma origem evolucionária comum.

30

Entretanto, no uso comum e na aplicação imediata, o termo "homólogo", quando modificado com um advérbio tal como "altamente", pode referir-se a similaridade de sequência e pode ou não estar relacionado a uma origem evolucionária comum.

O termo "câncer de mama" refere-se a qualquer lesão proliferativa ou anormalidade proliferativa da mama incluindo, por exemplo, início de lesões, lesões pré-malignas e malignas, tumores sólidos, e doenças metastáticas, por exemplo, estágio III, e mais amplamente metastática, por exemplo, estágio IV). Câncer de mama inclui, mas sem limitações, adeno-

35

carcinoma, carcinoma lobular (pequena célula), carcinoma intraductal, câncer de mama medular, câncer de mama da mucosa, câncer de mama tubular, câncer de mama papilar, doença de Paget e câncer de mama inflamatória. O câncer de mama também diz respeito a doenças em outros órgãos tais como pulmão, fígado e osso, que se originam da lesão metastática na mama. Geralmente, cânceres de mama independentes de hormônio são caracterizados pela ausência ou baixos níveis de receptores de estrógenos e/ou progesterona e esses cânceres são tipicamente refratários a tratamento com terapias anti-hormonais (especialmente antiestrogênio). Os cânceres de mama são também categorizados nas bases de expressão Her2, com tumores Her2⁺ tendo um prognóstico pior do que tumores Her2⁻

2. Polipeptídeos ActR11a

Em certos aspectos, a presente invenção diz respeito a métodos para tratar ou prevenir câncer de mama usando polipeptídeos ActR11a. Da maneira aqui usada, o termo "ActR11a" refere-se a uma família de proteínas do receptor de ativina tipo IIa (ActR11a) de qualquer espécie e variantes derivadas de tais proteínas ActR11a por mutagenese ou outra modificação. Entende-se aqui que a referência ActR11a é uma referência a qualquer uma das formas identificadas atualmente. Membros da família ActR11a são em geral proteínas transmembranas, compostas de um domínio extracelular de ligação de ligante com uma região rica em cisteína, um domínio transmembrana, e um domínio citoplasmático com atividade quinase serina/treonina predita.

O termo "polipeptídeo ActR11a" inclui polipeptídeos que compreendem qualquer polipeptídeo de ocorrência natural de um membro da família ActR11a, bem como quaisquer variantes deste (incluindo mutantes, fragmentos, fusões e formas peptidomiméticas) que mantêm uma atividade útil. Ver, por exemplo, WO/2006/012627. Por exemplo, polipeptídeos ActR11a incluem polipeptídeos derivados da sequência de qualquer ActR11a conhecida com uma sequência pelo menos cerca de 80 % idêntica à sequência de um polipeptídeo ActR11a e, opcionalmente, pelo menos 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % ou mais de identidade. Por exemplo, um polipeptídeo ActR11a da invenção pode se ligar e inibir a função de uma proteína ActR11a e/ou ativina. Um polipeptídeo ActR11a pode ser selecionado pela atividade de inibir proliferação ou sobrevivência de células cancerígenas *in vivo*. Exemplos de polipeptídeos ActR11a incluem polipeptídeo precursor de ActR11a humano (SEQ ID NO: 1) e polipeptídeos ActR11a humanos solúveis (por exemplo, SEQ ID NOs: 2, 3, 7 e 12).

A sequência de proteína precursora de ActR11a humana é da maneira a seguir:

MGTVAAKLAFVFLI SCSSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEP
 CYGDKDKRRHCFATWKNJ S GS IE I VKQGCWLDD INC YDRDTCVEKKDSP
 EVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPYYNILLSLVPL
 MLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLVPTQDPGPPPPSPLLGLKPLQLLE
 KARGRFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKHEN

ILQFIGAEKRGTSVDVDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVSWNELCHIAE
 TMARGLAYLHEDIPGLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFG
 ALKFEAGKSAGDTHGQVGTTRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGL
 VLWELASRCTAADGPVDEYMLPFEEEEIGQHPSLEDMQEVVVHKKKRPVL
 5 RDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMQRLTNIIT
 TEDIVTVMTNVDVDFPPKESSL (SEQ ID NO: 1)

O peptídeo de sinal está sublinhado em linha única; o domínio extracelular está em negrito e os sítios de glicosilação potenciais ligados a N estão sublinhados em linha dupla.

10 A sequência de polipeptídeo processado solúvel ActR1la humano (extracelular) é da maneira a seguir:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISG
 SIEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP
EMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 2)

15 Deve-se notar que a sequência N-terminal começando "ILG..." foi determinada experimentalmente e difere da sequência N-terminal "ALL..." que é comumente proposta na literatura. A "cauda" do terminal C do domínio extracelular está sublinhado. A sequência com a "cauda" deletada (uma sequência $\Delta 15$) é da maneira a seguir:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISG
 SIEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP
 20 EM (SEQ ID NO:3)

A sequência de ácido nucléico que codifica proteína precursora de ActR1la humana é da maneira a seguir (nucleotídeos 164-1705 de acesso ao Genbank NM_001616):

ATGGGAGCTGCTGCAA₁GTTGGCGTTTGCCGTCTTTCTTATCTCCTGTTCTTCAGGTGC
 TATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAG
 25 ACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCGTGTTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCAT
 TGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCATTGAAATAGTGAAACAAGGTTGTTG
 GCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTG
 AAGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCA
 GAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCTATTACAA
 30 CATCCTGCTCTATTCTTGGTGCCACTTATGTTAATTGCGGGGATTGTCATTTGTGCAT
 TTTGGGTGTACAGGCATCACAAGATGGCCTACCCTCCTGTACTTGTTCCTCAACTCAAGAC
 CCAGGACCACCCCACTTCTCATTACTAGGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAAGT
 GAAAGCAAGGGGAAGATTTGGTGTGTCTGGAAAGCCCAGTTGCTTAACGAATATGTGG
 CTGTCAAATATTTCCAATACAGGACAAACAGTCATGGCAAATGAATACGAAGTCTAC
 35 AGTTTGCCTGGAATGAAGCATGAGAACATATTACAGTTCATTGGTGCAGAAAAACGAGG
 CACCAGTGTGATGTGGATCTTTGGCTGATCACAGCATTTTATGAAAAGGGTTCCTAT
 CAGACTTTCTTAAGGCTAATGTGGTCTCTTGAATGAACTGTGTCATATTGCAGAAACC

ATGGCTAGAGGATTGGCATATTTACATGAGGATATACCTGGCCTAAAAGATGGCCACAA
 ACCTGCCATATCTCACAGGGACATCAAAGTAAAAATGTGCTGTTGAAAAACAACCTGA
 CAGCTTGCATTGCTGACTTTGGGTTGGCCTTAAAATTTGAGGCTGGCAAGTCTGCAGGC
 GATACCCATGGACAGGTTGGTACCCGGAGGTACATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTGC
 5 TATAAACTTCCAAAGGGATGCATTTTTGAGGATAGATATGTATGCCATGGGATTAGTCC
 TATGGGAACTGGCTTCTCGCTGTA CTGCTGCAGATGGACCTGTAGATGAATACATGTTG
 CCATTTGAGGAGGAAATTGGCCAGCATCCATCTCTTGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGT
 GCATAAAAAAAGAGGCCTGTTTTAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGAATGGCAA
 TGCTCTGTGAAACCATTGAAGAATGTTGGGATCACGACGCAGAAGCCAGGTTATCAGCT
 10 GGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCAGAGACTAACAAATATTATTACCACAGA
 GGACATTGTAACAGTGGTCACAATGGTGACAAATGTTGACTTTCCTCCCAAAGAATCTA
 GTCTATGA (SEQ ID NO: 4)

A sequência de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo solúvel ActR11a (extra-celular) é da maneira a seguir:

15 ATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGA
 CAGAACCAATCAA ACTGGTGTGTAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATT
 GTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCATTGAAATAGTGAACAAGGTTGTTGG
 CTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGA
 AGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCAG
 20 AGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCC (SEQ ID NO:
 5)

Em uma modalidade específica, a invenção diz respeito a métodos para tratar ou
 prevenir câncer de mama usando polipeptídeos ActR11a solúvel. Da maneira aqui descrita, o
 termo "polipeptídeo ActR11a solúvel" refere-se em geral a polipeptídeos compreendendo um
 25 domínio extracelular de uma proteína ActR11a. O termo "polipeptídeo ActR11a solúvel", da
 maneira aqui usada, inclui qualquer domínio extracelular de ocorrência natural de uma pro-
 teína ActR11a, bem como quaisquer variantes deste (incluindo mutantes, fragmentos e for-
 mas peptidomiméticas). Um polipeptídeo ActR11a de ligação da ativina é um que mantém a
 capacidade de se ligar a ativina, incluindo, por exemplo, ativina AA, AB, BB, ou formas que
 30 incluem uma subunidade C ou E. Opcionalmente, um polipeptídeo ActR11a de ligação da
 ativina se ligará a ativina AA com uma constante de dissociação de 1 nM ou menos. Em
 geral, o domínio extracelular de uma proteína ActR11a que se liga a ativina é solúvel e, pode
 assim, ser denominado um polipeptídeo ActR11a de ligação da ativina solúvel. Exemplos de
 polipeptídeos ActR11a de ligação da ativina solúveis incluem os polipeptídeos solúveis ilus-
 35 trados em SEQ ID NOs: 2, 3, 7, 12 e 13. SEQ ID NO:7 é referida como ActR11a-hFc e é des-
 crita adicionalmente nos exemplos. Outros exemplos de polipeptídeos ActR11a de ligação da
 ativina solúveis compreendem um sequência de sinal além do domínio extracelular de uma

proteína ActRIIa, por exemplo, a sequência líder melitina de mel de abelha (SEQ ID NO: 8), oativador de plasminogênio tecidual (TPA) líder (SEQ ID NO: 9) ou a ActRIIa líder nativa (SEQ ID NO: 10). O polipeptídeo ActRIIa-hFc ilustrado em SEQ ID NO: 13 usa um TPA líder.

5 Fragmentos funcionalmente ativos de polipeptídeos ActRIIa podem ser obtidos triando polipeptídeos produzidos recombinantemente a partir do fragmento correspondente do ácido nucléico que codifica um polipeptídeo ActRIIa. Além do mais, os fragmentos podem ser quimicamente sintetizados usando técnicas conhecidas na tecnologia tal como química f-Moc ou t-Boc de fase sólida de Merrifield convencional. Os fragmentos podem ser produzi-
10 dos (recombinantemente ou por síntese química) e testados para identificar aqueles fragmentos de peptídila que podem funcionar como antagonistas (inibidores) de proteína ActRIIa ou sinalização mediada por ativina.

 Variantes funcionalmente ativos de polipeptídeos ActRIIa podem ser obtidos triando bibliotecas de polipeptídeos modificados produzidos recombinantemente a partir de ácidos
15 nucléicos mutagenizados correspondentes que codificam um polipeptídeo ActRIIa. Os variantes podem ser produzidos e testados para identificar aqueles que podem funcionar como antagonistas (inibidores) de proteína ActRIIa ou sinalização mediada por ativina. Em certas modalidades, uma variante funcional dos polipeptídeos ActRIIa compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75 % idêntica a uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 2 ou 3. Em certos casos, o 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 de SEQ ID NOs: 2 ou 3.

 Variantes funcionais podem ser geradas modificando a estrutura de um polipeptídeo ActRIIa com propósitos tais como melhorar a eficácia terapêutica, ou estabilidade (por
25 exemplo, vida em prateleira *ex vivo* e resistência a degradação proteolítica *in vivo*). Tais polipeptídeos ActRIIa modificados, quando selecionados para manter a ligação da ativina, são considerados equivalentes funcionais dos polipeptídeos ActRIIa de ocorrência natural. Polipeptídeos ActRIIa modificados também podem ser produzidos, por exemplo, por substituição, deleção ou adição de aminoácido. Por exemplo, é razoável esperar que uma substitui-
30 ção isolada de uma leucina com uma isoleucina ou valina, um aspartato com um glutamato, uma treonina com uma serina, ou uma substituição similar de um aminoácido com um aminoácido estruturalmente relacionado (por exemplo, mutações conservativas) não terão um efeito importante na atividade biológica da molécula resultante. Substituições conservativas são aquelas que ocorrem em uma família de aminoácidos que são relacionados em suas
35 cadeias laterais. Pode-se determinar facilmente se uma mudança na sequência de aminoácidos de um polipeptídeo ActRIIa resulta em um homólogo funcional avaliando a capacidade do variante de polipeptídeo ActRIIa produzir uma resposta em células de uma maneira simi-

lar ao polipeptídeo ActRIIa tipo selvagem.

Em certas modalidades, a presente invenção contempla métodos para tratar ou prevenir câncer de mama usando polipeptídeos ActRIIa com mutações específicas que alteram a glicosilação do polipeptídeo. Tais mutações podem ser selecionadas de maneira a

5 introduzir ou eliminar um ou mais sítios de glicosilação, tais como sítios de glicosilação ligados a O ou ligados a N. Os sítios de reconhecimento de glicosilação ligados a asparagina compreendem em geral uma sequência de tripeptídeo, asparagina-X-treonina ou asparagi-

10 na-X-serina (onde "X" é qualquer aminoácido) que é reconhecida especificamente por enzimas de glicosilação celular apropriadas. A alteração também pode ser realizada pela adição ou substituição de um ou mais resíduos de serina ou treonina na sequência do polipeptídeo ActRIIa tipo selvagem (para sítios de glicosilação ligados a O). Uma variedade de substitui-

15 ções de aminoácidos ou deleções de uma ou ambas da primeira ou terceira posições de aminoácidos de um sítio de reconhecimento de glicosilação (e/ou deleção de aminoácido na segunda posição) resulta em não glicosilação na sequência de tripeptídeo modificada. Um

20 outro meio de aumentar o número de frações de carboidrato em um polipeptídeo ActRIIa é por acoplamento químico ou enzimático de glicosídeos no polipeptídeo ActRIIa. Dependendo do modo de acoplamento usado, o(s) açúcar(s) pode(m) ser anexado a (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxila livres; (c) grupos sulfidril livres tal como aquele de cisteína; (d) grupos hidroxila livres tais como aqueles de serina, treonina ou hidroxiprolina; (e) resí-

25 duos aromáticos tais como aqueles de fenilalanina, tirosina ou triptofano; ou (f) o grupo amida de glutamina. A remoção de uma ou mais frações de carboidrato presente em um polipeptídeo ActRIIa pode ser realizada química e/ou enzimaticamente. A deglicosilação química pode envolver, por exemplo, exposição do polipeptídeo ActRIIa ao composto ácido trifluorometanossulfônico, ou um composto equivalente. Este tratamento resulta na clivagem da

30 maioria ou todos os açúcares, com exceção do açúcar de ligação (N-acetilglucosamina ou N-acetilgalactosamina), deixando ao mesmo tempo a sequência de aminoácidos intacta. A clivagem enzimática de frações de carboidrato em polipeptídeos ActRIIa pode ser atingida pelo uso de uma variedade de endo- e exo-glicosidases descritas por Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. A sequência de um polipeptídeo ActRIIa pode ser ajustada, da

35 maneira apropriada, dependendo do tipo de sistema de expressão usado, visto que as células de mamífero, de levedura, de inseto e de planta podem todas introduzir padrões de glicosilação diferentes que podem ser afetados pela sequência de aminoácidos do peptídeo. Em geral, proteínas ActRIIa para uso em humanos pode ser expressa em uma linhagem celular de mamífero que fornece glicosilação própria, tal como linhagens celulares HEK293 ou CHO, embora espera-se que outras linhagens celulares de expressão de mamíferos sejam igualmente usadas.

Esta revelação contempla adicionalmente um método de gerar mutantes, particu-

larmente conjuntos de mutantes combinatórios de um polipeptídeo ActR11a, bem como mutantes truncados; reuniões de mutantes combinatórios são especialmente usadas para identificar sequências de variante funcional. O propósito de triar tais bibliotecas combinatórias pode ser para produzir, por exemplo, variantes de polipeptídeo ActR11a que se ligam a ativi-

5 na ou outros elementos de ligação. Uma variedade de ensaios de triagem é fornecida a seguir, e tais ensaios podem ser usados para avaliar variantes. Por exemplo, um variante de polipeptídeo ActR11a pode ser triado pela capacidade de se ligar a um ligante de ActR11a, prevenir a ligação de um ligante ActR11a a um polipeptídeo ActR11a ou interferir na sinalização causada por um ligante ActR11a.

