

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035911**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.08.31

(21) Номер заявки
201201199

(22) Дата подачи заявки
2007.12.18

(51) Int. Cl. **C07K 14/475** (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИПЕПТИДА, КОТОРЫЙ ИНГИБИРУЕТ ОПОСРЕДОВАННЫЙ АКТИВИНОМ СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ, В КАЧЕСТВЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

(31) **60/875,682**

(32) **2006.12.18**

(33) **US**

(43) **2013.10.30**

(62) **200970603; 2007.12.18**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АКСЕЛЕРОН ФАРМА ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Шерман Мэттью Л. (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A2-2006012627
WO-A2-2004039948

CORRINE K. WELT et al. Activin: an endocrine or paracrine agent? European Journal of Endocrinology, 1998, Vol. 139, no. 5, с. 469-471

(57) Изобретение относится к применению полипептида, который ингибирует опосредованный активином сигнальный путь, в качестве лекарственного средства для повышения уровня гемоглобина, повышения уровня гематокрита или повышения уровня ретикулоцитов, а также для стимуляции эритропоэза. Кроме того, настоящее изобретение относится к применению полипептида для получения лекарственного средства для повышения уровня гемоглобина, повышения уровня гематокрита или повышения уровня ретикулоцитов у пациента, а также для индукции эритропоэза у пациента. В частности, указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:2, 3, 16, 17, 7, 12, 20 и 21.

B1

035911

035911

B1

Родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной патентной заявки США № 60/875682, поданной 18 декабря 2006 г., которая приведена в настоящем описании в качестве ссылки в полном объеме.

Предпосылки к созданию изобретения

Зрелые красные клетки крови, или эритроциты, ответственны за транспорт кислорода в кровеносной системе позвоночных. Эритроциты несут высокие концентрации гемоглобина, белка, который связывает кислород в легких при относительно высоком парциальном давлении кислорода (pO_2) и доставляет кислород в участки организма с относительно низким pO_2 .

Зрелые эритроциты образуются из плюрипотентных гематопозитических стволовых клеток в процессе, называемом эритропоэзом. В постнатальном периоде у индивидуумов эритропоэз происходит, главным образом, в костном мозге и в красной пульпе селезенки. Координированное действие различных сигнальных путей контролирует баланс клеточной пролиферации, дифференцировки, выживания и гибели. В нормальных условиях эритроциты продуцируются со скоростью, которая поддерживает постоянную массу эритроцитов в организме, и продукция может повышаться или снижаться в ответ на различные стимулы, в том числе повышенное или пониженное напряжение кислорода или потребность тканей. Процесс эритропоэза начинается с образования линии коммитированных клеток-предшественников и проходит через серию различных типов клеток-предшественников. На конечных стадиях эритропоэза образуются ретикулоциты, которые высвобождаются в кровоток и теряют свои митохондрии и рибосомы, приобретая морфологию зрелых эритроцитов. Повышенные уровни ретикулоцитов, или повышенное соотношение ретикулоцит:эритроцит, в крови указывает на увеличенные скорости продукции эритроцитов.

Эритропоэтин (Еро) широко известен как наиболее важный активатор эритропоэза у позвоночных в постнатальном периоде. Еро регулирует компенсаторный эритропоэтический ответ на сниженное напряжение кислорода в тканях (гипоксию) и низкие уровни эритроцитов или низкие уровни гемоглобина. У людей повышенные уровни Еро способствуют образованию эритроцитов, стимулируя образование эритроидных предшественников в костном мозге и селезенке. У мышей Еро усиливает эритропоэз, главным образом, в селезенке.

Различные формы рекомбинантного Еро используются практикующими врачами для повышения уровней эритроцитов в различных клинических ситуациях и, в частности, для лечения анемии. Анемия в широком понимании представляет собой состояние, характеризующееся уровнями гемоглобина или эритроцитов в крови ниже нормы. В некоторых случаях анемия вызвана, прежде всего, нарушением продукции или жизнеспособности эритроцитов. Как правило, чаще анемия развивается на фоне заболеваний других систем (Weatherall & Provan (2000) *Lancet* 355, 1169-1175). Анемия может быть результатом сниженной скорости образования или повышенной скорости разрушения эритроцитов или потерей эритроцитов в результате кровотечения. Анемия может быть результатом целого ряда нарушений, которые, например, включают хроническую почечную недостаточность, миелодиспластический синдром, ревматоидный артрит и трансплантацию костного мозга.

Лечение с использованием Еро обычно вызывает повышение гемоглобина примерно на 1-3 г/дл у здоровых людей в течение нескольких недель. При введении пациентам с анемией этот режим лечения зачастую обеспечивает значительное повышение уровней гемоглобина и эритроцитов и приводит к улучшению качества жизни и продлевает жизнь. Еро не является одинаково эффективным, и многие пациенты являются невосприимчивыми даже к высоким дозам (Horl et al. (2000) *Nephrol Dial Transplant* 15, 43-50). Более 50% пациентов со злокачественными заболеваниями имеют неадекватный ответ на Еро, приблизительно 10% на терминальной стадии заболевания почек имеют низкую реактивность (Glaspy et al. (1997) *J. Clin. Oncol.* 15, 1218-1234; Demetri et al. (1998) *J. Clin. Oncol.* 16, 3412-3425) и менее 10% с миелодиспластическим синдромом реагируют благоприятно (Estey (2003) *Curr Opin Hematol* 10, 60-67). Некоторые факторы, в том числе воспаление, дефицит железа и витаминов, несоответствующий диализ, алюминиевая токсичность и гиперпаратирозидизм, могут давать плохой прогноз терапевтического ответа, молекулярные механизмы резистентности к Еро пока неясны.