10 A atividade de um polipeptídeo ActR11a ou seus variantes também pode ser testada em um ensaio com base em células ou *in vivo*. Por exemplo, o efeito de um variante de polipeptídeo ActR11a na expressão de genes envolvidos na hematopoiese pode ser avaliado. Células cancerígenas podem se referir a células em um sujeito vivo que constitui um tumor sólido para células que foram originadas de um tumor e que foram espalhadas para outros

15 locais em um sujeito vivo (isto é, células metastáticas). Adicionalmente, células cancerígenas podem referir-se a células obtidas ou derivadas de um tumor ou crescimento cancerígeno e que são cultivadas *in vivo*. Células cancerígenas também englobam linhagens celulares que podem ser cultivadas *in vitro* ou usadas em estudos de xenoenxerto de animal, por exemplo. Células cancerígenas podem referir-se a células derivadas de células metastáticas

20 através de divisão celular depois da metástase. As células podem ser responsivas por hormônio (por exemplo, receptor de estrógeno positivo) ou independentes de hormônio (por exemplo, receptor negativo). Proliferação ou sobrevivência de células cancerígenas pode ser avaliado na presença de uma ou mais proteínas de ligante de ActR11a recombinante (por exemplo, ativina), e as células podem ser transfectadas de maneira a produzir um polipeptí-

25 deo ActR11a e/ou variantes deste e, opcionalmente, um ligante ActR11a. Similarmente, um polipeptídeo ActR11a pode ser administrado a um camundongo ou outro animal, e uma ou mais medições, tais como tamanho do tumor ou a taxa de proliferação ou apoptose celular com relação a um controle, podem ser avaliados.

Podem ser geradas variantes combinatoriamente derivadas que têm uma potência

30 seletiva ou em geral maior com relação a um polipeptídeo ActR11a de ocorrência natural. Similarmente, a mutagênese pode dar origem a variantes que têm meias-vidas intracelulares muito diferentes daquelas que correspondem a um polipeptídeo ActR11a tipo selvagem. Por exemplo, a proteína alterada pode tornar-se tanto mais estável quanto menos estável a de-

35 gradação proteolítica ou outros processos celulares que resultam na destruição ou, de outra forma, na inativação de um polipeptídeo ActR11a nativo. Tais variantes, e os genes que os codificam, podem ser utilizados para alterar níveis de polipeptídeo ActR11a modulando a meia-vida dos polipeptídeos ActR11a. Por exemplo, uma meia-vida curta pode dar origem a

efeitos biológicos mais transientes e, quando parte de um sistema de expressão indutível, pode permitir controle mais rigoroso dos níveis de polipeptídeo ActRIIa na célula. Em uma proteína de fusão Fc, as mutações podem ser realizadas no ligante (se houver) e/ou na porção Fc para alterar a meia-vida da proteína.

5 Uma biblioteca combinatória pode ser produzida por meio de uma biblioteca degenerada de genes que codificam uma biblioteca de polipeptídeos, em que cada qual inclui pelo menos uma porção de sequências de polipeptídeo ActRIIa potenciais. Por exemplo, uma mistura de oligonucleotídeos sintéticos pode ser enzimaticamente ligada nas sequências de genes, de maneira tal que o conjunto degenerado de sequências de nucleotídeos de
10 polipeptídeo ActRIIa potenciais sejam expressos como polipeptídeos individuais ou, alternativamente, como um conjunto de proteínas de fusão maiores (por exemplo, para exibição de fago).

Existem muitas maneiras pelas quais a biblioteca de homólogos potenciais pode ser produzida a partir de uma sequência de oligonucleotídeo degenerada. A síntese química de
15 uma sequência de gene degenerada pode ser realizada em um sintetizador de DNA automático, e os genes sintéticos podem a seguir ser ligados em um vetor apropriado para expressão. A síntese de oligonucleotídeos 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-
20 289; Itakura et al., (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al., (1984) *Science* 198:1056; Ike et al., (1983) *Nucleic acid Res.* 11:1111). Tais técnicas foram empregadas na evolução direcionada de outras proteínas (ver, por exemplo, Scott et al., (1990) *Science* 249:386-390; Roberts et al., (1992) *PNAS USA* 89:2429-2433; Devlin et al., (1990) *Science* 249: 404-406; Cwirla et al., (1990) *PNAS USA* 87: 6378-6382; bem como patente U.S.
25 5.223.409, 5.198.346 e 5.096.815).

Alternativamente, outras formas de mutagênese podem ser utilizadas para produzir uma biblioteca combinatória. Por exemplo, variantes de polipeptídeo ActRIIa podem ser produzidos e isolados de uma biblioteca triando pelo uso, por exemplo, mutagênese de varredura de alanina e similares (Ruf et al., (1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang et al.,
30 (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 mutagênese de varredura 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 mutagênese de saturação (Meyers et al., (1986) *Science* 232:613); por mutagênese por PCR (Leung et al., (1989) *Method Cell Mol Biol* 1:1-19); ou por mutagênese aleatória, incluindo mutagênese química, etc. (Miller et al., (1992) *A Short*

Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; e Greener et al., (1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34). A mutagênese de varredura de ligante, particularmente em um ajuste combinatório, é um método atrativo para identificar formas truncadas (bioativa) de polipeptídeos ActRIIa.

5 Uma ampla faixa de técnicas é conhecida na tecnologia para triar produtos genéticos de bibliotecas combinatórias feitas por mutações pontuais e truncações e, no que diz respeito ao assunto, para triar bibliotecas de DNAC para produtos genéticos com uma certa propriedade. Tais técnicas serão em geral adaptáveis para triagem rápida das bibliotecas genéticas produzidas pela mutagênese combinatória de polipeptídeos ActRIIa. As técnicas
10 mais amplamente usadas para triar grandes bibliotecas genéticas compreendem tipicamente clonar a biblioteca genética em vetores de expressão replicáveis, transformar células apropriadas com a biblioteca resultante de vetores, e expressar os genes combinatórios em condições nas quais a detecção de uma atividade desejada favorece o isolamento relativamente fácil do vetor que codifica o gene cujo produto foi deletado. Ensaio preferido incluem ensaios de ligação da ativina e ensaios de sinalização celular mediados por ativina.
15

Em certas modalidades, os polipeptídeos ActRIIa de acordo com os métodos aqui descritos podem compreender adicionalmente modificações pós-translacionais além de quaisquer que estejam naturalmente presente nos polipeptídeos ActRIIa. Tais modificações incluem, mas sem limitações, acetilação, carboxilação, glicosilação, fosforilação, lipidação e
20 acilação. Em função disso, os polipeptídeos ActRIIa modificados podem conter elementos não aminoácidos, tais como polietileno glicóis, lipídeos, poli- ou mono- sacarídeo e fosfatos. Efeitos de tais elementos não aminoácidos na funcionalidade de um polipeptídeo ActRIIa podem ser testados da maneira aqui descrita para outras variantes de polipeptídeo ActRIIa. Quando um polipeptídeo ActRIIa é produzido nas células clivando uma forma nascente do polipeptídeo ActRIIa, o processamento pós-translacional também pode ser importante para
25 dobramento e/ou função corretos da proteína. Diferentes células (tais como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 ou HEK293) têm maquinário celular e mecanismos característicos específicos para tais atividades pós-translacionais e podem ser escolhidas para garantir a modificação e processamento corretos dos polipeptídeos ActRIIa.

30 Em certos aspectos, variantes funcionais ou formas modificadas dos polipeptídeos ActRIIa incluem proteínas de fusão com pelo menos uma porção dos polipeptídeos ActRIIa e um ou mais domínios de fusão. Exemplos bem conhecidos de tais domínios de fusão incluem, mas sem limitações, poli-histidina, Glu-Glu, glutathione S transferase (GST), tioredoxina, proteína A, proteína G, uma região constante de cadeia pesada de imunoglobulina (Fc),
35 proteína de ligação da maltose (MBP) ou albumina sérica humana. Um domínio de fusão pode ser selecionado de maneira a conferir uma propriedade desejada. Por exemplo, alguns domínios de fusão são particularmente usados para isolamento das proteínas de fusão por

cromatografia de afinidade. Com o propósito de purificação da afinidade, matrizes relevantes para cromatografia de afinidade, tais como resinas conjugadas com glutathione, amilase, e níquel ou cobalto são usadas. Muitas das tais matrizes estão disponíveis na forma de "estojo", tais como o sistema de purificação de GST da Pharmacia e o sistema QIAexpress™ (Qiagen) usado com sócios de fusão (HIS₆). Como um outro exemplo, um domínio de fusão pode ser selecionado de maneira a facilitar a detecção dos polipeptídeos ActRIIa. Exemplos de tais domínios de detecção incluem as várias proteínas fluorescentes (por exemplo, GFP) bem como "marcadores de epítomos," que são usualmente sequências pequenas de peptídeo sequências para as quais um anticorpo específico está disponível. Marcadores de epítomos 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 Fator Xa ou Trombina, que permite a protease relevante digerir parcialmente as proteínas de fusão e liberar por meio disto as proteínas recombinantes daí. As proteínas liberadas podem ser isoladas do domínio de fusão por separação cromatográfica subsequente. Em certas modalidades preferidas, um polipeptídeo ActRIIa é fundido com um domínio que estabiliza o polipeptídeo ActRIIa *in vivo* (um domínio "estabilizador"). "Estabilizando" significa qualquer coisa que aumente a meia-vida sérica, independentemente se isto é em decorrência da menor destruição, menor desobstrução pelo rim, ou outro efeito farmacocinético. Sabe-se que fusões com a porção Fc de uma imunoglobulina conferem propriedades farmacocinéticas desejáveis em uma ampla faixa de proteínas. Similarmente, fusões a albumina sérica humana podem conferir propriedades desejáveis. Outros tipos de domínios de fusão que podem ser selecionados incluem domínios de multimerização (por exemplo, dimerização, tetramerização) e domínios funcionais (que conferem uma função biológica adicional)

Como um exemplo específico, a presente invenção fornece método para tratar ou prevenir câncer de mama usando uma proteína de fusão compreendendo um domínio extracelular solúvel de ActRIIa fundido a um domínio Fc (por exemplo, SEQ ID NO: 6).

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD(A)VSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A)VSNKALPVIIEKTISKAK
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
 PFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN(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) reduziu a capacidade de se ligar ao receptor Fcγ com relação a um domínio Fc tipo selvagem. Em outros casos, o domínio Fc mutante com uma ou mais destas mutações (por exemplo, mutação Asn-434) aumentou a capacidade de se ligar ao receptor Fc relacionado a MHC classe I (FcRN) com relação ao do-

mínio Fc tipo selvagem. Deve-se geralmente entender que um domínio Fc pode incluir menores ou maiores partes da região ao constante de uma imunoglobulina, desde que o domínio Fc resultante retenha a capacidade de dimerizar covalentemente através de uma ligação de dissulfeto e formar proteína solúvel relativamente estável.

5 Entende-se que diferentes elementos das proteínas de fusão podem estar arranjados de qualquer maneira que seja consistente com a funcionalidade desejada. Por exemplo, um polipeptídeo ActRIIa pode ser colocado no terminal C de um domínio heterólogo, ou, alternativamente, um domínio heterólogo pode ser colocado no terminal C de um polipeptídeo ActRIIa. O domínio de polipeptídeo ActRIIa e o domínio heterólogo não precisam ser
10 adjacentes em uma proteína de fusão, e domínios adicionais ou sequências de aminoácidos podem estar incluídos nos terminais C ou N tanto no domínio quanto entre os domínios.

Em certas modalidades, os polipeptídeos ActRIIa usados de acordo com os métodos aqui descritos podem conter uma ou mais modificações que são capazes de estabilizar os polipeptídeos ActRIIa. Por exemplo, tais modificações melhoram a meia-vida *in vitro* dos
15 polipeptídeos ActRIIa, melhoram a meia-vida circulatória dos polipeptídeos ActRIIa ou diminuem a degradação proteolítica dos polipeptídeos ActRIIa. Tais modificações de estabilização incluem, mas sem limitações, proteínas de fusão (incluindo, por exemplo, proteínas de fusão compreendendo um polipeptídeo ActRIIa e um domínio estabilizador), modificações de um sítio de glicosilação (incluindo, por exemplo, adição de um sítio de glicosilação a um
20 polipeptídeo ActRIIa), e modificações de fração de carboidrato (incluindo, por exemplo, remoção de frações de carboidrato de um polipeptídeo ActRIIa). Da maneira aqui usada, o termo "domínio estabilizador" não se refere apenas a um domínio de fusão (por exemplo, Fc) como no caso de proteínas de fusão, mas também inclui modificações não proteínicas tal como uma fração de carboidrato, ou fração não proteínica, tal como polietileno glicol.

25 Em certas modalidades, os métodos descritos aqui utilizam formas isoladas e/ou purificadas dos polipeptídeos ActRIIa, que são isoladas ou, de outra forma, substancialmente isentas de outras proteínas. Os polipeptídeos ActRIIa serão em geral produzidos por expressão de ácidos nucléicos recombinantes.

3. Ácidos nucléicos que codificam polipeptídeos ActRIIa

30 São aqui fornecidos ácidos nucléicos isolados e/ou recombinantes que codificam quaisquer dos polipeptídeos ActRIIa (por exemplo, polipeptídeos ActRIIa solúveis), incluindo fragmentos, variantes e proteínas de fusão funcionais aqui revelados. Por exemplo, SEQ ID NO: 4 codifica os polipeptídeos precursores de ActRIIa humano de ocorrência natural, enquanto SEQ ID NO: 5 codifica o domínio extracelular de ActRIIa processado. Os ácidos nucléicos em questão podem ser de fita única ou de fita dupla. Tais ácidos nucléicos podem
35 ser moléculas de DNA ou RNA. Estes ácidos nucléicos podem ser usados, por exemplo, em métodos para preparar polipeptídeos ActRIIa ou como agentes terapêuticos diretos (por e-

xemplo, na abordagem de terapia genética).

Em certos aspectos, entende-se adicionalmente que os ácidos nucléicos em questão que codificam polipeptídeos ActR11a incluem ácidos nucléicos que são variantes de SEQ ID NO: 4 ou 5. Sequências de nucleotídeos variantes incluem sequências que diferem por uma ou mais substituições de nucleotídeo, adições ou deleções, tais como variantes alélicas.

Em certas modalidades, a invenção diz respeito a métodos para tratar e prevenir câncer de mama usando sequências de ácido nucléico isoladas ou recombinantes que são pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % ou 100 % idênticas a SEQ ID NOs: 4 ou 5. Versados na tecnologia perceberão que as sequências de ácido nucléico complementares para SEQ ID NOs: 4 ou 5 e as variantes de SEQ ID NOs: 4 ou 5, estão também no escopo desta invenção. Em modalidades adicionais, as sequências de ácido nucléico aqui descritas podem ser isoladas, recombinantes e/ou fundidas com uma sequência de nucleotídeo heteróloga, ou em uma biblioteca de DNA.

Em outras modalidades, ácidos nucléicos usados de acordo com os métodos aqui descritos também incluem sequências de nucleotídeos que hibridizam em condições de alto rigor para a sequência de nucleotídeo designada em SEQ ID NOs: 4 ou 5. Da maneira discutida anteriormente, versados na tecnologia entenderão facilmente que condições rigorosas apropriadas que promovem a hibridização do DNA podem ser variadas. Versados na tecnologia entenderão facilmente que as condições rigorosas apropriadas que promovem a hibridização do DNA podem ser variadas. Por exemplo, poderia ser realizada a hibridização a 6,0 x cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) em cerca de 45 °C, seguido por uma lavagem de 2,0 x SSC a 50 °C. Por exemplo, a concentração de sal na etapa de lavagem pode ser selecionada de um baixo rigor de cerca de 2,0 x SSC a 50 °C até um alto rigor de cerca de 0,2 x SSC a 50 °C. Além do mais, a temperatura na etapa de lavagem pode ser aumentada de baixas condições rigorosas à temperatura ambiente, cerca de 22 °C, para altas condições rigorosas em cerca de 65 °C. Tanto a temperatura quanto o sal podem ser variados, ou temperatura ou concentração de sal podem ser mantidos constantes enquanto a outra variável é mudada. Em uma modalidade, os métodos aqui descritos utilizam ácidos nucléicos que hibridizam em baixas condições rigorosas de 6 x SSC à temperatura ambiente seguido por uma lavagem a 2 x SSC à temperatura ambiente.

Ácidos nucléicos isolados que diferem dos ácidos nucléicos da maneira apresentada em SEQ ID NOs: 4 ou 5 em virtude da degeneração no código genético estão também contemplados para uso de acordo com os métodos aqui descritos. Por exemplo, inúmeros aminoácidos são projetados por mais que um triplete. Códon que especificam o mesmo aminoácido, ou sinônimos (por exemplo, CAU e CAC são sinônimos para histidina) pode resultar em mutações "silenciosa" que não afetam a sequência de aminoácidos da proteína.

Entretanto, espera-se que polimorfismos de sequência de DNA que leva a mudanças na sequência de aminoácidos das proteínas em questão possam existir entre as células de mamífero. Versados na tecnologia perceberão que estas variações em um ou mais nucleotídeos (até cerca de 3-5 % dos nucleotídeos) dos nucléicos que codificam uma proteína particular podem existir entre indivíduos de uma dada espécie em virtude de variação alélica natural. Todas e quaisquer variações de nucleotídeo como essas e polimorfismos de aminoácido resultantes estão no escopo desta invenção.

Em certas modalidades, os ácidos nucléicos recombinantes aqui descritos podem ser operacionalmente ligados a uma ou mais sequências de nucleotídeos regulatórias em uma construção de expressão. Sequências de nucleotídeos regulatórias serão geralmente apropriadas para a célula hospedeira usada para expressão. Inúmeros tipos de vetores de expressão apropriados e sequências regulatórias adequadas são conhecidos na tecnologia por uma variedade de células hospedeiras. Tipicamente, a dita uma ou mais sequências de nucleotídeos regulatórias podem incluir, mas sem limitações, sequências promotoras, sequências líder ou de sinal, sítios de ligação ribossômica, sequências de início e término transcricionais, sequências de início e término translacionais, e sequências melhoradoras ou ativadoras. Promotores constitutivos ou indutíveis como conhecido na tecnologia são contemplados pela invenção. Os promotores podem ser tanto promotores de ocorrência natural quanto promotores híbridos que combinam elementos de mais que um promotor. Uma construção de expressão pode estar presente em uma célula em um epissoma, tal como um plasmídeo, ou a construção de expressão pode ser inserida em um cromossomo. Em uma modalidade preferida, o vetor de expressão contém um gene marcador selecionável para permitir a seleção de células hospedeiras transformadas. Os genes marcadores selecionáveis são bem conhecidos na tecnologia e variarão com a célula hospedeira usada.

Em certos aspectos, os métodos aqui descritos utilizam um vetor de expressão compreendendo uma sequência de nucleotídeo que codifica um polipeptídeo ActR11a e operacionalmente ligado a pelo menos uma sequência regulatória. As sequências regulatórias são reconhecidas na tecnologia e são selecionadas para direcionar expressão do polipeptídeo ActR11a. Conseqüentemente, o termo sequência regulatória inclui promotores, melhoradores, e outros elementos de controle de expressão. Sequências regulatórias exemplares são descritas em Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por exemplo, qualquer de uma ampla variedade de sequências de controle de expressão que controlam a expressão de um sequência de DNA quando operacionalmente ligada a ela pode ser usada nestes vetores para expressar sequências de DNA que codificam um polipeptídeo ActR11a. Tais sequências de controle de expressão usadas 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, promotor de T7 cuja expressão é dirigida por T7 RNA polimerase, as regiões operadora e promotora principais de fago lambda, as regiões de controle para proteína revestida de fd, o promotor para 3-fosfoglicerato quinase ou outras enzimas glicolíticas, os promotores de ácido fosfatase, por exemplo, Pho5, os
5 promotores dos fatores de α -conjugação levedura, o promotor poliedro do sistema de baculovírus e outras sequências conhecidas por controlar a expressão de genes de células procarionóticas e eucarióticas ou seus vírus, e várias combinações destes. Deve-se entender que o projeto do vetor de expressão pode depender de tais fatores como a escolha da célula hospedeira a ser transformada e/ou o tipo de proteína desejada a ser expressa. Além do
10 mais, o número de cópia do vetor, a capacidade de controlar qual número de cópia e a expressão de qualquer outra proteína codificada pelo vetor, tal como marcadores de antibiótico, podem também ser considerados.

Um ácido nucléico recombinante aqui descrito pode ser produzido ligando o gene clonado, ou uma porção deste, em um vetor adequado para expressão tanto em células
15 procarióticas, células eucarióticas (levedura, ave, inseto ou mamífero), quanto em ambas. Veículos de expressão para produção de um polipeptídeo 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, tal como E. coli.
20

Alguns vetores de expressão de mamífero contêm tanto sequências procarióticas par facilitar a propagação do vetor na bactéria, quanto uma ou mais unidades de transcrição eucariótica que são expressas nas células eucarióticas. Os vetores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG,
25 pSVT7, pko-neo e pHyg são exemplos de vetores de expressão de mamífero adequados para transfecção de células eucarióticas. Alguns desses vetores são modificados com sequências dos plasmídeos bacterianos, tal como pBR322, para facilitar seleção de replicação e resistência a medicamento tanto em células procarióticas quanto eucarióticas. Alternativamente, derivados de vírus tais como o papiloma vírus bovino (BPV-I), ou vírus Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP e p205) podem ser usados para expressão transiente de
30 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 genética. Os vários métodos empregados na preparação dos plasmídeos e na transformação de organismos hospedeiros são bem conhecidos na tecnologia. Para outros sistemas de expressão adequados tanto para células procarióticas quanto eucarióticas, bem
35 como procedimentos recombinante em geral, ver Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., ed. por Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press,

2001). Em alguns exemplos, pode-se desejar expressar os polipeptídeos recombinantes pelo uso de um sistema de expressão de baculovírus. Exemplos de tais sistemas de expressão de baculovírus incluem vetores derivados de pVL (tais como pVL1392, pVL1393 e pVL941), vetores derivados de pAcUW (tal como pAcUWI), e vetores derivados de pBlueBac (tal como o β -gal contendo pBlueBac III).

Em uma modalidade preferida, um vetor seria projetados para produção dos polipeptídeos ActRIIa em questão em células CHO, tal como um vetor Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif), vetores pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) e vetores pCI-neo (Promega, Madison, Wise). Conforme ficaria aparente, as construções genéticas em questão podem ser usadas para causar expressão dos polipeptídeos ActRIIa em questão em células propagadas na cultura, por exemplo, para produzir proteínas, incluindo proteínas de fusão ou proteínas variantes, para purificação.

Esta revelação também diz respeito a uma célula hospedeira transfectada com um gene recombinante incluindo uma sequência e codificação (por exemplo, SEQ ID NO: 4, 5, 18, ou 19) para um ou mais dos polipeptídeos ActRIIa em questão. A célula hospedeira pode ser qualquer célula procariótica ou eucariótica. Por exemplo, um polipeptídeo ActRIIa aqui descrito pode ser expresso 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 pelos versados na tecnologia.

Também fornecidos aqui são métodos de produzir os polipeptídeos ActRIIa em questão. Por exemplo, uma célula hospedeira transfectada com um vetor de expressão que codifica um polipeptídeo ActRIIa ou ActRIIa pode ser cultivado em condições apropriadas para permitir que ocorra expressão do polipeptídeo ActRIIa. O polipeptídeo ActRIIa pode ser secretado e isolado de uma mistura de células e meio contendo o polipeptídeo ActRIIa. Alternativamente, o polipeptídeo ActRIIa pode ser retido citoplasmicamente ou em uma fração de membrana e as células colhidas, lisadas e as proteína isoladas. Uma cultura celular inclui células hospedeiras, meio e outros subprodutos. Os meios adequados para cultura celular são bem conhecidos na tecnologia. Os Polipeptídeos ActRIIa em questão podem ser isolados a partir do meio de cultura celular, células hospedeiras, ou ambos, usando técnicas conhecidas na tecnologia para purificar proteínas, incluindo cromatografia de troca iônica, cromatografia de filtração de gel, ultrafiltração, eletroforese, purificação de imunoafinidade com anticorpos específicos para epítopos particulares dos polipeptídeos ActRIIa e purificação de afinidade com um agente que liga a um domínio fundido ao polipeptídeo ActRIIa (por exemplo, uma coluna A de proteína pode ser usada para purificar uma fusão de ActRIIa-Fc ou ActRIIa-Fc). Em uma modalidade preferida, o polipeptídeo ActRIIa é um proteína de fusão contendo um domínio que facilita sua purificação. Em uma modalidade preferida, a puri-

5 ficação é obtida por uma série de etapas de cromatografia de coluna, incluindo, por exemplo, três ou mais das seguintes, em qualquer ordem: cromatografia A de proteína, cromatografia de sefarose Q, fenilcromatografia de sefarose, cromatografia de exclusão de tamanho, e cromatografia de troca catiônica. A purificação pode ser completa com filtração viral e troca de tampão. Da maneira aqui demonstrada, proteína ActRIIa-hFc foi purificada a uma pureza de >98 % da forma determinada por cromatografia de exclusão por tamanho e >95 % da maneira determinada por SDS PAGE. Este nível de pureza foi suficiente para obter resultados desejáveis em camundongos, ratos e primatas não humanos.

10 Em uma outra modalidade, um gene de fusão que codifica uma sequência líder de purificação, tal como uma sequência de sítio de clivagem poli-(His)/enteroquinase no N-terminal da porção desejada do polipeptídeo ActRIIa recombinante, pode permitir a purificação da proteína de fusão expressa por cromatografia de afinidade usando uma resina metálica Ni²⁺. A sequência líder de purificação pode então ser subsequentemente removida por tratamento com enteroquinase para fornecer o polipeptídeo ActRIIa purificado (por exemplo, 15 ver Hochuli et al., (1987) J. Chromatography 41 1 : 177; e Janknecht et al., PNAS USA 88:8972).

20 Técnicas para preparar genes de fusão são bem conhecidas. Essencialmente, a junção de vários fragmentos de DNA que codificam diferentes sequências de polipeptídeos é realizada de acordo com técnicas convencionais, empregando terminais de ponta romba ou ponta escalonada para ligação, digestão de enzima de restrição para fornecer terminais apropriadas, enchimento de terminais coesivos da maneira apropriada, tratamento de fosfatase alcalina para evitar junções indesejáveis, e ligação enzimática. Em uma outra modalidade, o gene de fusão pode ser sintetizado por técnicas convencionais incluindo sintetizadores de DNA automatizados. Alternativamente, amplificação de PCR de fragmentos de gene 25 pode ser realizada usando iniciadores âncora que dão origem a saliências complementares entre dois fragmentos de gene consecutivos que podem subsequentemente ser anelados para gerar uma sequência de gene quimérico (ver, por exemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

4. Antagonistas Alternativos de Ativina e ActRIIa

30 A presente revelação diz respeito a métodos para tratar ou prevenir câncer de mama usando antagonistas de sinalização de ativina-ActRIIa. Embora polipeptídeos ActRIIa solúveis, e particularmente ActRIIa-Fc sejam antagonistas preferidos, e embora tais antagonistas possam afetar crescimento ou sobrevivência de células cancerígenas da mama através de um mecanismo sem ser antagonismo de ativina (por exemplo, inibição de ativina pode ser um indicador da tendência de um agente para inibir as atividades de um espectro de 35 moléculas, incluindo, talvez, outros membros da superfamília TGF-beta, e tal inibição coletiva pode levar ao efeito desejado crescimento ou sobrevivência de células cancerígenas da

mama), espera-se que outros tipos de antagonistas de ativina-ActR11a sejam usados, incluindo anticorpos anti-ativina (por exemplo, ativina β_A , β_B , β_C e β_E), anticorpos anti-ActR11a, anticorpos anti-ActR11a, antissentido, RNAi ou ácidos nucleicos ribozima que inibem a produção de ActR11a e/ou ActR11a, e outros inibidores de ativina, ActR11a ou ActR11a, particularmente aqueles que interrompem ligação da ativina-ActR11a e/ou ativina-ActR11a. Em certas modalidades, antagonistas específicos para a ativina B (por exemplo, anticorpos de antiativina B) são usados nos métodos da presente invenção.

Um anticorpo que é especificamente reativo com um polipeptídeo ActR11a (por exemplo, um polipeptídeo ActR11a ou ActR11a solúvel) e que tanto liga competitivamente ao ligante com o polipeptídeo ActR11a quanto de outra forma inibe sinalização mediada por ActR11a pode ser usado como um antagonista de atividades de polipeptídeo ActR11a. Similarmente, um anticorpo que é especificamente reativo com um polipeptídeo de ativina β_A , β_B , β_C ou β_E , ou qualquer heterodímero deste, e que interrompe a ligação de ActR11a e/ou ActR11a pode ser usado como um antagonista.

Usando imunógenos derivado de um polipeptídeo ActR11a, polipeptídeo ActR11a ou um polipeptídeo ativina, antissoro anti-proteína/anti-peptídeo ou anticorpos monoclonais podem ser feitos por protocolos padrões (ver, por exemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. de Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Um mamífero, tais como um camundongo, um hamster ou coelho pode ser imunizado com uma forma imunogênica do polipeptídeo ActR11a, um fragmento antigênico que é capaz de elicitar uma resposta do anticorpo, ou uma proteína de fusão. Técnicas para conferir imunogenicidade em uma proteína ou peptídeo incluem conjugação a carreadores ou outras técnicas bem conhecidas na tecnologia. Uma porção imunogênica de um ActR11a ou polipeptídeo ativina pode ser administrada na presença de adjuvante. O progresso de imunização pode ser monitorado por detecção de tituladores de anticorpo em plasma ou soro. ELISA ou outros imunoenaios padrões podem ser usados com o imunógeno como antígeno para avaliar os níveis de anticorpos.

Após a imunização de um animal com uma preparação antigênica de um polipeptídeo ActR11a, antissoro pode ser obtido e, se desejado, anticorpos policlonais podem ser isoladas do soro. Para produzir anticorpos monoclonais, células que produzem anticorpo (linfócitos) podem ser colhidas de um animal imunizado e fundidas por procedimentos de fusão de célula somática padrões com células imortalizantes, tal como células de mieloma para produzir células de hibridoma. Tais técnicas são bem conhecidas na tecnologia, e incluem, por exemplo, a técnica de hibridoma (originalmente desenvolvidas por Kohler and Milstein, (1975) *Nature*, 256: 495-497), a técnica de hibridoma célula B humana (Kozbar et al., (1983) *Immunology Today*, 4: 72), e a técnica de hibridoma EBV para produzir anticorpos monoclonais humanos (Cole et al., (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss,

Inc. pp. 77-96). Células de hibridoma podem ser selecionadas imunoquimicamente para produção de anticorpos especificamente reativos com polipeptídeo ActRIIa e anticorpos monoclonais isolados de uma cultura compreendendo tais células de hibridoma. Anticorpos podem também ser gerados triando bibliotecas (por exemplo, biblioteca de exibição de fago) de domínios variáveis de anticorpo ou fragmentos Fab para identificar ligantes que ligam aos antígenos selecionados (por exemplo, ativinas ou ActRIIa). Esta abordagem *in vitro* é frequentemente usada com proteínas que são altamente conservadas entre mamíferos, particularmente camundongos e humanos.

O termo "anticorpo" da maneira aqui usada deve incluir anticorpos totais, por exemplo, de qualquer isotipo (IgG, IgA, IgM, IgE, etc), e inclui fragmentos ou domínios de imunoglobulinas que são reativos com um antígeno selecionado. Anticorpos podem ser fragmentados usando técnicas convencionais e os fragmentos selecionados para utilidade e/ou interação com um epítipo específico de interesse. Assim, o termo inclui segmentos de porções preparadas recombinantemente ou proteoliticamente clivadas de uma molécula do anticorpo que são capazes de reagir seletivamente com uma certa proteína. Exemplos não limitantes de tais fragmentos proteolíticos e/ou recombinante incluem Fab, F(ab')₂, Fab' , Fv, e anticorpos de cadeia única (scFv) contendo um domínio V[L] e/ou V[H] unido por um ligante peptídeo. Os scFv's podem ser covalentemente ou não covalentemente ligados para formar anticorpos tendo dois ou mais sítios de ligação. O termo anticorpo também inclui policlonal, monoclonal, ou outras preparações purificadas de anticorpos e anticorpos recombinantes. O termo "anticorpo recombinante", significa um anticorpo, ou domínio de ligação de antígeno de uma imunoglobulina, expresso de um ácido nucléico que foi construído usando as técnicas de biologia molecular, tais como um anticorpo humanizado ou um anticorpo totalmente humano desenvolvidos a partir de um anticorpo de cadeia única. Domínio único e anticorpos de cadeia única estão também incluídos no termo "anticorpo recombinante".

Em certas modalidades, os métodos aqui descritos podem utilizar um anticorpo, tal como, por exemplo, um anticorpo monoclonal. Também fornecidos são métodos para gerar anticorpos inéditos. Por exemplo, um método para gerar um anticorpo monoclonal que liga especificamente a um polipeptídeo ActRIIa ou polipeptídeo ativina pode compreender administrar a um camundongo uma quantidade de uma composição imunogênica compreendendo o polipeptídeo do antígeno efetivo para estimular uma resposta imune detectável, obtendo células que produzem anticorpo (por exemplo, células do baço) do camundongo e fundindo as células que produzem anticorpo com células mieloma para obter hibridomas de produção de anticorpo, e testar os hibridomas de produção de anticorpo para identificar um hibridoma que produz um anticorpo monoclonal que liga especificamente ao antígeno. Uma vez obtido, um hibridoma pode ser propagado em uma cultura celular, opcionalmente nas condições de cultura onde as células derivadas de hibridoma produzem o anticorpo mono-

clonal que liga especificamente ao antígeno. O anticorpo monoclonal pode ser purificado da cultura celular.

O adjetivo "especificamente reativo com" da maneira usada na referência a um anticorpo deve significar, como é geralmente entendido na tecnologia, que o anticorpo é suficientemente seletivo entre o antígeno de interesse (por exemplo, polipeptídeo ActRIIa) e outros antígenos que não são de interesse que o anticorpo seja usado, para no mínimo, detectar a presença do antígeno de interesse em um tipo particular de amostra biológica. Em certos métodos que empregam o anticorpo, tal como aplicações terapêuticas, pode ser desejável um grau mais alto de especificidade na ligação. Anticorpos monoclonais geralmente têm uma maior tendência (comparado aos anticorpos policlonais) de discriminar efetivamente entre os antígenos desejados e polipeptídeos de reação cruzada. Uma característica que influencia a especificidade de uma interação anticorpo:antígeno é a afinidade do anticorpo com o antígeno. Embora a especificidade desejada possa ser atingida com uma faixa de diferentes afinidades, geralmente anticorpos preferidos terão uma afinidade (uma constante de dissociação) de cerca de 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M ou menos.