Таким образом, целью настоящего изложения является получение альтернативных композиций и способов повышения уровней эритроцитов у пациентов.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к применению полипептида, который ингибирует опосредованный активинном сигнальный путь, в качестве лекарственного средства для повышения уровня гемоглобина, повышения уровня гематокрита или повышения уровня ретикулоцитов, которое включает введение пациенту указанного полипептида, где указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

- a) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:2;
- b) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:3;
- c) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:16; и

d) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:17.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению полипептида, который ингибирует опосредованный активинном сигнальный путь, в качестве лекарственного средства для стимуляции эритропоэза, которое включает введение пациенту указанного полипептида, где указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

- a) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:2;
- b) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:3;
- c) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:16; и
- d) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:17.

В одном из вариантов изобретения полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO:2.

В еще одном варианте полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2.

В предпочтительном варианте указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO:3.

В другом предпочтительном варианте указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3.

Кроме того, в одном из вариантов указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO:16.

В другом варианте указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16.

В еще одном варианте указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO:17.

В другом варианте указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17.

В другом варианте указанный полипептид представляет собой слитый белок, содержащий один или несколько гетерологичных частей, которые улучшают одно или несколько из стабильности *in vivo*, периода полужизни *in vivo*, обратного захвата/введения, локализации или распределения в ткани, образования белковых комплексов и/или очистки.

В одном из таких вариантов указанный слитый белок включает полипептидную часть, выбранную из Fc-домена иммуноглобулина и сывороточного альбумина. Причем Fc-домен иммуноглобулина может представлять собой Fc-домен IgG1.

В одном из вариантов указанный полипептид представляет собой Fc-слитый белок, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из:

- a) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:7;
- b) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:12;
- c) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:20; и
- d) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:21.

Также рассматривается вариант, в котором слитый Fc белок содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO:7.

В другом варианте указанный слитый Fc белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7.

В еще одном варианте указанный слитый Fc белок содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO:12.

В предпочтительном варианте указанный Fc слитый белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

Кроме того, указанный слитый Fc белок может содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO:20.

Также рассматривается вариант, в котором Fc слитый белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20.

Кроме того, указанный слитый Fc белок может содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO:21.

В одном из вариантов осуществления указанный Fc слитый белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21.

В другом варианте осуществления указанный полипептид содержит одну или несколько модифицированных аминокислотных остатков, выбранных из гликозилированной аминокислоты, ПЭГилированной аминокислоты, фарнезилированной аминокислоты, ацетилированной аминокислоты, биотинилированной

аминокислоты, аминокислоты, конъюгированной с липидной частью, и аминокислоты, конъюгированной с органическим средством с функциональными группами.

В одном из вариантов осуществления указанный полипептид имеет одну или несколько следующих характеристик:

- i) связывает лиганд ActRII со значением K_D , равным 10^{-7} ; и
- ii) ингибирует сигнальный путь ActRII в клетке.

В предпочтительном варианте указанный полипептид связывается с активином А.

В другом предпочтительном варианте указанный полипептид вызывает по повышению скелетной мышечной массы у пациента по меньшей мере на 15%.

В одном из вариантов указанное применение предназначено для пациента, страдающего анемией, анемией при множественной миеломе, анемией с миелодиспластическим синдромом, анемией при талассемии, анемией при хронической почечной недостаточности, анемией при острой почечной недостаточности или анемией при конечной стадии почечного заболевания.

В другом варианте применение предназначено для повышения уровня гемоглобина у пациента, уровня гематокрита у пациента или для повышения уровня ретикулоцитов у пациента.

Настоящее изобретение также относится к применению полипептида для получения лекарственного средства для повышения уровня гемоглобина, повышения уровня гематокрита или повышения уровня ретикулоцитов у пациента, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

- a) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90, 95 или 100% идентична SEQ ID NO:2;
- b) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90, 95 или 100% идентична SEQ ID NO:3;
- c) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90, 95 или 100% идентична SEQ ID NO:16;
- d) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90, 95 или 100% идентична SEQ ID NO:17;
- e) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90, 95 или 100% идентична SEQ ID NO:7;
- f) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90, 95 или 100% идентична SEQ ID NO:12;
- g) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90, 95 или 100% идентична SEQ ID NO:20; и
- h) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90, 95 или 100% идентична SEQ ID NO:21.

Настоящее изобретение также относится к применению полипептида для получения лекарственного средства для индукции эритропоэза у пациента, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

- a) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90, 95 или 100% идентична SEQ ID NO:2;
- b) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90, 95 или 100% идентична SEQ ID NO:3;
- c) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90, 95 или 100% идентична SEQ ID NO:16;
- d) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90, 95 или 100% идентична SEQ ID NO:17;
- e) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90, 95 или 100% идентична SEQ ID NO:7;
- f) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90, 95 или 100% идентична SEQ ID NO:12;
- g) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90, 95 или 100% идентична SEQ ID NO:20; и
- h) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90, 95 или 100% идентична SEQ ID NO:21.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана очистка ActRIIa-hFc, экспрессированного в клетках CHO. Очищенный белок виден как одиночный хорошо определенный пик, визуализированный с помощью шкалы с размерами (левая панель) и окрашенный Кумасси SDS-PAGE (правая панель) (левая дорожка: стандарты молекулярной массы; правая дорожка: ActRIIa-hFc).