Além do mais, as técnicas usadas para selecionar anticorpos a fim de identificar um anticorpo desejável pode influenciar nas propriedades do anticorpo obtido. Por exemplo, se um anticorpo deve ser usado para ligar um antígeno em solução, pode-se desejar testar a ligação da solução. Uma variedade de diferentes técnicas é disponível para testar interação entre anticorpos e antígenos para identificar anticorpos particularmente desejáveis. Tais técnicas incluem ensaios de ligação de ressonância de plasma superficiais ELISAs, (por exemplo, o ensaio de ligação Biacore™, Biacore AB, Uppsala, Suécia), ensaios sanduíche (por exemplo, o sistema de conta paramagnético de IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), western blots, ensaios de imunoprecipitação, e imunoistoquímica.

Exemplos de categorias de compostos de ácido nucléico que são antagonistas ativa ou ActRIIa incluem ácidos nucléicos antissentido, construções RNAi e construções de ácido nucléico catalítico. Um composto do ácido nucléico pode ser de fita única ou dupla. Um composto de fita dupla pode também incluir regiões de saliências ou não complementariedade, onde uma ou outra das fitas é fita única. Um composto de fita única pode incluir regiões de auto-complementariedade, significando que o composto forma uma assim chamada estrutura "grampo" ou "semicircular", com uma região de estrutura helicoidal dupla. Um composto do ácido nucléico pode compreender uma sequência de nucleotídeo que é complementar com uma região consistindo em não mais que 1.000, não mais que 500, não mais que 250, não mais que 100, ou não mais que 50, 35, 25, 22, 20, 18 ou 15 nucleotídeos da sequência de ácido nucléico de ActRIIa de comprimento total ou sequência de ácido nucléico de ativina P_A , β_B , β_C , ou β_E . A região de complementariedade seria preferivelmente pelo menos 8 nucleotídeos, e opcionalmente cerca de 18 a 35 nucleotídeos. Uma região de

complementariedade faltaria em um íntron, uma sequência de codificação ou uma sequência de não codificação do alvo transcrito, tal como a porção da sequência de codificação. Geralmente, um composto do ácido nucléico teria um comprimento de cerca de 8 a cerca de 500 nucleotídeos ou pares de base em comprimento, e opcionalmente o comprimento seria

5 cerca de 14 a cerca de 50 nucleotídeos. Um ácido nucléico pode ser um DNA (particularmente para usar como um antissentido), RNA ou RNA:DNA híbrido. Qualquer uma fita pode incluir uma mistura de DNA e RNA, bem como formas modificadas que não podem facilmente ser classificadas tanto como DNA quanto RNA. Similarmente, um composto de fita dupla

10 pode ser DNA:DNA, DNA:RNA ou RNA:RNA, e qualquer uma fita pode também incluir uma mistura de DNA e RNA, bem como formas modificadas que não podem ser facilmente classificado tanto como DNA quanto RNA. Um composto do ácido nucléico pode incluir qualquer de uma variedade de modificações, incluindo uma modificação ou modificações na espinha dorsal (a porção açúcar-fosfato em um ácido nucléico natural, incluindo ligações internucleotídeo) ou a porção base (a porção de purina ou pirimidina de um ácido nucléico natural). Um

15 composto antissentido do ácido nucléico teria preferivelmente um comprimento de cerca de 15 a cerca de 30 nucleotídeos e conteria frequentemente uma ou mais modificações para melhorar características, tal como estabilidade no soro, em uma célula ou em um local onde o composto deve provavelmente ser distribuído, tais como o estômago no caso de compostos oralmente distribuídos e o pulmão para compostos inalados. No caso de uma construção

20 RNAi, a fita complementar para o alvo transcrito será geralmente RNA ou modificações deste. A outra fita pode ser RNA, DNA ou qualquer outra variação. A porção duplex de fita dupla ou fita única "grampo" construção RNAi terá geralmente um comprimento de 18 a 40 nucleotídeos em comprimento e opcionalmente cerca de 21 a 23 nucleotídeos em comprimento, desde que ela sirva como um substrato Dicer. Ácidos nucléicos catalíticos ou enzimáticos

25 podem ser ribossomas ou enzimas de DNA e podem também conter formas modificadas. Compostos de ácido nucléico podem inibir expressão do alvo por cerca de 50 %, 75 %, 90 % ou mais quando em contato com células em condições fisiológicas e a uma concentração onde um controle não sentido ou sentido tem pouco ou nenhum efeito. Concentrações preferidas para testar o efeito de compostos de ácido nucléico são 1, 5 e 10 micromolar. Compostos

30 de ácido nucléico podem também ser testados para efeitos, por exemplo, na proliferação ou sobrevivência das células cancerígenas da mama ou tumores da mama.

5. Ensaio de Triagem

Em certos aspectos, a presente invenção diz respeito ao uso de Polipeptídeos ActRIIa (por exemplo, polipeptídeos ActRIIa solúveis) e polipeptídeo ativina para identificar

35 compostos (agentes) que são agonista ou caminho de sinalização dos antagonistas de ativina ActRIIa e/ou ativina ActRIIa. Compostos identificados através desta seleção podem ser testados para avaliar sua capacidade de modular o crescimento ou sobrevivência de células

cancerígenas, particularmente células cancerígenas da mama, *in vivo* ou *in vitro*. Estes compostos podem ser testados, por exemplo, em modelos animais, tal como modelos de xenoenxerto. Um modelo animal usado é o modelo de câncer de mama MDA-MB231 de murino, células MDA-MB231 são dependentes de hormônio e são propensos a metastizar no osso. Outros modelos de câncer de mama podem ser gerados, por exemplo, implantando-se células neuroblastoma de rato (das quais o oncogene neu foi inicialmente isolado), ou células NIH-3T3 neu-transformadas em camundongo nude, essencialmente da maneira descrita por Drebin et al. Proc. Nat. Superfície do corpo do ímã USA, 83:9129-9133 (1986).

Existem inúmeras abordagens para selecionar agentes terapêuticos para tratar ou prevenir câncer de mama alvejando sinalização de ativina e ActRIIa. Em certas modalidades, seleção de alta produção de compostos pode ser realizada para identificar agentes que perturbam efeitos mediados por ativina ou ActRIIa em uma linhagem celular selecionada. Em certas modalidades, o ensaio é realizado para selecionar e identificar os compostos que inibem especificamente ou reduzem a ligação de um polipeptídeo ActRIIa em ativina. Alternativamente, o ensaio pode ser usado para identificar compostos que melhoram a ligação de um polipeptídeo ActRIIa ou ActRIIa em ativina. Em uma modalidade adicional, os compostos podem ser identificados pela sua capacidade de interagir com um ativina ou polipeptídeo ActRIIa.

Uma variedade de formatos de ensaio será suficiente e, sob a luz da presente revelação, aqueles não expressamente aqui descritos, no entanto, serão compreendidos pelos versados na tecnologia. Da maneira aqui descrita, compostos testes (agentes) podem ser criados por qualquer método químico combinatorial. Alternativamente, os compostos em questão podem ser de biomoléculas de ocorrência natural sintetizadas *in vivo* ou *in vitro*. Compostos (agentes) a ser testados com relação à sua capacidade de agir como moduladores de crescimento do tecido podem ser produzidos, por exemplo, por bactéria, levedura, plantas ou outros organismos (por exemplo, produtos naturais), produzidos quimicamente (por exemplo, pequenas moléculas, incluindo peptidomiméticas), ou produzidos recombinantemente. Compostos teste contemplados aqui incluem moléculas orgânicas não peptídil, peptídeos, polipeptídeos, peptidomiméticos, açúcares, hormônios, e moléculas de ácido nucléico. Em uma modalidade específica, o agente teste é uma pequena molécula orgânica tendo um peso molecular de menos que cerca de 2,000 Daltons.

Os compostos podem ser fornecidos como entidades únicas, discretas, ou fornecidos em bibliotecas de maior complexidade, tal como feito por substâncias químicas combinatoriais. Estas bibliotecas podem compreender, por exemplo, álcoois, haletos de alquila, aminas, amidas, ésteres, aldeídos, éteres e outras classes de compostos orgânicos. A apresentação de compostos teste no sistema teste podem ser tanto em uma forma isoladas quanto como misturas de compostos, especialmente nas etapas de seleção iniciais. Opcio-

nalmente, os compostos podem ser opcionalmente derivatizados com outros compostos e têm grupos de derivatização que facilitam a isolamento dos compostos. Exemplos não limitantes de grupos de derivatização incluem biotina, fluoresceína, digoxigenina, proteína fluorescente verde, isótopos, poliistidina, gotas magnéticas, glutathione S transferase (GST), reticuladores fotoativáveis ou qualquer combinações destes.

Em muitos medicamentos para selecionar programas que testam bibliotecas de compostos e extratos naturais, ensaios de alta produção são desejáveis a fim de maximizar o número de compostos que sobreviveram em um dado período de tempo. Ensaios que são realizados em sistemas sem célula como esses, podem ser derivados com proteínas purificadas ou semipurificadas, são frequentemente preferidos como seleções "primárias" no qual eles podem ser gerados para permitir desenvolvimento rápido e detecção relativamente fácil de uma alteração em um alvo molecular que é mediado por um composto teste. Além do mais, os efeitos de toxicidade celular ou biodisponibilidade do composto teste podem ser geralmente ignorados no sistema *in vitro*, o ensaio em vez disso sendo focado basicamente no efeito do medicamento no alvo molecular como pode ser manifestado em uma alteração de afinidade de ligação entre um polipeptídeo ActRIIa e ativina.

Meramente para ilustrar, em um ensaio de seleção exemplar, o composto de interesse é colocado em contato com um polipeptídeo ActRIIa isolado e purificado que é ordinariamente capaz de se ligar a ativina. À mistura do composto e polipeptídeo ActRIIa é então adicionada uma composição contendo um agente de ligação ActRIIa. A detecção e quantificação de complexos ActRIIa/ativina fornece um meio para determinar o eficácia do composto na inibição (ou potencialização) de formação de complexo entre o polipeptídeo ActRIIa e ativina. A eficácia do composto pode ser avaliada gerando curvas de resposta de dose a partir dos dados obtidos usando várias concentrações do composto teste. Além do mais, um ensaio controle pode também ser realizado para fornecer uma linha de base para comparação. Por exemplo, em um ensaio controle, ativina isolada e purificada é adicionada a uma composição contendo o polipeptídeo ActRIIa, e a formação do complexo ActRIIa/ativina é quantificado na ausência do composto teste. Deve-se entender que, em geral, a ordem na qual os reagentes podem ser misturados pode ser variada, e pode ser misturado simultaneamente. Além do mais, no lugar de proteínas purificadas, extratos celulares e lisatos podem ser usados para tornar um sistema de ensaio sem célula adequado.

Formação do complexo entre o polipeptídeo ActRIIa e ativina pode ser detectada por uma variedade de técnicas. Por exemplo, modulação da formação de complexos pode ser quantificada usando, por exemplo, proteínas marcadas detectáveis tais como polipeptídeo ActRIIa ou ActRIIa ou ativina radiomarcados (por exemplo, ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C ou ^3H), marcados fluorescentemente (por exemplo, FITC), ou marcados enzimaticamente, por imunensaio, ou por detecção cromatográfica.

Em certas modalidades, ensaios polarização de fluorescência e ensaios na medição de transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET), podem ser usados para medir tanto direta quanto indiretamente, do grau de interação entre um polipeptídeo ActR11a e sua proteína de ligação. Outros modos de detecção, tal como aqueles com base em guias de onda óticas (Publicação PCT WO 96/26432 e patente U.S. 5.677.196), ressonância de plasma de superfície (SPR), sensores de carga de superfície, e sensores de força de superfície.

Uma interação de ensaio trap, também conhecido como o "dois ensaios híbridos", podem também ser usados para interromper ou potencializar a interação entre um polipeptídeo ActR11 e sua proteína de ligação. Ver por exemplo, patente U.S. 5.283.317; Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232; Madura et al. (1993) J Biol Chem 268: 2046-12054; Bartel et al. (1993) Biotechniques 14:920-924; e Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696). Em uma modalidade específica, a um sistema de dois híbridos reverso pode ser usado para identificar compostos (por exemplo, pequenas moléculas ou peptídeos) que dissociam interações entre um polipeptídeo ActR11a e sua proteína de ligação. Ver por exemplo, Vidal and Legrain, (1999) acids nucleics Res 27:919-29; Vidal and Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81; e patentes U.S. 5.525.490, 5.955.280 e 5.965.368.

Em certas modalidades, os compostos são identificados por sua capacidade de interagir com um polipeptídeo ActR11a ou ativina aqui descritos. A interação entre o composto e o polipeptídeo ActR11a, ou ativina pode ser covalente ou não covalente. Por exemplo, tal interação pode ser identificada no nível de proteína usando métodos bioquímicos *in vitro*, incluindo fotorreticulação, ligação de agente de ligação radiomarcados, e cromatografia de afinidade (Jakoby WB et al., 1974, Methods in Enzymology 46: 1). Em certos casos, os compostos podem ser selecionados em um mecanismo baseado no ensaio, tal como um ensaio para detectar compostos que se ligam a um ativina ou polipeptídeo ActR11a. Isto pode incluir um evento de ligação de fase sólida ou fase de fluido. Alternativamente, o gene que codifica um ativina ou polipeptídeo ActR11a podem ser transfectado com um sistema repórter (por exemplo, β -galactosidase, luciferase, ou proteína fluorescente verde) em uma célula e selecionada contra a biblioteca opcionalmente por uma seleção de alta produção ou com membros individuais da biblioteca. Outro mecanismo baseado em ensaios de ligação pode ser usado, por exemplo, ensaios de ligação que detectam mudanças em energia livre. Ensaios de ligação podem ser realizados com o alvo fixado em um poço, gota ou chipe ou capturado por um anticorpo imobilizado ou resolvido por eletroforese capilar. Os compostos ligados podem ser detectados usando normalmente ressonância de plasma colorimétrica ou de fluorescência ou de superfície.

6. Usos terapêuticos Exemplares

Em certas modalidades, a presente invenção fornece métodos para tratar ou preve-

nir câncer de mama em um indivíduo que necessita deste administrando ao indivíduo uma quantidade terapêuticamente efetiva de um antagonistas de ativina-ActRIIa, tal como, por exemplo, um polipeptídeo ActRIIa. Estes métodos podem ser usados para tratamento terapêutico bem como profilático de humanos particularmente mulheres que têm o risco de desenvolver câncer de mama. Como cada mulher com o risco de desenvolver câncer de mama, uma mulher com um alto risco de desenvolver câncer de mama é uma mulher cujos fatores de risco conferem uma maior probabilidade de desenvolver a doença, comparado a população geral ou a população de mulheres em um certo grupo de idade. Fatores de risco exemplares incluem idade, histórico familiar ou constituição genética, hábito de vida tais como exercício e dieta, exposição a radiação ou outros agentes que causam câncer, idade no momento em que nasce a primeira criança, mudanças genética, e ganho de peso após a menopausa.

Da maneira aqui usada, uma substância terapêutica que "previne" um distúrbio ou condição refere-se a um composto que, em uma amostra estatística, reduz a ocorrência do distúrbio ou condição na amostra tratada com relação a uma amostra controle não tratada, ou atrasa o princípio de ação de um ou mais sintomas ou características do distúrbio ou condição com relação à amostra controle não tratada. Por exemplo, prevenir câncer de mama pode referir-se a ausência de novas lesões após o tratamento, ou a ausência ou atraso de doença metastática.

O termo "tratar câncer de mama" refere-se a uma melhoria de um ou mais sintomas ou características da doença com relação a um controle não tratado ou com relação à gravidade de doença antes do tratamento. O termo não exige necessariamente que o paciente que recebe o tratamento seja curado ou que a doença seja completamente erradicado do paciente. Um agente que trata câncer de mama pode ser um agente que reduz a gravidade de um ou mais sintomas ou características da doença. Deve-se notar que crescimento e progresso do tumor é influenciado por uma variedade de fatores, incluindo mediadores de progressão do ciclo celular e divisão celular e reguladores de morte celular, ou apoptose. Conseqüentemente, tratar câncer de mama pode envolver uma diminuição na proliferação de célula cancerígena ou uma diminuição na taxa de divisão celular. Alternativamente ou adicionalmente, tratar câncer de mama pode envolver uma diminuição em sobrevivência da célula cancerígena, um aumento em apoptose ou uma menor ocorrência ou gravidade de câncer de mama metastática, particularmente câncer de mama metastática do osso. Conseqüentemente, em certas modalidades, tratar câncer de mama pode envolver tanto uma diminuição na divisão celular quanto um aumento na morte celular. Independente do mecanismo, a eficácia de um agente em tratar câncer de mama pode ser determinada por matrizes observáveis, tal como um baixo número de células cancerígenas comparadas a um controle (tanto em virtude de menor proliferação, maior apoptose, quanto ambos), ou uma dimi-

nuição no tamanho do tumor comparado a um controle. Portanto, tratar câncer de mama ou inibir crescimento de tumor ou célula cancerígena é deve ser neutro como para o mecanismo pelo qual ocorre uma mudança como essa. Tanto prevenção quanto tratamento pode ser discernido no diagnóstico fornecido por um médico ou outro profissional de e a análise do resultado visado de administração do agente terapêutico.

Quando se observam ao mesmo tempo os efeitos dos antagonistas em questão na progressão do câncer de mama em humanos, um efeito pode ser avaliado por uma diminuição ou desaparecimento de doença mensurável e/ou a ausência de novas lesões ou a prevenção de metástases. Por exemplo, antagonistas de ativina ActRIIa podem reduzir ou atrasar significativamente a progressão do câncer de mama em pacientes tanto com câncer de mama não invasivo quanto invasivo. Além do mais, os antagonistas podem prevenir ou reduzir o risco de desenvolver câncer de mama em mulher saudável com fatores de risco para a doença. Os antagonistas podem também reduzir o risco de recorrência de câncer de mama em pacientes com um histórico da doença.

Consequentemente, antagonistas ativina da ActRIIa podem ser usados para prevenir ou atrasar o início de ação de câncer de mama em indivíduos considerados ter o risco de desenvolver a doença, e tais antagonistas podem ser usados em populações de paciente selecionado. Exemplos de populações de paciente apropriados incluem pacientes com um histórico familiar de câncer de mama e ovário, tal como pacientes fêmeas onde uma mãe ou irmã foi diagnosticada com a doença. Pacientes que têm mutações nos genes BRCA 1/2 ou outros genes se mostram mulher predispostas ao câncer de mama e ovário são também incluídos. Em uma modalidade, um paciente considerado com alto risco de desenvolver câncer de mama, mas que não foi diagnosticado com a doença é tratado com um antagonista da ativina ActRIIa. Tal tratamento pode iniciar quando o paciente atinge a idade de 30, 35, ou 40, ou quando um paciente feminino não está tentando conceber (isto é, o paciente não planeja dar a luz a uma criança) ou tenha atingido a menopausa. Em particular, dados aqui apresentados demonstram que antagonistas ativina da ActRIIa inibem o espalhamento metastático de uma linhagem celular de câncer de mama introduzido na circulação geral, demonstrando que tais antagonistas podem ser usados na prevenção de metástases de tumores da mama. Tais compostos seriam usados para tratar qualquer paciente que foi diagnosticado com câncer de mama ou suspeito de ter câncer de mama. Adicionalmente, pacientes que são considerados ter uma mastectomia preventiva ou eletiva, em virtude de risco elevado de desenvolver um tumor de mama podem ser leitos em substituição ou em adição para tomar um antagonista da ativina ActRIIa para diminuir o risco de espalhamento metastático de tumores não detectados.

Antagonistas ativina da ActRIIa aqui revelados, e particularmente Proteínas ActRIIa-Fc, podem ser usados para tratar ou prevenir câncer de mama em um paciente, incluindo

pacientes com tumores sólidos bem como pacientes com câncer metastático. Antagonistas ativina da ActRIIa podem também ser administrados a sujeitos humanos com lesões pré-cancerígenas ou benignas da mama ou com qualquer lesões proliferativas anormais incluindo hiperplasia típica, hiperplasia atípica, e carcinoma não invasivo ou in situ. Os antagonistas da presente revelação são também usados no tratamento ou prevenção tanto de cânceres dependente de hormônio ou responsivo a hormônio (por exemplo, cânceres positivos para receptores de estrógeno) e cânceres independentes de hormônio (por exemplo, cânceres negativos para receptor de estrógeno ou mutantes para receptor de estrógeno). Antagonistas ativina da ActRIIa são também usados como agente terapêuticos para cânceres nos quais fatores de crescimento ou oncogenes são ativados (por exemplo, cânceres de mama nos quais tirosina quinase c-erbB-2 (também conhecido como HER-2/Neu)) é expressa. Antagonistas ativina da ActRIIa podem se mostrar particularmente usados em tumores que expressam elevados níveis (com relação a células derivadas de tecido de mama normal) de ativina (por exemplo, A, AB ou B) ou níveis elevados de ActRIIa ou ActRIIb.

A presente invenção reconhece que a eficácia de terapias convencionais de câncer (por exemplo, quimioterapia, terapia de radiação, fototerapia, imunoterapia, e cirurgia) pode ser aumentada através do uso dos antagonistas em questão. Consequentemente, antagonistas ativina da ActRIIa podem ser usados em combinação com terapias para o tratamento, prevenção, ou controle de câncer de mama. Os antagonistas podem ser administrados aos pacientes em combinação com radiação e/ou tratamento cirúrgico bem como com quimioterapia citotóxica e/ou terapias endócrinas. Tais tratamentos de combinação podem funcionar sinergisticamente e permite a redução de dosagem de cada um dos tratamentos individuais, reduzindo desta forma os efeitos colaterais detrimenais enxertados por cada tratamento em maiores dosagens. Em outras instâncias, malignidade que são refratárias a um tratamento podem responder a uma terapia de combinação de dois ou mais diferentes tratamentos. Consequentemente, a revelação diz respeito a administração de um antagonista da ativina ActRIIa em combinação com um outro agente antineoplástico convencionais, tanto concomitantemente quanto sequencialmente, a fim de aumentar o efeito terapêutico do agente antineoplástico ou superar a resistência celular a tal agente antineoplástico.

Compostos farmacêuticos que podem ser usados para terapia antitumor combinatória incluem, meramente para ilustrar: aminoglutetimida, amsacrina, anastrozol, asparaginase, beg, bicalutamida, bleomicina, buserelina, busulfano, campotecina, capecitabina, carboplatina, carmustina, clorambucil, cisplatina, cladribina, clodronato, colchicina, ciclofosfamida, ciproterona, citarabina, dacarbazina, dactinomina, daunorubicina, dienestrol, dietilstilbestrol, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, estradiol, estramustina, etoposida, exemestano, filgrastim, fludarabina, fludrocortisona, fluorouracil, fluoximesterona, flutamida, gemcitabina, genisteina, goserelina, hidroxiuréia, idarubicina, ifosfamida, imatinib, interferon, irinotecano,

ironotecano, letrozol, leucovorina, leuprolida, levamisol, lomustina, mecloretamina, medroxi-progesterona, megestrol, melfalano, mercaptopurina, mesna, metotrexato, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, nilutamida, nocodazol, octreotida, oxaliplatina, paclitaxel, pamidronato, pentostatina, plicamicina, porfimer, procarbazona, raltitrexed, rituximab, estrepto-zocina, su-
 5 ramina, tamoxifeno, temozolomida, teniposida, testosterona, tioguanina, tiotepa, dicloreto de titanoceno, topotecano, trastuzumab, tretinoína, vinblastina, vincristina, vindesina, e vinorelbina.

Estes compostos antitumor quimioterapêutico podem ser categorizados por seu mecanismo de ação, por exemplo, nos seguintes grupos: agentes antimetabólitos/anticancerígenos, tal como análogos de pirimidina (5-fluorouracil, floxuridina, capecitabina, gemcitabina e citarabina) e análogos de purina, antagonistas de folato e inibidores relacionados (mercaptopurina, tioguanina, pentostatina e 2-clorodeoxiadenosina (cladribina)); agentes antiproliferativos/antimitóticos incluindo produtos naturais tal como alcalóides vinca (vinblastina, vincristina, e vinorelbina), disruptores de microtubulo tal como taxano (paclitaxel, docetaxel), vincristina, vinblastina, nocodazol, epotilonas e navelbina, epididodofilotoxinas (etoposida, teniposido), agentes de danificação de DNA (actinomicina, amsacrina, antraciclina, bleomicina, busulfano, camfotecina, carboplatina, clorambucil, cisplatina, ciclofosfamida, citoxano, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, hexametilmelaminoxaliplatina, ifosfamida, melfalano, mecloretamina, mitomicina, mitoxantrona, nitrosouréia, plicamicina, procarbazona, taxol, taxotero, teniposida, trietilenetiofosforamida e etoposide (VP 16)); antibióticos tal como dactinomicina (actinomicina D), daunorubicina, doxorubicina (adriamicina), idarubicina, antraciclinaes, mitoxantrona, bleomicinas, plicamicina (mihramicina) e mitomicina; enzimas (L- asparaginase que metaboliza sistemicamente L-asparagina e de-
 10 priva células que não têm a capacidade de sintetizar sua própria asparagina); agentes antiplaquetas; agentes de alquilação antiproliferativos/antimitóticos tal como nitrogênio mostardas (mecloretamina, ciclofosfamida e análogos, melfalano, clorambucil), etileniminas e metilmelaminas (hexametilmelamina e tiotepa), alquil sulfonatos-busulfano, nitrosoúreas (car-
 15 mustina (BCNU) e análogos, estrepto-zocina), trazenos - dacarbazina (DTIC); antimetabólitos antiproliferativos/antimitóticos tal como análogos de ácido fólico (metotrexato); complexos coordenação de platina (cisplatina, carboplatina), procarbazona, hidroxiuréia, mitotano, aminoglutetimida; hormônios, análogos de hormônio (estrógeno, tamoxifeno, goserelina, bicalutamida, nilutamida) e inibidores de aromatase (letrozol, anastrozol); anticoagulantes (heparina, sais de heparina sintética e outros inibidores de trombina); agentes fibrinolíticos (tais como ativador plasminogênio do tecido, estreptoquinase e uroquinase), aspirina, dipiridamol, ticlopidina, clopidogrel, abciximab; agentes antimigratórios; agentes antsecretórios (breveldina); imunossupressivos (ciclosporina, tacrolimus (FK-506), sirolimus (rapamicina), azatioprina, micofenolato mofetil); compostos antiangiogênico (TNP-470, genisteína) e inibi-
 20
 25
 30
 35

dores do fator de crescimento (inibidores do fator do crescimento endotélico vascular (VEGF), inibidores do fator de crescimento de fibroblasto (FGF)); bloqueador do receptor de angiotensina; doadores de óxido nítrico; oligonucleotídeos antissentido; anticorpos (trastuzumab); inibidores do ciclo celular e indutores de diferenciação (tretinoína); inibidores de mTOR, inibidores de topoisomerase (doxorubicina (adriamicina), amsacrina, camfotecina, daunorubicina, dactinomicina, eniposida, epirubicina, etoposida, idarubicina e mitoxantrona, topotecano, irinotecano), corticosteróides (cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisona, e prenisolona); inibidores quinase de transdução de sinal do fator de crescimento; indutores de disfunção mitocondrial e ativadores de caspase; e disruptores cromatina.

Em certas modalidades, compostos farmacêuticos que podem ser usados para terapia combinatória incluem agentes anti-angiogêneses tal como (1) inibidores de liberação de "moléculas angiogênicas" tal como bFGF (fator de crescimento de fibroblasto básico); (2) neutralizadores de moléculas angiogênicas, tal como um anticorpos anti- β bFGF; e (3) inibidores de resposta de célula endotelial ao estímulo angiogênico, incluindo inibidor de colagenase, inibidores de renovação da membrana basal, esteróides angiostáticos, inibidores angiogênese derivados fúngico, 4 fator de plaqueta, trombospondina, medicamentos de artrite tais como D-penicillamina e tiomalato de ouro, análogos de vitamina D3, alfa-interferon, e similares. Para propostas adicionais de inibidores de angiogênese, ver Blood et al., *Bioch. Biophys. Acta.*, 1032:89-118 (1990), Moses et al., *Science*, 248: 1408-1410 (1990), Ingber et al., *Lab. Invest.*, 59:44-51 (1988), and U.S. Pat. Nos. 5,092,885, 5,112,946, 5,192,744, 5,202,352 e 6,573,256. Além do mais, existe uma ampla variedade de compostos que podem ser usados para inibir angiogênese, por exemplo, peptídeos ou agentes que bloqueiam o caminho de angiogênese mediado por VEGF, endostatina proteína ou derivados, fragmentos de ligação de lisina de angiostatina, melanina ou compostos promotores de melanina, fragmentos de plasminogênio (por exemplo, Kringles 1-3 de plasminogênio), subunidades de tropoína, antagonistas de vitronectina $\alpha v \beta 3$, peptídeos derivados de Saposina B, antibióticos ou análogos (por exemplo, tetraciclina, ou neomicina), composições contendo dienogest, compostos compreendendo um núcleo inibitório de MetAP-2 acoplado a um peptídeo, o composto EM-138, chalcona e seus análogos, e inibidores de naladase. Ver, por exemplo, patentes U.S. Nos. 6.395.718, 6.462.075, 6.465.431, 6.475.784, 6.482.802, 6.482.810, 6.500.431, 6.500.924, 6.518.298, 6.521.439, 6.525.019, 6.538.103, 6.544.758, 6.544.947, 6.548.477, 6.559.126, e 6.569.845.

Dependendo da natureza da terapia combinatória, a administração dos antagonistas terapêuticos da invenção continuar enquanto a outra terapia é administrada e/ou a seguir. A administração dos antagonistas aqui descritos pode ser feita em uma dose única, ou em doses múltiplas. Em alguns exemplos, a administração dos antagonistas começa pelo

menos vários dias antes da terapia convencional, enquanto em outros exemplos, a administração começa tanto imediatamente antes quanto no momento da administração da terapia convencional.

7. Composições farmacêuticas

5 Em certas modalidades, antagonistas de ativina-ActRIIa aqui descritos são formulados com um carreador farmacêuticamente aceitável. Por exemplo, um polipeptídeo ActRIIa pode ser administrado sozinho ou como um componente de uma formulação farmacêutica (composição terapêutica). Os compostos em questão podem ser formulados para administração de qualquer maneira conveniente para o uso em remédio humano ou veterinário.

10 Em certas modalidades, os métodos para tratar ou prevenir câncer de mama da maneira aqui descrita inclui administrar a composição sistematicamente, ou localmente como um implante ou dispositivo. Quando administrada a composição terapêutica para uso nesta invenção, é claro, em uma forma isenta de pirogênio fisiologicamente aceitável. Agentes terapeuticamente usados sem ser os antagonistas ativina- ActRIIa que podem também
15 opcionalmente ser incluídos na composição da maneira descrita anteriormente, podem ser administrados simultaneamente ou sequencialmente com os antagonistas nos métodos da invenção.

Tipicamente, antagonistas de ativina-ActRIIa seriam administrados parenteralmente. Composições farmacêuticas adequadas para administração parenteral podem compreender um ou mais Polipeptídeos ActRIIa em combinação com um ou mais soluções aquosas ou não aquosas isotônicas estéreis farmacêuticamente aceitáveis, dispersões, suspensões ou emulsões, ou pós estéreis que podem ser reconstituídos em soluções ou dispersões injetáveis estéreis imediatamente antes do uso, que podem conter antioxidantes, tampões, bacteriostáticos, solutos que tornam a formulação isotônica com o sangue do recipiente visado
25 ou agentes de suspensão ou de espessamento. Exemplos de carreadores aquosos e não aquosos adequados que podem ser empregados nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, polióis (tal como glicerol, propileno glicol, polietileno glicol, e similares), e misturas adequadas destes, óleos vegetais, tal como óleo de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis, tal como oleato de etila. Fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo,
30 pelo uso de materiais de revestimento, tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula exigida no caso de dispersões, e pelo uso de agentes tensoativos.

Adicionalmente, a composição pode ser encapsulada ou injetada em uma forma para distribuição a um sítio do tecido alvejado (por exemplo, epitélio mamário). Em certas modalidades, as composições aqui descritas podem incluir uma matriz capaz de distribuir um
35 ou mais compostos terapêuticos (por exemplo, polipeptídeos ActRIIa) a um sítio do tecido alvejado (por exemplo, epitélio mamário), fornecendo uma estrutura para o desenvolvimento do tecido e idealmente capaz de ser reabsorvida no corpo. Por exemplo, a matriz pode for-

necer lenta liberação dos polipeptídeos ActR11a. Tais matrizes podem ser formadas de materiais atualmente no uso para outras aplicações médicas implantadas.

5 A escolha de material da matriz é baseada em biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades mecânicas, aparência cosmética e interface propriedades. A aplicação particular das composições em questão definirá a formulação apropriada. As matrizes potenciais para as composições podem ser biodegradáveis e sulfato de cálcio quimicamente definido, tricalciofosfato, hidroxiapatite, ácido polilático e polianidretos. Outros materiais potenciais são biodegradáveis e biologicamente bem definidos, tal como colágeno ósseo ou dérmico. Matrizes adicionais são compreendidas de componentes de proteínas puras ou
10 matriz extracelular. Outras matrizes potenciais não são biodegradáveis e quimicamente definidas, tal como hidroxiapatite sinterizado, biovidro, aluminatos, ou outras cerâmicas. As matrizes podem ser compreendidas de combinações de qualquer dos tipos de material mencionados anteriormente, tal como ácido polilático e hidroxiapatite ou colágeno e tricálciofosfato. As biocerâmicas podem ser alteradas na composição, tal como em cálcio-aluminato-
15 fosfato e processadas para alterar o tamanho do poro, tamanho de partícula, forma de partícula, e biodegradabilidade.