На фиг. 2 показано связывание ActRIIa-hFc с активином и GDF-11 по данным анализа BiaCore™.

На фиг. 3 показано действие ActRIIa-hFc на число эритроцитов у самок нечеловекообразных приматов. Самкам яванских макаков (четыре группы по пять обезьян в каждой) вводили плацебо или 1, 10 или 30

мг/кг ActR1Ia-hFc на 0, 7, 14 и 21 день. На фиг. 3А показаны количества эритроцитов (RBC). На фиг. 3В показаны уровни гемоглобина. Статистическая значимость относительно фонового значения для каждой группы лечения. На 57 день в каждой группе осталось две обезьяны.

На фиг. 4 показано действие ActR1Ia-hFc на количество эритроцитов у самцов нечеловекообразных приматов. Самцам яванских макаков (четыре группы по пять обезьян в каждой) вводили плацебо или 1, 10 или 30 мг/кг ActR1Ia-hFc на 0, 7, 14 и 21 день. На фиг. 4А показаны количества эритроцитов (RBC). На фиг. 4В показаны уровни гемоглобина. Статистическая значимость относительно фонового значения для каждой группы лечения. На 57 день в каждой группе осталось две обезьяны.

На фиг. 5 показано действие ActR1Ia-hFc на количество ретикулоцитов у самок нечеловекообразных приматов. Яванским макакам (четыре группы по пять обезьян в каждой) вводили плацебо или 1, 10 или 30 мг/кг ActR1Ia-hFc на 0, 7, 14 и 21 день. На фиг. 5А показаны абсолютные количества ретикулоцитов. На фиг. 5В показан процентный состав ретикулоцитов относительно RBC. Статистическая значимость относительно фонового значения для каждой группы. На 57 день в каждой группе осталось две обезьяны.

На фиг. 6 показано действие ActR1Ia-hFc на количество ретикулоцитов у самок нечеловекообразных приматов. Яванским макакам (четыре группы по пять обезьян в каждой) вводили плацебо или 1, 10 или 30 мг/кг ActR1Ia-hFc на 0, 7, 14 и 21 день. На фиг. 6А показаны абсолютные количества ретикулоцитов. На фиг. 6В показан процентный состав ретикулоцитов относительно RBC. Статистическая значимость относительно фонового значения для каждой группы. На 57 день в каждой группе осталось две обезьяны.

На фиг. 7 показаны результаты клинического испытания у людей, описанного в примере 5, где площадь под кривой (AUC) и введенная доза ActR1Ia-hFc имеют линейную корреляцию, независимо от того, вводили ли ActR1Ia-hFc внутривенно (IV) или подкожно (SC).

На фиг. 8 показано сравнение сывороточных уровней ActR1Ia-hFc у пациентов, которым препарат вводили IV или SC.

На фиг. 9 показаны уровни щелочной фосфатазы костной ткани (BAP) в ответ на различные уровни доз ActR1Ia-hFc. BAP является маркером анаболического роста костей.

На фиг. 10 представлено среднее изменение от фоновых уровней гематокрита в результате клинического испытания у людей, описанного в примере 5. ActR1Ia-hFc вводили внутривенно (IV) в указанной дозе.

На фиг. 11 представлено среднее изменение от фоновых уровней гемоглобина в результате клинического испытания у людей, описанного в примере 5. ActR1Ia-hFc вводили внутривенно (IV) в указанной дозе.

На фиг. 12 представлено среднее изменение от фонового количества RBC (эритроцитов) в результате клинического испытания у людей, описанного в примере 5. ActR1Ia-hFc вводили внутривенно (IV) в указанной дозе.

На фиг. 13 представлено среднее изменение от фонового количества ретикулоцитов в результате клинического испытания у людей, описанного в примере 5. ActR1Ia-hFc вводили внутривенно (IV) в указанной дозе.

Подробное описание изобретения

1. Обзор.

Суперсемейство трансформирующего фактора роста бета (TGF-бета) содержит целый ряд факторов роста, которые имеют общие элементы в последовательности и общие структурные мотивы. Известно, что эти белки оказывают свои биологические действия на большое количество различных клеточных типов как позвоночных, так и беспозвоночных. Представители этого суперсемейства выполняют важные функции в процессе эмбрионального развития при формировании структур и специализации тканей и могут влиять на целый ряд процессов дифференцировки, в том числе адипогенез, миогенез, хондрогенез, кардиоогенез, гематопоз, нейрогенез и дифференцировку эпителиальных клеток. Семейство разделяют на две основные ветви: BMP/GDF и TGF-бета/активин/BMP10 ветви, представители которых оказывают различные, зачастую комплементарные эффекты. Воздействуя на активность представителя семейства TGF-бета, как правило, можно вызывать значительные физиологические изменения в организме. Например, пьемонтские и бельгийские голубые породы скота несут мутацию с потерей функции в гене GDF8 (также называемом миостатином), что вызывает заметное прибавление мышечной массы (Grobet et al., Nat Genet. 1997, 17(1):71-4). Более того, у людей неактивные аллели GDF8 связаны с повышенной мышечной массой и, по имеющимся сведениям, необыкновенной силой (Schuelke et al., N Engl J Med 2004, 350:2682-8).

Активины представляют собой димерные полипептидные факторы роста, которые относятся к суперсемейству TGF-бета. Существует три основных формы активина (А, В и АВ), которые являются гомо/гетеродимерами двух близкородственных субъединиц β ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$ и $\beta_A\beta_B$ соответственно). Геном человека также кодирует активин С и активин Е, которые, главным образом, экспрессируются в печени, и также известны гетеродимерные формы, содержащие β_C или β_E . В суперсемействе TGF-бета активины являются уникальными и многофункциональными факторами, которые могут стимулировать выработку гормонов в овариальных и плацентарных клетках, обеспечивать выживание нейрональных клеток, вли-

ять на развитие клеточного цикла положительно или отрицательно в зависимости от типа клеток и индуцировать мезодермальную дифференцировку по меньшей мере у эмбрионов амфибий (DePaolo et al., 1991, Proc Soc Exp Biol Med. 198:500-512; Dyson et al., 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963). Более того, было обнаружено, что эритроидный фактор дифференцировки (EDF), выделенный из стимулированных моноцитарных лейкозных клеток человека, идентичен активину А (Murata et al., 1988, PNAS, 85:2434). Было высказано предположение, что активин А способствует эритропоэзу в костном мозге. В некоторых тканях антагонистическое действие на активиновый путь передачи сигнала оказывает родственный ему гетеродимер ингибин. Например, во время высвобождения фолликулостимулирующего гормона (FSH) из гипофиза, активин способствует секреции и синтезу FSH, тогда как ингибин препятствует секреции и синтезу FSH. К другим белкам, которые могут регулировать биологическую активность активина и/или связываться с активином, относятся фоллистатин (FS), белок, родственник фоллистатину (FSRP), и α_2 -макроглобулин.

Сигналы TGF- β опосредуются гетеромерными комплексами серин/треонинкиназных рецепторов I и II типа, которые затем фосфорилируют и активируют белки Smad при лигандной стимуляции (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178). Эти рецепторы I и II типа являются трансмембранными белками, состоящими из лигандсвязывающего внеклеточного домена с богатой цистеином областью, трансмембранного домена и цитоплазматического домена с ожидаемой специфичностью серин/треонин. Рецепторы I типа необходимы для передачи сигнала; а рецепторы II типа необходимы для связывания лигандов и для экспрессии рецепторов I типа. Рецепторы активина I и II типа образуют стабильный комплекс после связывания с лигандом, что приводит к фосфорилированию рецепторов I типа рецепторами II типа.

Два родственных рецептора II типа (ActRII), ActRIIa и ActRIIb, были идентифицированы как рецепторы II типа активинов (Mathews and Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano et al., 1992, Cell 68:97-108). Кроме активинов ActRIIa и ActRIIb могут биохимически взаимодействовать с некоторыми другими белками семейства TGF- β , в том числе BMP7, Nodal, GDF8 и GDF11 (Yamashita et al., 1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee and McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311; Yeo and Whitman, 2001, Mol. Cell 7:949-957; Oh et al., 2002, Genes Dev. 16:2749-54). Рецептор ALK4 является основным рецептором I типа активинов, в частности активина А, а рецептор ALK-7 может служить рецептором активинов, также как и, в частности, активина В.

Как показано в настоящем описании, растворимый полипептид ActRIIa (sActRIIa), который обладает значительным селективным связыванием с активином А в отличие от других представителей семейства TGF-бета, таких как GDF8 или GDF11, является эффективным для увеличения уровней эритроцитов *in vivo*. Не связываясь с каким-либо конкретным механизмом, предполагают, что эффект sActRIIa обусловлен, прежде всего, действием антагонистов активина, обеспечивая очень сильное связывание активина (пикомолярная константа диссоциации), что показано для конкретной конструкции sActRIIa, используемой в этих исследованиях. Независимо от механизма из описания видно, что антагонисты активина-ActRIIa повышают уровни эритроцитов у грызунов, обезьян и людей. Следует отметить, что гематопоз является сложным процессом, регулируемым целым рядом факторов, в том числе эритропоэтином, G-CSF и гомеостазом железа. Термины "повышать уровни эритроцитов" и "способствовать образованию эритроцитов" относятся к клинически значимым показателям, таким как гематокрит, подсчет количества эритроцитов и определение гемоглобина, и их следует считать нейтральными в отношении механизма, с которым происходят такие изменения.

Так же, как показано в описании, растворимый полипептид ActRIIb (sActRIIb) эффективно повышает уровни ретикулоцитов *in vivo*, действие которых, как ожидается, через более длительный период времени приводит к повышению уровней гематокрита.

Приведенные в настоящем описании данные в отношении нечеловекообразных приматов также воспроизводятся у мышей, крыс и людей, и, следовательно, в этом описании представлены способы применения полипептидов ActRII и других антагонистов активин-ActRII для стимуляции образования эритроцитов и повышения уровней эритроцитов у млекопитающих от грызунов до людей. Антагонисты активин-ActRII включают, например, активинсвязывающие растворимые полипептиды ActRIIa, активинсвязывающие растворимые полипептиды ActRIIb, антитела, которые связываются с активином (в частности, А или В субъединицами активина, также называемыми β A или β B) и нарушают ActRIIa и/или ActRIIb связывание, антитела, которые связываются с ActRIIa и нарушают связывание с активином, антитела, которые связываются с ActRIIb и нарушают связывание с активином, белки, не являющиеся антителами, выбранные для связывания с активином, ActRIIb или ActRIIa (см., например, WO 2002/088171, WO 2006/055689 и WO 2002/032925 в качестве примеров таких белков и способов их создания и выбора), рандомизированные пептиды, выбранные для связывания с активином, ActRIIb или ActRIIa, зачастую присоединенные к домену Fc. Два различных белка (или их части), обладающие связывающей активностью с активином, ActRIIb или ActRIIa, особенно вещества, связывающиеся с активином, которые блокируют I тип (например, растворимый рецептор активина I типа) и II тип (например, растворимый рецептор активина II типа) сайтов связывания соответственно, могут быть соединены вместе с образованием