Em certas modalidades, antagonistas aqui descritos podem ser administrados oralmente, por exemplo, na forma de cápsulas, sachês, pílulas, comprimidos, pílulas em forma de losango (usando uma base flavorizada, normalmente sacase e acácia ou tragacanto),
20 pós, grânulos, ou como uma solução ou uma suspensão em um 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 enxaguante bucal e similares, cada qual contendo uma quantidade predeterminada de um agente como um ingrediente ativo. Um antagonista pode também ser
25 administrado como um bolo, eletuário ou pasta.

Em formas de dosagem sólidas para administração oral (cápsulas, comprimidos, pílulas, drágeas, pós, grânulos, e similares), um ou mais agonistas terapêuticos podem ser misturados com um ou mais carreadores farmacologicamente aceitáveis, tais como citrato de sódio ou fosfato de dicálcio, e/ou qualquer dos seguintes: (1) cargas ou extensores, tais como amidos, lactose, sacarose, glicose, manitol, e/ou ácido silícico; (2) gentes aglutinantes,
30 tais como, por exemplo, carboximetilcelulose, alginatos, gelatina, polivinil pirrolidona, sacarose, e/ou acácia; (3) umectantes, tal como glicerol; (4) agentes de desintegração, tais como ágar-ágar, carbonato de cálcio, batata ou amido de tapioca, ácido alginico, certos silicatos e carbonato de sódio; (5) agentes de retardamento de solução, tal como parafina; (6) aceleradores de absorção, tal como compostos amônio quaternário; (7) agentes edulcorantes, tais como, por exemplo, álcool cetílico e monoestearato de glicerol; (8) absorventes, tais como caolim e argila de bentonita; (9) lubrificantes, tais como talco, cálcio estearato, estearato de
35

magnésio, polietileno glicóis sólidos, sulfato lauril de sódio, e misturas destes; e (10) agentes de coloração. No caso de cápsulas, comprimidos e pílulas, as composições farmacêuticas podem também compreender agentes de tamponamento. Composições sólidas de um tipo similar podem também ser empregadas como cargas em cápsulas gelatina cheias macias e duras usando tais excipientes como lactose ou açúcares de leite, bem como polietileno glicóis de alto peso molecular e similares.

Formas de dosagem líquidas para administração oral incluem emulsões, microemulsões, soluções, suspensões, xaropes, e elixires farmacêuticamente aceitáveis. Além do ingrediente ativo, as formas de dosagem líquidas podem conter diluentes inertes comumente usados na tecnologia, tal como água ou outros solventes, agentes solubilizantes e emulsificantes, tais como álcool etílico, álcool isopropílico, carbonato de etila, acetato de etila, álcool benzílico, benzoato de benzila, propileno glicol, 1,3-butileno glicol, óleos (em particular, óleos de semente de algodão, de amendoim, de milho, de germe, de oliva, rícino, e sésamo), glicerol, álcool tetraidrofurfílico, polietileno glicóis e ésteres de ácido graxo de sorbitano, e misturas destes. Além de diluentes inertes, as composições orais também podem incluir adjuvantes, tal como agentes umectantes, agentes emulsificantes e de suspensão, agentes adoçantes, flavorizantes, corantes, perfumantes e conservantes.

Suspensões, além dos compostos ativos, podem conter agentes de suspensão, tal como álcoois isostearílicos etoxilados, polioxietileno sorbitol, e ésteres de sorbitano, celulose microcristalina, metaidróxido de alumínio, bentonita, ágar-ágar e tragacanto, e misturas destes.

Composições usadas de acordo com os métodos aqui descritos podem também conter adjuvantes, tal como conservantes, agentes umectantes, agentes emulsificantes e agentes de dispersão. Prevenção da ação de microorganismos pode ser garantida pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, ácido sórbico fenol, e similares. Pode-se também ser desejável incluir agentes isotônicos, tal como açúcares, cloreto de sódio, e similares nas composições. Além do mais, absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser realizada pela inclusão de agentes que atrasam a absorção, tal como monoestearato de alumínio e gelatina.

Entende-se que o regime de dosagem adequado para tratar ou prevenir câncer de mama seria determinado pelo médico atendente considerando vários fatores que modificam a ação dos compostos em questão da invenção (por exemplo, polipeptídeos ActR11a). Os vários fatores incluem, mas sem limitações, a idade, sexo, e dieta, a gravidade da doença, tempo de administração e outros fatores clínicos do paciente. A adição de outros fatores de crescimento conhecidos na composição final pode também afetar a dosagem. O progresso pode ser monitorado pela avaliação periódica de vários fatores incluem, mas sem limitações, tamanho do tumor, estágio ou grau histológico estado do receptor de estrógeno ou progeste-

rona, angioinvasão e metástase do linfonódulo regional. O médico pode também monitorar marcadores tal como níveis da proteína uPAII – altos níveis de uPA e uPAII são associados com um alto risco de amplificação de metástase e gene Her-2 e/ou expressão de proteína, que é também associada com metástase (Weigelt et al. 2005 Nat. Rev. Cancer 5: 591-602).

- 5 O perfilamento da expressão genética pode se mostrar também útil no monitoramento da progressão da doença (van 't Veer et al. 2002 Nature 415: 530-536 and van of Vijver et al. 2002 N. Engl. J. Med. 347: 1999-2009).

Em certas modalidades, a presente invenção também fornece métodos para tratar ou prevenir câncer de mama que envolve terapia genética para a produção *in vivo* de poli-peptídeo ActRII. Tal terapia alcançaria seu efeito terapêutico por introdução da sequência de polinucleotídeos ActRIIa nas células ou tecidos envolvidos em câncer de mama, tal como, por exemplo, células epiteliais mamárias. A distribuição de sequência de polinucleotídeos ActRII pode ser obtida usando um vetor de expressão recombinante, tal como um vírus quimérico ou um sistema de dispersão coloidal. Preferido para distribuição de sequência de polinucleotídeos ActRIIa é o uso de lipossomas alvejadas.

Vários vetores virais que podem ser utilizados para terapia genética, conforme preceituado aqui, incluem adenovírus, herpes vírus, vaccínia, ou um vírus de RNA, tal como um retrovírus. O vetor retroviral pode ser um derivado de um retrovírus de murino ou ave. Exemplos de vetores retrovirais em que um único gene estranho pode ser inserido incluem, mas sem limitações: vírus de leucemia de murino Moloney (MoMuLV), vírus do sarcoma de murino Harvey (HaMuSV), vírus de tumor mamário de murino (MuMTV), e vírus de sarcoma de Rous (RSV). Inúmeros vetores retrovirais adicionais podem incorporar múltiplos genes. Todos estes vetores podem transferir ou incorporar um gene para um marcador selecionável, de maneira tal que células traduzidas podem ser identificadas e geradas. Vetores retrovirais podem ser preparados específicos para o alvo anexando, por exemplo, um açúcar, um glicolípido, ou uma proteína. O alvejamento preferido é realizado usando um anticorpo. Versados na tecnologia perceberão que sequência de polinucleotídeos específicas podem ser inseridas no genoma retroviral ou anexadas a um envelope viral para permitir distribuição específica ao alvo do vetor retroviral contendo o polinucleotídeo ActRIIa.

Alternativamente, células celulares de tecido podem ser diretamente transfectadas com plasmídeos que codificam os genes estruturais retrovirais gag, pol e env, por transfecção com fosfato de cálcio convencional. Estas células são então transfectadas com o plasmídeo do vetor contendo os genes de interesse. As células resultantes liberam o vetor retroviral no meio de cultura.

Um outro sistema de distribuição alvejado para polinucleotídeos ActRIIa é um sistema de dispersão coloidal. Sistemas de dispersão coloidais incluem complexos de macromolécula, nanocápsulas, microesferas, gotas, e sistemas a base de lipídeo incluindo emul-

sões óleo em água, micelas, micelas misturadas e lipossomas. O sistema coloidal preferido desta invenção é um lipossoma. Lipossomas são vesículas de membrana artificial que são usadas como veículos de distribuição *in vitro* e *in vivo*. RNA, DNA e vírions intactos podem ser encapsulados no interior aquoso e ser distribuídos às células em uma forma biologicamente ativa (ver, por exemplo, Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Métodos para transfectar gene eficientes usando um veículo de lipossoma são conhecidos na tecnologia, ver, por exemplo, Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988. A composição do lipossoma é normalmente uma combinação de fosfolipídeos, normalmente em combinação com esteróides, especialmente colesterol. Outros fosfolipídeos ou outros lipídeos também podem ser usados. As características físicas de lipossomas dependem do pH, intensidade iônica e da presença de cátions divalentes.

Exemplos de lipídeos usado em produção de lipossoma incluem compostos de fosfatidil, tal como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolipídeos, cerebrosódeos e gangliosídeos. Fosfolipídeos ilustrativos incluem fosfatidilcolina de ovo, dipalmitoilfosfatidilcolina e distearoilfosfatidilcolina. O alvejamento de lipossomas também é possível com base, por exemplo, na especificidade do órgão, especificidade da célula, e especificidade da organela, e é conhecido na tecnologia.

Exemplificação

A invenção, sendo agora descrita no geral, será mais prontamente entendida pela referência aos seguintes exemplos, que são incluídos meramente com propósitos de ilustração de certos aspectos e modalidades da presente invenção, e não pretende-se que limitem a invenção.

Exemplo 1 : Proteínas de Fusão ActR11a-Fc

Os requerentes construíram uma proteína de fusão ActR11a solúvel que tem o domínio extracelular de ActR11a humano fundido em um domínio Fc humano ou de camundongo, com um mínimo ligante entre eles. As construções são referidas como ActR11a-hFc e ActR11a-mFc, respectivamente.

ActR11a-hFc é mostrada a seguir da forma purificada a partir de linhagens celulares de CHO (SEQ ID NO: 7):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
 CWLDDINCYDRDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPK
PPTGGGHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEOYNSTYRVVSVLTVLHODWLNKEYKCKVSNKALP
VPIEKTISKAKGPREPOVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWOOGNVFCSCVMHEALHNHYTOKLSL
SPGK

As proteínas ActR11a-hFc e ActR11a-mFc foram expressadas em linhagens celulares

pressão recombinante. Da forma mostrada na figura 1, a proteína foi purificada como um único pico de proteína bem definido. Sequenciamento N-terminal revelou uma única sequência de -ILGRSTQE (SEQ ID NO: 11). A purificação pode ser alcançada por uma série de etapas da cromatografia de coluna, incluindo, for exemplo, três ou mais das seguintes, em qualquer ordem: cromatografia de proteína A, cromatografia em sefarose Q, cromatografia em fenilsefarose, cromatografia por exclusão de tamanhos e cromatografia de troca catiônica. A purificação pode ser completada com filtração viral e troca de tampão. A proteína ActRIIa-hFc foi purificada até uma pureza > 98 %, da forma determinada pela cromatografia por exclusão de tamanhos e > 95 %, da forma determinada por SDS PAGE.

ActRIIa-hFc e ActRIIa-mFc mostraram uma alta afinidade em relação aos elementos de ligação, particularmente, ativina A. GDF-11 ou Ativina A ("ActA") foram imobilizados em um chip Biacore CM5 usando procedimento de acoplamento de amina padrão. Proteínas ActRIIa-hFc e ActRIIa-mFc foram carregadas sobre o sistema, e a aglutinação foi medida. ActRIIa-hFc aglutinou em ativina com uma constante de dissociação (K_D) de 5×10^{12} , e a proteína aglutinou em GDF11 com uma K_D de $9,96 \times 10^{-9}$. Veja figura 2. ActRIIa-mFc se comportou de forma similar.

A ActRIIa-hFc foi muito estável em estudos farmacocinéticos. Ratos foram dosados com 1 mg / kg, 3 mg / kg ou 10 mg / kg da proteína ActRIIa-hFc, e níveis de plasma da proteína foram medidos em 24, 48, 72, 144 e 168 horas. Em um estudo separado, ratos foram dosados com 1 mg / kg, 10 mg / kg ou 30 mg / kg. Em ratos, ActRIIa-hFc teve uma meia-vida sérica de 11 - 14 dias, e níveis de circulação do medicamento foram bastante altos depois de duas semanas ($11 \mu\text{g} / \text{mL}$, $110 \mu\text{g} / \text{mL}$ ou $304 \mu\text{g} / \text{mL}$ para administrações iniciais de 1 mg / kg, 10 mg / kg ou 30 mg / kg, respectivamente.) Em macacos cinomolgo, a meia-vida plasmática foi substancialmente maior que 14 dias, e níveis de circulação do medicamento foram $25 \mu\text{g} / \text{mL}$, $304 \mu\text{g} / \text{mL}$ ou $1.440 \mu\text{g} / \text{mL}$ para administrações iniciais de 1 mg / kg, 10 mg / kg ou 30 mg / kg, respectivamente.

Exemplo 2: Caracterização de uma proteína ActRIIa-hFc

A proteína de fusão ActRIIa-hFc foi expressa em células CHO-DUKX B11 transfectadas estáveis de um vetor pAID4 (SV40 ori/melhorador, promotor de CMV), usando uma sequência líder de plasminogênio do tecido de SEQ ID NO:9. A proteína, purificada da maneira descrita anteriormente no Exemplo 1, tem uma sequência de SEQ ID NO:7. A porção Fc é uma sequência IgG1 Fc humana, da maneira mostrada em SEQ ID NO:7. A análise 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 apresentou uma meia vida sérica notavelmente longa em todos os animais testados, incluindo uma meia vida de 25-32 dias em pacientes humanos (ver Exemplo 3, a seguir). O material expresso na célula CHO tem uma maior afinidade com

agente de ligação da ativina B do que o reportado para uma proteína de fusão ActRIIa- hFc expressa em 293 células humanas (del Re et al., J Biol Chem. 2004 Dec 17;279(51):53126-35.). Adicionalmente, o uso da sequência líder tPa forneceu maior produção do que outras sequências líder e, ao contrário, ActRIIa-Fc expressa com um líder nativo, forneceu uma
5 sequência mais alta N-terminal pura. Uso da sequência líder nativa resultou em duas principais espécies de ActRIIa-Fc, cada qual tendo um sequência N-terminal diferente.

Exemplo 3: Experimentos Clínicos Humanos

A proteína de fusão descrita no Exemplo 2 foi administrada em pacientes humanos em um estudo aleatorizado, duplo cego, controlado em relação ao placebo, que foi conduzi-
10 do para avaliar, basicamente, a segurança da proteína em mulheres saudáveis pós-menopausais. Quarenta e oito sujeitos foram aleatorizados em coortes de 6 para receber tanto uma única dose de ActRIIa-hFc quanto placebo (5 ativos: 1 placebo). Os níveis de dose variaram de 0,01 até 3,0 mg / kg intravenosamente (IV) e de 0,03 até 0,1 mg / kg subcutaneamente (SC). Todos os sujeitos foram seguidos por 120 dias. Os sujeitos foram excluí-
15 dos do estudo se eles tomassem medicações afetando o metabolismo ósseo em 6 meses de entrada do estudo. Avaliações de segurança foram conduzidas após cada coorte para determinar a escalação da dose. Além da análise farmacocinética (PK), a atividade biológica de ActRIIa-hFc também foi avaliada pela medição de marcadores bioquímicos de formação e reabsorção óssea, e de níveis de FSH.

20 Não foi reportado nenhum evento adverso sério neste estudo. Eventos adversos (Aes) foram geralmente brandos e passageiros. Análises preliminares de Aes incluíram enxaqueca, valores laboratoriais elevados, sintomas de frio, enjôo ou vômito, infiltração intravenosa e hematoma nos locais de injeção.

Análise de PK da ActRIIa-hFc exibiu um perfil linear com dose, e a meia-vida média
25 de aproximadamente 25 - 32 dias. A área debaixo da curva (AUC) para ActRIIa-hFc foi linearmente relacionada à dose, e a absorção depois da dosagem SC foi essencialmente completa. Estes dados indicam que SC é uma abordagem desejável para dosagem em virtude de ela fornecer equivalente biodisponibilidade e meia-vida sérica ao medicamento, ainda evitando o aumento em concentrações séricas de medicamento associadas com os primei-
30 ros poucos dias de dosagem IV. ActRIIa-hFc ocasionou um rápido e sustentado aumento dependente de dose nos níveis séricos de fosfatase alcalina específica óssea (BAP), que é um marcador para crescimento ósseo anabólico, e uma diminuição dependente de dose em telopeptídeo colágeno tipo 1 C-terminal e nos níveis de ácido fosfatase 5b resistente ao tartrato, que são marcadores para reabsorção óssea. Outros marcadores, tal como P1NP,
35 mostraram resultados inconclusivos. Níveis de BAP mostraram efeitos quase saturantes na dosagem de medicamento mais alta, indicando que efeitos meio-máximo neste biomarcador ósseo anabólico podem ser alcançados em uma dosagem de 0,3 mg / kg, com aumentos

que variam até 3 mg / kg. Calculado como um relacionamento de efeito farmacodinâmico na AUC para o medicamento, o EC50 é 51,465 (dia * ng / mL). Estas mudanças no biomarcador ósseo foram sustentadas por aproximadamente 120 dias nos níveis mais altos da dose testada. Também houve uma diminuição dependente de dose nos níveis de FSH sérico
5 consistente com a inibição de ativina.