бифункциональной связывающей молекулы. Аптамеры нуклеиновых кислот, малые молекулы и другие вещества, которые ингибируют сигнальную ось активин-ActRII, включены в качестве антагонистов активин-ActRII. Различные белки обладают антагонистической активностью в отношении активин-ActRII, в том числе ингибин (т.е. альфа субъединица ингибина), хотя ингибин не является универсальным антагонистом активина во всех тканях, фоллистатин (например, фоллистатин-288 и фоллистатин-315), FSRP, активин С, альфа(2)-макроглобулин и M108A (замена метионина на аланин в положении 108) мутантный активин А. В основном альтернативные формы активина, в частности формы с изменениями в связывающем домене рецепторов I типа, могут связываться с рецепторами II типа и не смогут образовывать активный тройной комплекс, таким образом, действуя как антагонисты. Дополнительно, нуклеиновые кислоты, такие как антисмысловые молекулы, siРНК или рибозимы, которые ингибируют активин А, В, С или Е, или, в частности, экспрессию ActRIIa или ActRIIb, могут быть использованы в качестве антагонистов активин-ActRII. Используемый антагонист активин-ActRII может проявлять селективность в отношении ингибирования опосредованного активинном сигнального пути по сравнению с другими представителями семейства TGF-бета и, в частности, в отношении GDF8 и GDF11.

Термины, используемые в настоящем описании, в основном имеют обычные в данной области значения в контексте настоящего изобретения и в особом контексте, в котором используется каждый термин. Некоторые термины определены ниже в другом месте описания для дополнительных инструкций практикующему специалисту при описании композиций и способов по изобретению и по получению и применению их. Объем или значение любого используемого термина будет очевиден из конкретного контекста, в котором этот термин используется.

"Примерно" и "приблизительно" в основном означает приемлемую степень ошибки для количества, определенного заданным типом или точностью. Обычно примеры степени ошибки находятся в пределах 20%, предпочтительно в пределах 10% и более предпочтительно в пределах 5% от заданного значения или интервала значений.

Альтернативно и в особенности в биологических системах термины "примерно" и "приблизительно" могут означать величины, которые находятся в пределах порядка величины, предпочтительно 5-кратного и более предпочтительно 2-кратного от заданного значения. Численные количества, данные в настоящем описании, являются приблизительными, если не указано иного, означая, что термин "примерно" или "приблизительно" может подразумеваться, если не указано специально.

Способы по изобретению могут включать стадии сравнения последовательностей друг с другом, в том числе сравнения последовательности дикого типа с одной или несколькими мутантными (вариантами последовательности). Такое сравнение обычно предусматривает выравнивания полимерных последовательностей, например, используя программы выравнивания последовательностей и/или алгоритмы, которые хорошо известны из уровня техники (например, BLAST, FASTA и MEGALIGN и так далее). Специалисту в данной области будет понятно, что в таких выравниваниях, где мутация содержит вставку остатка или делецию, выравнивание последовательности будет вводить "пропуск" (обычно представленный тире или "A") в полимерной последовательности, не содержащей вставочный или делеционный остаток.

"Гомологичный" во всех его грамматических формах и вариантах толкования относится к родству между двумя белками, которые имеют "эволюционно общее происхождение", в том числе к белкам из суперсемейства одних и тех же видов организма, а также к гомологичным белкам из различных видов организма. Такие белки (и кодирующие их нуклеиновые кислоты) обладают гомологией последовательностей, что отражается в сходстве их последовательностей, в виде процента идентичности или наличием специфических остатков или мотивов и консервативных положений.

Термин "сходство последовательностей" во всех грамматических формах относится к степени идентичности или соответствия между последовательностями нуклеиновых кислот или аминокислот, которые могут иметь или не иметь эволюционно общее происхождение.

Однако в обычном употреблении в настоящей заявке термин "гомологичный" при модификации, таким наречием как "высоко", может относиться к сходству последовательностей и может относиться или не относиться к эволюционно общему происхождению.

2. Полипептиды ActRII.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к полипептидам ActRII. Используемый в настоящем описании термин "ActRII" относится к семейству рецепторов активина II типа. Это семейство включает как рецептор активина IIa типа, так и рецептор активина IIb типа.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к полипептидам ActRIIa. Используемый в настоящем описании термин "ActRIIa" относится к белкам семейства рецепторов активина IIa типа (ActRIIa) любых видов и вариантов, полученных из таких белков ActRIIa мутагенезом или другой модификацией. Под ссылкой на ActRIIa в настоящем описании следует понимать любую из идентифицированных на настоящий момент форм. Представители семейства ActRIIa в основном представляют собой трансмембранные белки, состоящие из лигандсвязывающего внеклеточного домена с богатой цистеином областью, трансмембранного домена и цитоплазматического домена с ожидаемой серин/треонинкиназной активностью.