Uma dose única de ActRIIa-hFc dada a uma mulher em menopausa saudável foi segura e bem tolerada para a faixa de níveis dose testados. Os efeitos de PK e farmacodinâmicos prolongados sugerem que dosagem intermitente seria apropriada para estudos futuros. Por exemplo, dosagem a base de meia vida sérica poderia ser realizada mensalmente, ou na ordem de uma vez a cada duas, três, quatro, cinco ou seis semanas. Adicionalmente, em virtude de o efeito farmacodinâmico se estender bem além da residência sérica do medicamento, a dosagem pode ser realizada com base no efeito farmacodinâmico, significando que dosagem a cada três meses ou cada dois, três, quatro, cinco, seis ou mesmo doze meses pode ser efetivo para produzir o efeito desejado em pacientes. Este
10 experimento clínico demonstra que, em humanos, ActRIIa-hFc é um agente osteoanabólico com evidência biológica tanto de um aumento na formação óssea quanto uma diminuição em ressonância óssea.

Exemplo 4: ActRIIa-Fc melhora ou Previna Perda Óssea Causada por Metástases de Câncer de mama

Estima-se que 65 a 75 por cento de cânceres de mama metastizem no osso, causando dano substancial à estrutura óssea, aumentando risco de fratura e causando dor e outros efeitos colaterais. Testamos os efeitos de ActRIIa-Fc em um modelo de camundongo de câncer de mama que foi metastasizado no osso. Uma sublinhagem da linhagem celular humana de câncer de mama MDA-MB-231 (clone 2287, Kang et al. Cancer Cell 2003, vol
25 3:537-549) foi cultivada in vitro e células colhidas em uma densidade de 5×10^6 células/mL. MDA-MB-231 é uma linhagem celular que é altamente competente para semear no osso e causar dano ósseo similar ao causado pelas metástases ósseas. 10 μ l de células foram injetados na tíbia de camundongos nude atímicos fêmeas de 6 semanas de idade no dia do estudo 0. No dia do estudo 10 camundongos receberam ActRIIa-mFc (10 mg/kg/ duas vezes
30 semanalmente/ subcutânea) (n=8) ou veículo PBS (n=7). Progressão da doença foi avaliada por mudanças em densidade mineral óssea usando absorptiometria de raios X de energia dupla (PIXIMus) em intervalos semanais. Os camundongos foram tratados com ActRIIa-mFc por 4 semanas e em seguida sacrificados e as tíbias (tanto tumor injetado quanto sem tumor) foram coletados de cada animal. As tíbias foram em seguida processadas e preparadas para análise de tomografia microcomputadorizada (microCT) e histológica.
35

Injeção intratibiana de células MDA-MB-231 em camundongos nude atímicos promoveu o desenvolvimento de lesões ósseas osteolíticas na tíbia injetada comparado à prena

contralateral. Análise MicroCT da tíbia proximal, demonstraram uma redução de 62 %, no volume ósseo cancerígeno nas tíbias que carregam MDA-MB-231 comparado à tíbia sem tumor nos camundongos tratados com veículo PBS. Tratamento com ActRIIa-mFc levou a um aumento de 70 % ou 147 % na tíbia que carrega naïve ou tumor respectivamente comparado ao veículo ($P < 0.01$ para ambos). As tíbias que carregam tumor de camundongos tratados com ActRIIa-mFc tiveram uma densidade óssea cancerígena similar às tíbias naïve dos camundongos tratados com VEH ($p = 0,39$).

Assim, ActRIIa-mFc é capaz de eliminar o dano ósseo associado com a presença de células do tumor de mama no osso.

Exemplo 5: ActRIIa-Fc Reduz Metástases de Câncer de mama e Promove Sobrevivência

Como um modelo de doença metastática, células MDA-MB-231 podem ser introduzidas em camundongos por injeção intracardíaca. As células injetadas no ventrículo esquerdo migrariam através da corrente sanguínea e formam lesões metastática nos sítios distais. Um linhagem celular derivada MDA-MB-231-luc-D3H2LN (Caliper Life Sciences) é uma linhagem celular que expressa luciferase que permite o monitoramento não invasivo formação de tumor metastático usando tecnologia de imageamento biofotônico (Caliper Life Sciences). Este modelo foi usado para avaliar o potencial de ActRIIa-mFc de administrar a formação de lesões metastáticas em câncer de mama.

As células MDA-MB-231-luc-D3H2LN foram introduzidas por injeção intracardíaca nos vinte e seis camundongos nude atímicos. Quatorze dos camundongos foram tratados com veículo (Solução Salina tamponada com Fosfato-PBS) e doze foram tratados com ActRIIa-mFc (10 mg/kg, duas vezes semanalmente, injeção subcutânea) iniciando duas semanas antes da administração no tumor e continuando através do curso do estudo. Mais nove camundongos foram injetados mock com células e tratados com ActRIIa-mFc. Os camundongos foram periodicamente anestesiados e visualizados com emissão bioluminescente para detectar a formação de progressão metastática.

O grupo do tratamento ActRIIa-mFc apresentou um desenvolvimento substancialmente menor de lesões metastáticas. Por cinco semanas, doze dos quatorze camundongos tratados com o veículo mostram fortes sinais fluorescentes múltiplos indicativos de espalhamento metastático, enquanto apenas quatro dos doze camundongos tratados com ActRIIa-mFc mostraram lesões similares (Figure 3). Uma quantificação de intensidade de fluorescência mostrou uma diminuição de aproximadamente dez vezes no sinal de fluorescência nos camundongos tratados.

Além disso, o tratamento com ActRIIa-mFc aumentou notavelmente a sobrevivência dos camundongos. No dia quarenta do estudo, todos (14/14) os camundongos tratados com o veículo morrerem ou foram eutanizados (de acordo com os procedimentos padrões para

tratamento humano de estudo animais), enquanto apenas dois (2/12) dos camundongos tratados com ActR11a-mFc morreram ou foram eutanizados. No dia quarenta e cinco, 3/12 camundongos tratados com ActR11a-mFc morreram ou foram eutanizados, e nove de o camundongos injetados com o objeto de simulação morreram.

5 Portanto, o tratamento com ActR11a-mFc causa uma diminuição substancial na formação de lesões metastáticas, e promove a sobrevivência neste modelo de câncer de mama metastática. Estes dados indicam que ActR11a-Fc pode ser usado para tratar câncer de mama em pacientes humanos, particularmente em conjunto com terapias, tal como cirurgia, terapia hormonal ou quimioterapia tradicional com o tumor primário alvejado.

10 Exemplo 6: Proteínas ActR11a-Fc Alternativas

Uma variedade de variantes ActR11a que podem ser usados de acordo com os métodos aqui descritos são descritos no Pedido de Patente Internacional publicado como WO2006/012627 (ver por exemplo, pp. 55-60), aqui incorporado pela referência na sua íntegra. Uma construção alternativa pode ter uma deleção da cauda C-terminal (o final 15 aminoácidos do domínio extracelular de ActR11a. A sequência para uma construção como essa está apresentada a seguir (porção Fc sublinhada) (SEQ ID NO: 12):

15 ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
 CWLDDFNICYDRDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMTGGGTHTCPPCPA
 PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 20 TKPREEOYNSTYRVVSVLTVLHODWLNKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTOKLSLSLSPGK

Incorporação pela Referência

25 Todas as publicações e patentes mencionadas aqui estão dessa forma incorporadas pela referência na sua íntegra como se cada publicação ou patente individual fosse especificamente e individualmente indicada para ser incorporado pela referência. No caso de conflito, o presente pedido prevalecerá, incluindo qualquer definição aqui.

30 Embora modalidades específicas do objeto em questão tenham sido discutidas, a especificação anterior é ilustrativa e não restrita. Muitas variações se tornarão aparentes aos versado na tecnologia mediante a revisão desta especificação das revelações a seguir. O escopo total da invenção pode ser determinado pela referência.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para tratar ou prevenir câncer de mama ou perda óssea relacionada a câncer de mama em um paciente humano, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o método compreende administrar ao paciente uma quantidade efetiva de uma proteína de fusão ActR11a-Fc.
- 5
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína de fusão ActR11a-Fc é selecionada do grupo que consiste em:
- a. um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO:2;
- 10
- b. um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO:3; e
- c. um polipeptídeo compreendendo pelo menos 50 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 2.
3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína de fusão ActR11a-Fc tem uma ou mais das seguintes características:
- 15
- i. liga-se a uma agente de ligação de ActR11a com um K_D de pelo menos 10^{-7} M; e
- ii. inibe sinalização de ActR11a em uma célula.
4. Método, de acordo com a reivindicação 3, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a dita proteína de fusão ActR11a-Fc inclui um ou mais resíduos de aminoácidos modificados selecionados de: um aminoácido glicosilado, um aminoácido PEGelutado, um aminoácido farnesilado, uma aminoácido acetilado, um aminoácido biotinilado, uma aminoácido conjugado a uma fração lipídeo, e um aminoácido conjugado a um agente de derivatização orgânico.
- 20
5. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína de fusão ActR11a-Fc compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:3.
- 25
6. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína de fusão ActR11a-Fc compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:3.
- 30
7. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína de fusão ActR11a-Fc compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:3.
8. Método, de acordo com a reivindicação 2, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína de fusão ActR11a-Fc compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2.
- 35
9. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína de fusão ActR11a-Fc é um dímero formado de dois polipeptídeos que compreendem cada qual uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2 e em que a proteína de fusão ActR11a-Fc compreende três ou

mais frações de ácido siálico.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína de fusão ActRIIa-Fc compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

5 11. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína de fusão ActRIIa-Fc compreende entre três e cinco frações de ácido siálico.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o método causa menos que 10 % de aumento na massa muscular esquelética do paciente.

10 13. Método, de acordo com a reivindicação 11, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína de fusão ActRIIa-Fc é administrada de maneira a atingir uma concentração sérica no paciente de pelo menos 0,2 mg/kg.

14. Método, de acordo com a reivindicação 11, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína de fusão ActRIIa-Fc tem uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:7.

15 15. Método, de acordo com a reivindicação 11, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína de fusão ActRIIa-Fc tem um meia vida sérica de entre 15 e 40 dias em humanos sadios normais.

16. Método, de acordo com a reivindicação 11, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína de fusão ActRIIa-Fc é administrada ao paciente com uma frequência não mais que uma vez por semana.

20 17. Método, de acordo com a reivindicação 11, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína de fusão ActRIIa-Fc é administrada ao paciente com uma frequência não mais que uma vez por semana.

18. Método, de acordo com a reivindicação 11, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína de fusão ActRIIa-Fc é administrada ao paciente com uma frequência não mais que uma vez por três meses.

25 19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 18, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente está recebendo, ou recebeu dentro de um ano antes da administração de proteína de fusão ActRIIa-Fc, uma terapia antirressortiva óssea.

30 20. Método, de acordo com a reivindicação 19, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o agente antirressortivo é selecionado do grupo que consiste em: um agente bifosfonato, um ligante do antagonista RANK e um antagonista de osteoprotegrina.

21. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 -18, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionalmente administrar uma terapia de radiação, terapia endócrina ou agente citotóxico ao paciente humano.

35 22. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 -18, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o paciente humano é uma fêmea com um ou mais fatores de risco de câncer de mama.

23. Método de tratar ou prevenir câncer de mama ou perda óssea relacionada a câncer de mama, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o método compreende administrar a um sujeito necessitado deste uma quantidade efetiva de um antagonista da ativina ActR11a.

5 24. Método, de acordo com a reivindicação 23, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o antagonista da ativina ActR11a é um polipeptídeo antagonista de ativina ou ActR11a.

25. Método, de acordo com a reivindicação 24, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o antagonista da ativina ActR11a é um anticorpo selecionado do grupo que consiste em:

- a. um anticorpo anti-ativina; e
- b. um anticorpo anti-ActR11a.

10 26. Método, de acordo com a reivindicação 25, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a administração do antagonista da ativina ActR11a causa um atraso no início de ação de câncer de mama, inibe a progressão de câncer de mama, atrasa o princípio de ação de metástase, ou diminui o tamanho do tumor.

15 27. Método, de acordo com a reivindicação 23, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o sujeito é um humano.

28. Método, de acordo com a reivindicação 27, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o humano é uma fêmea com um ou mais fatores de risco de câncer de mama.

20 29. Método, de acordo com a reivindicação 23, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende adicionalmente administrar uma terapia de radiação, terapia endócrina ou agente citotóxico ao sujeito.

30. Método de identificar um agente que é usado para tratar ou prevenir câncer de mama, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o método compreende:

- a. identificar um agente de teste que se liga a um agente de ligação-domínio de ligação de um polipeptídeo ActR11a competitivamente com um agente de ligação ActR11a; e
- 25 b. avaliar o efeito do agente na proliferação ou sobrevivência celular de câncer de mama.

31. Método de inibir sinalização mediada por ativina em um paciente humano com câncer de mama, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o método compreende administrar ao paciente humano uma quantidade efetiva de um antagonista de ativina-ActR11a.

30 32. Método, de acordo com a reivindicação 31, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o antagonista de ativina-ActR11a é um polipeptídeo antagonista da ativina ou ActR11a.

33. Método, de acordo com a reivindicação 32, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o antagonista da ativina ActR11a é um polipeptídeo antagonista da ativina ou ActR11a.

35 34. Método, de acordo com a reivindicação 31, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o antagonista da ativina ActR11a é um anticorpo selecionado do grupo que consiste em:

- a. um anticorpo anti-ativina; e
- b. um anticorpo anti-ActR11a.

35. Método, de acordo com a reivindicação 31, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo antagonista da ativina-ActRIIa é selecionado do grupo que consiste em:

a. um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO:2;

5 b. um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO:3; e

c. um polipeptídeo compreendendo pelo menos 50 aminoácidos consecutivos selecionados de SEQ ID NO: 2.

10 36. Método, de acordo com a reivindicação 31, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o antagonista da polipeptídeo da ativina ActRIIa tem uma ou mais das seguintes características:

i. liga-se a uma agente de ligação de ActRIIa com um K_D de pelo menos 10^{-7} M; e

ii. inibe sinalização de ActRIIa em uma célula.

15 37. Método, de acordo com a reivindicação 35, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o dito antagonista da polipeptídeo da ativina ActRIIa é um proteína de fusão incluindo, além de um domínio polipeptídeo ActRIIa, uma ou mais porções de polipeptídeo que melhoram uma ou mais de estabilidade *in vivo*, meia vida *in vivo*, ingestão/administração, localização ou distribuição de tecido, formação de complexos de proteína e/ou purificação.

20 38. Método, de acordo com a reivindicação 37, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a dita proteína de fusão inclui uma porção de polipeptídeo selecionada do grupo que consiste em: um domínio de imunoglobulina Fc e uma albumina sérica.

25 39. Método, de acordo com a reivindicação 37, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o dito antagonista do polipeptídeo da ativina ActRIIa inclui um ou mais resíduos de aminoácidos modificados selecionados de: um aminoácido glicosilado, um aminoácido PEGuilado, um aminoácido farnesilado, uma aminoácido acetilado, um aminoácido biotinilado, uma aminoácido conjugado a um fração lipídeo, e uma aminoácido conjugado a uma agente de derivatização orgânico.

30 40. Uso de uma proteína de fusão ActRIIa-Fc, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de câncer de mama ou perda óssea relacionada a câncer de mama em um paciente humano.

41. Proteína de fusão ActRIIa-Fc, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que é para uso no tratamento ou prevenção de câncer de mama ou perda óssea relacionada a câncer de mama em um paciente humano.

35 42. Uso de um antagonista da ativina ActRIIa, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de câncer de mama ou perda óssea relacionada a câncer de mama em um sujeito.

43. Antagonista da ativina ActRIIa, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para no tratamento ou prevenção de câncer de mama ou perda óssea relacionada a câncer de mama em um sujeito.

5 44. Uso de um antagonista da ativina ActRIIa, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para inibir sinalização mediada por ativina em um paciente humano com câncer de mama.

45. Antagonista da ativina ActRIIa, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para uso na inibição de sinalização mediada por ativina em um paciente humano com câncer de mama.