Термин "полипептид ActRIIa" включает полипептиды, содержащие любой природный полипептид представителей семейства ActRIIa, а также любой их вариант (в том числе мутанты, фрагменты, слияния и пептидомиметические формы), который сохраняет полезную активность (см., например, WO 2006/012627). Например, полипептиды ActRIIa включают в себя полипептиды, полученные из последовательности любого известного ActRIIa, имеющего последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80% идентична последовательности полипептида ActRIIa и, оптимально, идентична по меньшей мере на 85, 90, 95, 97, 99% или более. Например, полипептид ActRIIa по изобретению может связываться и ингибировать функцию белка ActRIIa и/или активин. Полипептид ActRIIa может быть выбран по активности в стимуляции образования эритроцитов *in vivo*. Примеры полипептидов ActRIIa включают полипептид-предшественник ActRIIa человека (SEQ ID NO:1) и растворимые полипептиды ActRIIa человека (например, SEQ ID NO:2, 3, 7 и 12).

Последовательность белка-предшественника ActRIIa человека представляет собой

MGAAAKLAFVFLISCSGATLGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRR
 HCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEME
 VTQPTSNPVTPKPPYYNILLYSLVPLMLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPVLPVPTQDPGPPPPS
 PLLGLKPLQLLEVKARGRFQCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKHENIL
 QFIGAEKRGTSDVDLWLI TAFHEKGSLSDFLKVNSVSWNELCHIAETMARGLAYLHEDIPGL
 KDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFLGALKFEAGKSAGDTHGQVGTTRYMAPEVLEG
 AINFQDAFLRIDMYAMGLVLWELASRCTAADGPVDEYMLPFEEIEIGQHPSLQEDMVEVVKK
 KRPVLRDYQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMQRLTNIIITTEDIVTVVT
 MVTNVDFPPKESL (SEQ ID NO: 1).

Сигнальный пептид подчеркнут одной чертой; внеклеточный домен выделен жирным шрифтом, и возможные N-связанные сайты гликозилирования подчеркнуты двойной чертой.

Растворимая (внеклеточная) процессированная полипептидная последовательность ActRIIa человека представляет собой

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGC
 WLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ
 ID NO: 2).

Концевой фрагмент на С-конце внеклеточного домена подчеркнут. Последовательность с делецированным "концевым фрагментом" (последовательность Δ15) представляет собой

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGC
 WLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM (SEQ ID NO:3).

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-предшественник ActRIIa человека, представляет собой (нуклеотиды 164-1705 входящий номер Genbank_NM 001616)

ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGCCGCTTTCTTATCTCCTGTCTTTCAGGTG
 CTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACA
 GAACCAATCAAAGTGGTGTGAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTG
 CTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCATTGAAATAGTGAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATA
 TCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTTGT
 GCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTCTTATTTCCAGAGATGGAAGTCACACAGC
 CCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCATTTACAACATCCTGCTCTATTCCTTGGTGC
 CACTTATGTTAATTGCGGGGATTTGTCATTTGTGCATTTGGGTGTACAGGCATCACAAGATGG
 CCTACCCCTCTGTACTTGTCCAACCTCAAGACCCAGGACCACCCCACTTCTCCATTACTAG
 GGTGAAACCACTGCAGTTATTAGAAGTGAAGCAAGGGGAAGATTTGGTTGTCTGGAAAG
 CCCAGTTGCTTAAACGAATATGTGGCTGTCAAAATATTTCCAATACAGGACAAACAGTCATGGC
 AAAATGAATACGAAGTCTACAGTTTGCCTGGAATGAAGCATGAGAACATATTACAGTTCATTG
 GTGCAGAAAAACGAGGCACCAAGTGTGATGTGGATCTTTGGCTGATCACAGCATTTTCATGAAA
 AGGGTTCACATCAGACTTTCTTAAGGCTAATGTGGTCTCTTGGAAATGAACTGTGTCATATTG
 CAGAAACCATGGCTAGAGGATTTGGCATATTTACATGAGGATATACCTGGCCTAAAAGATGGCC
 ACAACCTGCCATATCTCACAGGGACATCAAAAGTAAAATGTGCTGTTGAAAAACAACCTGA

CAGCTTGCATTGCTGACTTTGGGTTGGCCTTAAAATTTGAGGCTGGCAAGTCTGCAGGCGATA
 CCCATGGACAGGTTGGTACCCGGAGGTACATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTGTATAAACT
 TCCAAAGGGATGCATTTTTGAGGATAGATATGTATGCCATGGGATTAGTCTATGGGAAGTGG
 CTTCTCGTGTACTGCTGCAGATGGACCTGTAGATGAATACATGTTGCCATTTGAGGAGGAAA
 TTGGCCAGCATCCATCTCTTGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGTGCATAAAAAAAGAGGCGCTG
 TTTAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGAATGGCAATGCTCTGTGAAACCATGAAGAAT
 GTTGGGATCACGACGCAGAAGCCAGGTTATCAGCTGGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGA
 TGCAGAGACTAACAAATATTATTACCACAGAGGACATGTAACAGTGGTCACAAATGGTGACAA
 ATGTTGACTTTCTCCAAAGAATCTAGTCTATGA (SEQ ID NO: 4).

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей растворимый (внеклеточный) полипептид ActRIIa человека, представляет собой

ATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAG
 ACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGTAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTT
 TTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCATTGAAATAGTGAACAAGGTTGTTGGCTGGATG
 ATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTTT
 GTTGTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTATTTTCCAGAGATGGAAGTCACAC
 AGCCCACTTCAAATCCAGTTACACSTAAGCCACCC (SEQ ID NO: 5).

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к полипептидам ActRIIb. Используемый в настоящем описании термин "ActRIIb" относится к белкам семейства рецепторов активина IIb типа (ActRIIb) любых видов и вариантов, полученных из таких белков ActRIIb мутагенезом или другой модификацией. Под ссылкой на ActRIIb в настоящем изобретении понимается ссылка на любую из идентифицированных на настоящий момент форм. Представители семейства ActRIIb в основном представляют собой трансмембранные белки, состоящие из лигандсвязывающего внеклеточного домена с богатой цистеином областью, трансмембранного домена и цитоплазматического домена с ожидаемой серин/треонинкиназной активностью.

Термин "полипептид ActRIIb" включает полипептиды, содержащие любой природный полипептид представителей семейства ActRIIb, а также любой их вариант (в том числе мутанты, фрагменты, слияния и пептидомиметические формы), который сохраняет полезную активность (см., например, WO 2006/012627). Например, полипептиды ActRIIb включают полипептиды, полученные из последовательности, любого известного ActRIIb с последовательностью, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности полипептида ActRIIb и, необязательно, идентична по меньшей мере на 85, 90, 95, 97, 99% или более. Например, полипептид ActRIIb по изобретению может связываться и ингибировать функцию белка ActRIIb и/или активина. Полипептид ActRIIb может быть выбран по активности стимуляции образования эритроцитов *in vivo*. Примеры полипептидов ActRIIb включают полипептид-предшественник ActRIIb человека (SEQ ID NO:15) и растворимые полипептиды ActRIIb человека (например, SEQ ID NO:16, 17, 20 и 21).

Последовательность белка-предшественника ActRIIb человека представляет собой

MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAETRECIYYANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLH
 CYASWANNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGG
 PEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIGLSLIVLLAFWYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPSPL
 VGLKPLQLLEIKARGRFGCVWKAQLMNDFAVVKIFPLQDKQSQSREIFSTPGMKHENLLQF
 IAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGKNIITWNECHVAETMSRGLSYLHEDVPWCRG
 EGHKPSIAHRDFKSKNVLKSDLTAVLADFLAVRFEFGKPPGDTHGQVGTTRRYMAPEVLEGA
 INFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSSLEELQEVVHKKM
 RPTIKDHWLKHPLAQLCVTTEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTSDCLVSLVTS
 VTNVDLPPKESSI (SEQ ID NO: 15).

Сигнальный пептид подчеркнут одной чертой, внеклеточный домен выделен жирным шрифтом, и возможные N-связанные сайты гликозилирования показаны в квадратиках.

Растворимая (внеклеточная) процессированная полипептидная последовательность ActRIIb человека представляет собой

SGRGEAETRECIYYANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKG
 CWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ
 ID NO: 16).

Концевой фрагмент на С-конце внеклеточного домена подчеркнут. Последовательность с делецированным "концевым фрагментом" (последовательность Δ15) представляет собой:

SGRGEAETRECIYYANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKG
 CWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (SEQ ID NO: 17).

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-предшественник ActRIIb человека, представляет собой (нуклеотиды 5-1543 входящий номер Genbank NM_001106):

```
ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGGCCCGGCTCTG
GGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCAACTGGGAGCTGGAGCGCA
CCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGTACGCCT
CCTGGGCCAACAGCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGTGGCTAGATGACTTCA
ACTGTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTACTTCTGCTGCT
GTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTTGCCAGAGGCTGGGGGCCGGAGTCA
CGTACGAGCCACCCCGACAGCCCCACCCCTGCTCACGGTGTGGCTACTCACTGTGCCCA
TCGGGGGCCTTTCCCTCATCGTCTGCTGGCCTTTTGGATGTACCGGCATCGCAAGCCCCCT
ACGGTTCATGTGGACATCCATGAGGACCCCTGGGCCTCCACCACCATCCCTCTGGTGGGCCTGA
AGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAAGGCTCGGGGGCGCTTTGGCTGTGTCTGGAAGGCCAGC
TCATGAATGACTTTGTAGCTGTCAAGATCTTCCCACTCCAGGACAAGCAGTGTGGCAGAGTG
AACGGGAGATCTTCAGCACACTGGCATGAAGCACGAGAACCTGCTACAGTTCATTGCTGCCG
AGAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAGCTGTGGCTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCT
CCCTCACGGATTACCTCAAGGGGAACATCATCACATGGAACGAACGTGTGCATGTAGCAGAGA
CGATGTCACGAGGCCTCTCATACTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGGCGTGGCGAGGGCCACA
AGCCGCTATATGCCACAGGACTTTAAAAGTAAGAATGTATTGCTGAAGAGCGACCTCACAG
CCGTGCTGGCTGACTTTGGCTTGGCTGTTCGATTTGAGCCAGGGAAACCTCCAGGGGACACCC
ACGGCAGGTTAGGCACGAGACGGTACATGGCTCCTGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTTCC
AGAGAGATGCCTTCTGCGCATTGACATGTATGCCATGGGGTTGGTGTGTGGGAGCTTGTGT
CTCGTGCAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATGAGTACATGCTGCCCTTTGAGGAAGAGATTG
GCCAGACCCCTTCGTTGGAGGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTGCACAAGAAGATGAGGCCACCA
TTAAAGATCACTGGTTGAAACACCCGGGCTGGCCAGCTTTGTGTGACCATCGAGGAGTGT
GGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTGTCCGCGGGCTGTGTGGAGGAGCGGGTGTCCCTGATTC
GGAGGTCGGTCAACGGCACTACCTCGGACTGTCTCGTTTCCCTGGTACCTCTGTCCACCAATG
TGGACCTGCCCCCTAAAGAGTCAAGCATCTAA (SEQ ID NO: 18).
```