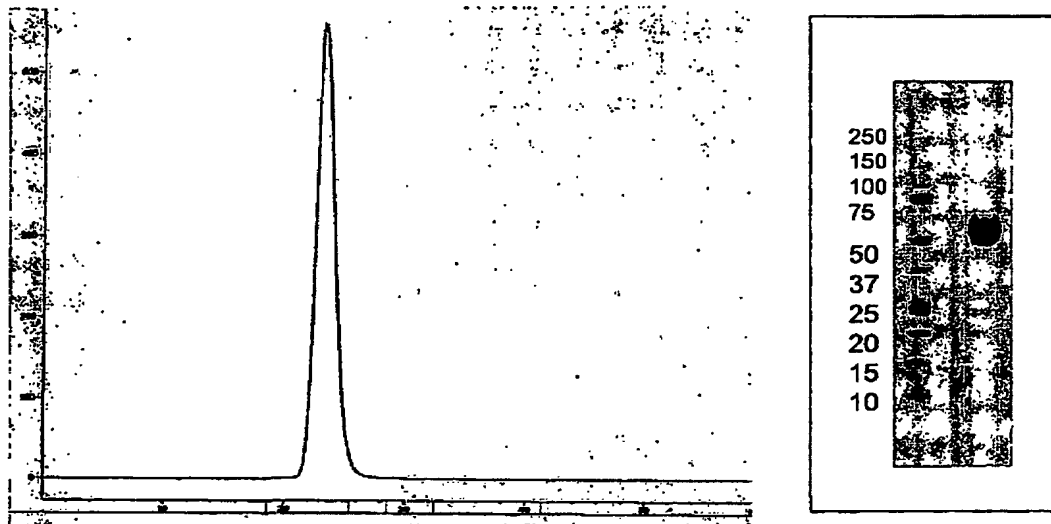


Figura 1

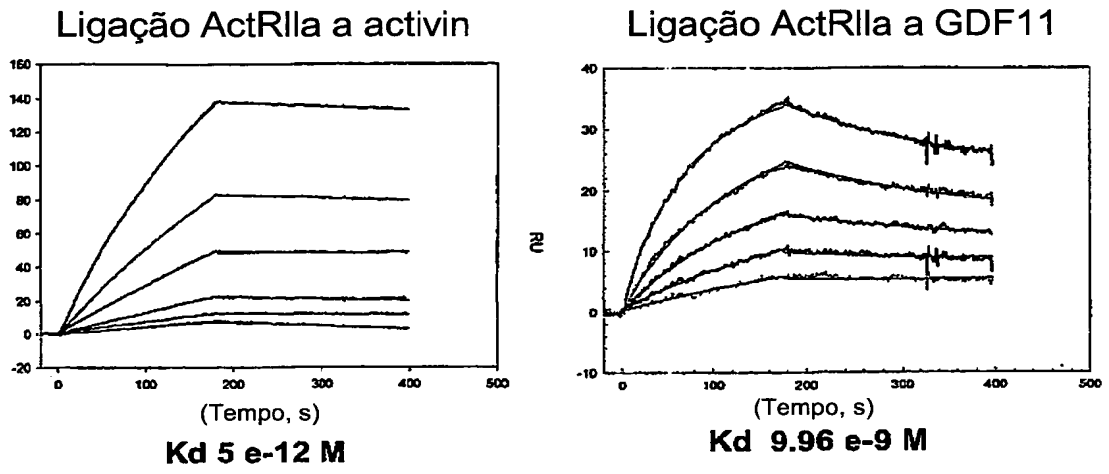
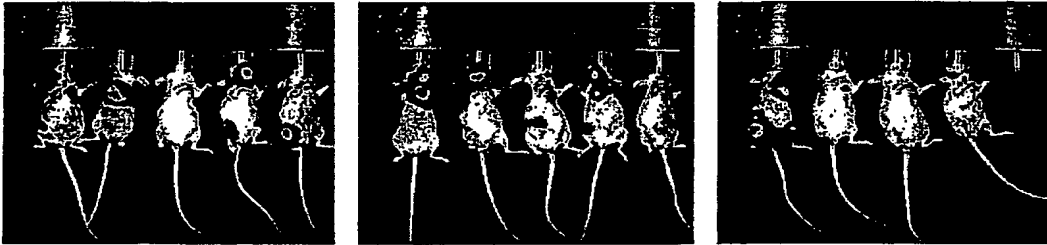


Figura 2

Metástase de câncer de mama (células MDA-MB-231)

Controle PBS (14 camundongos)



Tratamento ActRlla-mFc (12 camundongos)

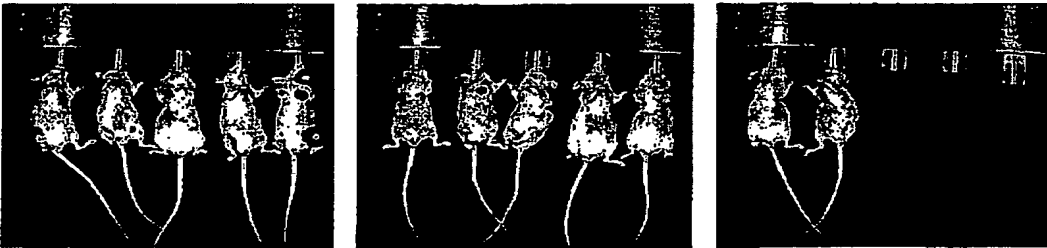


Figura 3

RESUMO

"ANTAGONISTAS DE ATIVINA-ACTRIIA E USOS PARA TRATAR OU PREVENIR CÂNCER DE MAMA"

Em certos aspectos, a presente invenção diz respeito a composições e métodos para tratar ou prevenir câncer de mama.

<110> ACCELERON PHARMA INC.

<120> "ANTAGONISTAS ACTIVINA-ACTRIIA E USOS PARA TRATAMENTO
OU PREVENÇÃO DE CÂNCER DE MAMA"

<130> PHPH-PWO-018

<140> PCT/US2008/001429

<141> 01-02-2008

<150> 60/899,070

<151> 01-02-2007

<150> 61/000,540

<151> 25-10-2007

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 513

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys
1 5 10 15
Ser Ser Gly Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe
20 25 30
Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu
35 40 45
Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp
50 55 60
Lys Asn Ile Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu
65 70 75 80
Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp
85 90 95
Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu
100 105 110
Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn
115 120 125
Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Tyr Tyr Asn Ile Leu Leu Tyr Ser Leu
130 135 140
Val Pro Leu Met Leu Ile Ala Gly Ile Val Ile Cys Ala Phe Trp Val
145 150 155 160
Tyr Arg His His Lys Met Ala Tyr Pro Pro Val Leu Val Pro Thr Gln
165 170 175

Asp Pro Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Leu Gly Leu Lys Pro Leu
 180 185 190

Gln Leu Leu Glu Val Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys
 195 200 205

Ala Gln Leu Leu Asn Glu Tyr Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Ile Gln
 210 215 220

Asp Lys Gln Ser Trp Gln Asn Glu Tyr Glu Val Tyr Ser Leu Pro Gly
 225 230 235 240

Met Lys His Glu Asn Ile Leu Gln Phe Ile Gly Ala Glu Lys Arg Gly
 245 250 255

Thr Ser Val Asp Val Asp Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Glu Lys
 260 265 270

Gly Ser Leu Ser Asp Phe Leu Lys Ala Asn Val Val Ser Trp Asn Glu
 275 280 285

Leu Cys His Ile Ala Glu Thr Met Ala Arg Gly Leu Ala Tyr Leu His
 290 295 300

Glu Asp Ile Pro Gly Leu Lys Asp Gly His Lys Pro Ala Ile Ser His
 305 310 315 320

Arg Asp Ile Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Asn Asn Leu Thr Ala
 325 330 335

Cys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Leu Lys Phe Glu Ala Gly Lys Ser
 340 345 350

Ala Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro
 355 360 365

Glu Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg
 370 375 380

Ile Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Ala Ser Arg
 385 390 395 400

Cys Thr Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu
 405 410 415

Glu Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Asp Met Gln Glu Val Val
 420 425 430

Val His Lys Lys Lys Arg Pro Val Leu Arg Asp Tyr Trp Gln Lys His
 435 440 445

Ala Gly Met Ala Met Leu Cys Glu Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His
 450 455 460

Asp Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Gly Glu Arg Ile Thr
 465 470 475 480

Gln Met Gln Arg Leu Thr Asn Ile Ile Thr Thr Glu Asp Ile Val Thr
 485 490 495

Val Val Thr Met Val Thr Asn Val Asp Phe Pro Pro Lys Glu Ser Ser

<210> 2
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Ile	Leu	Gly	Arg	Ser	Glu	Thr	Gln	Glu	Cys	Leu	Phe	Phe	Asn	Ala	Asn
1				5					10					15	
Trp	Glu	Lys	Asp	Arg	Thr	Asn	Gln	Thr	Gly	Val	Glu	Pro	Cys	Tyr	Gly
			20					25					30		
Asp	Lys	Asp	Lys	Arg	Arg	His	Cys	Phe	Ala	Thr	Trp	Lys	Asn	Ile	Ser
		35					40					45			
Gly	Ser	Ile	Glu	Ile	Val	Lys	Gln	Gly	Cys	Trp	Leu	Asp	Asp	Ile	Asn
	50					55					60				
Cys	Tyr	Asp	Arg	Thr	Asp	Cys	Val	Glu	Lys	Lys	Asp	Ser	Pro	Glu	Val
	65				70					75					80
Tyr	Phe	Cys	Cys	Cys	Glu	Gly	Asn	Met	Cys	Asn	Glu	Lys	Phe	Ser	Tyr
				85					90					95	
Phe	Pro	Glu	Met	Glu	Val	Thr	Gln	Pro	Thr	Ser	Asn	Pro	Val	Thr	Pro
			100					105						110	
Lys	Pro	Pro													
															115

<210> 3
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Ile	Leu	Gly	Arg	Ser	Glu	Thr	Gln	Glu	Cys	Leu	Phe	Phe	Asn	Ala	Asn
1				5					10					15	
Trp	Glu	Lys	Asp	Arg	Thr	Asn	Gln	Thr	Gly	Val	Glu	Pro	Cys	Tyr	Gly
			20					25					30		
Asp	Lys	Asp	Lys	Arg	Arg	His	Cys	Phe	Ala	Thr	Trp	Lys	Asn	Ile	Ser
		35					40					45			
Gly	Ser	Ile	Glu	Ile	Val	Lys	Gln	Gly	Cys	Trp	Leu	Asp	Asp	Ile	Asn
	50					55					60				
Cys	Tyr	Asp	Arg	Thr	Asp	Cys	Val	Glu	Lys	Lys	Asp	Ser	Pro	Glu	Val
	65				70					75					80
Tyr	Phe	Cys	Cys	Cys	Glu	Gly	Asn	Met	Cys	Asn	Glu	Lys	Phe	Ser	Tyr
				85					90					95	

<210> 4
 <211> 1542
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 atgggagctg ctgcaaagtt ggcgtttgcc gtctttctta tctcctgttc ttcagggtgct 60
 atacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 120
 agaaccaatc aaactgggtg tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 180
 tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaacaacag ttgttggtctg 240
 gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta 300
 tatttttggt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg 360
 gaagtacacac agcccacttc aaatccagtt acacctaage caccctatta caacatcctg 420
 ctctattcct tggtgccact tatgttaatt gcggggattg tcatttgtgc attttgggtg 480
 tacaggcatc acaagatggc ctaccctcct gtacttgttc caactcaaga cccaggacca 540
 cccccacctt ctccattact agggttgaaa ccaactgcagt tattagaagt gaaagcaagg 600
 ggaagatttg gttgtgtctg gaaagcccag ttgcttaacg aatatgtggc tgtcaaaata 660
 tttccaatac aggacaaaca gtcattggca aatgaatacg aagtctacag tttgcctgga 720
 atgaagcatg agaacatatt acagttcatt ggtgcagaaa aacgaggcac cagtgttgat 780
 gtggatcttt ggctgatcac agcatttcat gaaaagggtt cactatcaga ctttcttaag 840
 gctaattgtg tctcttgga tgaactgtgt catattgcag aaaccatggc tagaggattg 900
 gcataatttac atgaggatat acctggccta aaagatggcc acaaacctgc catatctcac 960
 agggacatca aaagtaaaaa tgtgctgttg aaaaacaacc tgacagcttg cattgctgac 1020
 tttgggttgg ccttaaaatt tgaggctggc aagtctgcag gcgataccca tggacagggt 1080
 ggtacccgga ggtacatggc tccagaggta ttagagggtg ctataaactt ccaaagggtat 1140
 gcatttttga gtagatgat gtatgccaat ggattagtcc tatgggaact ggcttctcgc 1200
 tgtactgtct cagatggacc tgtagatgaa tacatgttgc cattedgagga ggaaattggc 1260
 cagcatccat ctcttgaaga catgcaggaa gttgttgtgc ataaaaaaaa gaggcctgtt 1320
 ttaagagatt attggcagaa acatgctgga atggcaatgc tctgtgaaac cattgaagaa 1380
 tgtttgggatc acgacgcaga agccaggtta tcagctggat gtgtaggtga aagaattacc 1440
 cagatgcaga gactaacaaa tattattacc acagaggaca ttgtaacagt ggtcacaatg 1500
 gtgacaaatg ttgactttcc tcccaaagaa tctagtctat ga 1542

<210> 5
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 atacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 60
 agaaccaatc aaactgggtg tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 120
 tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaacaacag ttgttggtctg 180
 gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta 240
 tatttttggt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg 300
 gaagtacacac agcccacttc aaatccagtt acacetaagc caccc 345

<210> 6
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da sequência artificial: construção sintética

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (43)
 <223> Asp ou Ala

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (100)
 <223> Lys ou Ala

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (212)
 <223> Asn ou Ala

<400> 6
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 1 5 10 15
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 20 25 30
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Xaa Val Ser His Glu Asp
 35 40 45
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 50 55 60
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 65 70 75 80
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 85 90 95
 Tyr Lys Cys Xaa Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys
 100 105 110
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 115 120 125
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 145 150 155 160
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 165 170 175
 Asp Ser Asp Gly Pro Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 180 185 190
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 195 200 205
 Ala Leu His Xaa His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 210 215 220

Lys
 225

<210> 7
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da sequência artificial: construção sintética

<400> 7
 Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn
 1 5 10 15
 Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly
 20 25 30
 Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser
 35 40 45
 Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn
 50 55 60
 Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val
 65 70 75 80
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr
 85 90 95
 Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro
 100 105 110
 Lys Pro Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 115 120 125
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 130 135 140
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 145 150 155 160
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 165 170 175
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 180 185 190
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 195 200 205
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 210 215 220
 Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 225 230 235 240
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 245 250 255
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 260 265 270

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 275 280 285

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 290 295 300

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 305 310 315 320

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 325 330 335

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340

<210> 8

<211> 21

<212> PRT

<213> Apis mellifera

<400> 8

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
 1 5 10 15

Ser Tyr Ile Tyr Ala
 20

<210> 9

<211> 22

<212> PRT

<213> Organismo Desconhecido

<220>

<223> Descrição do Organismo Desconhecido: Peptídeo ativador de plasminogênio de tecido

<400> 9

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro
 20

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Organismo Desconhecido

<220>

<223> Descrição do Organismo Desconhecido: Peptídeo nativo

<400> 10

Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys
 1 5 10 15

Ser Ser Gly Ala
 20

<210> 11
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<400> 11
 Ile Leu Gly Arg Ser Thr Gln Glu
 1 5

<210> 12
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da sequência artificial: Construção sintética

<400> 12
 Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn
 1 5 10 15
 Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly
 20 25 30
 Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser
 35 40 45
 Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn
 50 55 60
 Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val
 65 70 75 80
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr
 85 90 95
 Phe Pro Glu Met Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 100 105 110
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 115 120 125
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 130 135 140
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 145 150 155 160
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 165 170 175
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 195 200 205

Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 245 250 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 260 265 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 13
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição da sequência artificial: Construção sintética

<400> 13
 Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr
 20 25 30

Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn
 35 40 45

Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His
 50 55 60

Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys
 65 70 75 80

Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys
 85 90 95

Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly
 100 105 110

Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr

	115		120		125														
Gln	Pro	Thr	Ser	Asn	Pro	Val	Thr	Pro	Lys	Pro	Pro	Thr	Gly	Gly	Gly				
	130					135					140								
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro				
145					150					155					160				
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser				
				165					170					175					
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp				
			180					185					190						
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn				
		195					200					205							
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val				
	210					215					220								
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu				
225					230					235					240				
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Val	Pro	Ile	Glu	Lys				
				245					250					255					
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr				
			260					265					270						
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr				
		275					280					285							
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu				
	290					295					300								
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu				
305					310					315					320				
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys				
				325					330					335					
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu				
			340					345					350						
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly				
		355					360					365							

Lys

<210> 14

<211> 1114

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Construção sintética

<400> 14

```

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60
tcgcccggcg cgcctatact tggtagatca gaaactcagg agtgtctttt tttaatgcta 120
attgggaaaa agacagaacc aatcaaactg gtggtgaacc gtggtatggt gacaaagata 180
aacggcggca ttgttttgct acctggaaga atattttctgg ttccattgaa tagtgaaaca 240
aggttggttg ctggatgata tcaactgcta tgacaggact gattgtgtag aaaaaaaga 300
cagccctgaa gtatatttct gttgctgtga gggcaatatg tgtaatgaaa agttttctta 360
ttttccggag atggaagtca cacagcccac ttcaaatcca gttacaccta agccaccac 420
cggtggtgga actcacacat gccacccgtg ccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc 480
agtcttcctc tccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga ccctgaggt 540
cacatgctgt gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt 600
ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac 660
gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta 720
caagtgcag gtctccaaca aagccctccc agtccccatc gagaaaacca tctccaaagc 780
caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac 840
caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt 900
ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc cegtgtgga 960
ctccgacggc tccttcttcc tctatagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca 1020
ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa 1080
gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatgaga attc 1114

```

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<400> 15

```

Thr Gly Gly Gly Gly
  1                               5

```

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<400> 16

```

Ser Gly Gly Gly Gly
  1                               5

```

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Rótulo 6xHis sintético

<400> 17

```

His His His His His His
  1                               5

```