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей растворимый (внеклеточный) полипептид ActRIIa человека, представляет собой

```
TCTGGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCAACTGGGAGC
TGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACT
GCTACGCCTCCTGGGCCAACAGCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGTGGCTAG
ATGACTTCAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTACT
TCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTTGCCAGAGGCTGGGGGCC
CGGAAGTACGATACGAGCCACCCCGACAGCCCCACC (SEQ ID NO: 19).
```

В особом варианте осуществления изобретение относится к растворимым полипептидам ActRII. Как описано в настоящем описании, термин "растворимый полипептид ActRII" относится к полипептидам, содержащим внеклеточный домен белка ActRIIa или ActRIIb. Термин "растворимый полипептид ActRII", используемый в настоящем описании, включает любой природный внеклеточный домен белка ActRIIa или ActRIIb, а также любые их варианты (в том числе мутанты, фрагменты и пептидомиметические формы). Активинсвязывающий полипептид ActRII представляет собой полипептид, который сохраняет способность связываться с активином, в том числе, например, активином AA, AB, BB или формами, которые содержат субъединицу C или E. Необязательно, активинсвязывающий полипептид ActRII будет связываться с активином AA с константой диссоциации 1 нМ или менее. Внеклеточный домен белка ActRII связывается с активином и в основном является растворимым и, следовательно, может быть назван растворимым активинсвязывающим полипептидом ActRII. Примеры растворимых активин-связывающих полипептидов ActRIIa включают в себя растворимые полипептиды, показанные в последовательностях SEQ ID NO:2, 3, 7, 12 и 13. SEQ ID NO:7 относится к ActRIIa-hFc и дополнительно описана в разделе "Примеры". Другие примеры растворимых активинсвязывающих полипептидов ActRIIa содержат сигнальную последовательность в дополнение к внеклеточному домену белка ActRIIa, например лидерную последовательность меллитина медоносной пчелы (SEQ ID NO:8), активатора тканевого плазминогена (TPA) (SEQ ID NO:9) или нативную лидерную последовательность ActRIIa (SEQ ID NO:10). В полипептиде ActRIIa-hFc, проиллюстрированном в последовательности SEQ ID NO:13, используется лидерная последовательность TPA. Примеры растворимых активинсвязывающих полипептидов ActRIIb включают растворимые полипептиды, проиллюстрированные в последовательностях SEQ ID NO:16, 17, 20. Активинсвязывающие полипептиды ActRIIb также могут содержать сигнальную последовательность в допол-

нение к внеклеточному домену белка ActRIIb, например лидерную последовательность меллитина медоносной пчелы (SEQ ID NO:8) или лидерную последовательность активатора тканевого плазминогена (TPA) (SEQ ID NO:9).

Функционально активные фрагменты полипептидов ActRII могут быть получены скринингом полипептидов, полученных рекомбинантными способами из соответствующего фрагмента нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид ActRII. Кроме того, фрагменты могут быть синтезированы химическим путем методиками, известными из уровня техники как общепринятые, твердофазным пептидным синтезом по Меррифилду f-Мос или t-Вос. Фрагменты могут быть получены (рекомбинантными способами или химическим синтезом) и протестированы для идентификации тех пептидных фрагментов, которые могут действовать в качестве антагонистов (ингибиторов) белка ActRII или путей передачи сигнала, опосредованных активином.

Функционально активные варианты полипептидов ActRII могут быть получены скринингом библиотек модифицированных полипептидов, полученных рекомбинантными способами из соответствующих нуклеиновых кислот, подвергнутых мутагенезу, кодирующих полипептид ActRII. Варианты могут быть получены и протестированы для идентификации тех, которые могут действовать в качестве антагонистов (ингибиторов) белка ActRII или путей передачи сигнала, опосредованных активином. В некоторых вариантах осуществления функционально активный вариант полипептидов ActRIIa содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из последовательностей SEQ ID NO:2 или 3. В некоторых случаях аминокислотная последовательность функционально активного варианта по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из последовательностей SEQ ID NO:2 или 3. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность функционально активного варианта полипептидов ActRIIb по меньшей мере на 75% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из последовательностей SEQ ID NO:16 или 17. В некоторых случаях аминокислотная последовательность функционально активного варианта по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из последовательностей SEQ ID NO:17 или 18.

Функционально активные варианты могут быть получены модификацией структуры полипептида ActRII для таких целей, как усиление терапевтической эффективности или стабильности (например, срока годности *ex vivo* и резистентность к протеолитическому расщеплению *in vivo*). Такие модифицированные полипептиды ActRII при отборе по сохранению связывания с активином рассматриваются как функциональные эквиваленты природных полипептидов ActRII. Модифицированные полипептиды ActRII также могут быть получены, например, путем аминокислотной замены, делеции или добавления. Например, логично предположить, что выделенная замена лейцина на изолейцин или валин, аспартата на глутамин, треонина на серин или аналогичная замена аминокислоты структурно родственной аминокислотой (например, консервативные мутации) не окажут значительного воздействия на биологическую активность полученной в результате молекулы. Консервативными заменами являются замены, которые имеют место в пределах семейства аминокислот, которые родственны по боковым цепям. Приводит ли изменение ли аминокислотной последовательности полипептида ActRII к функциональной гомологии, можно легко определить, оценивая способность варианта полипептида ActRII вызывать ответ в клетках, аналогичный ответу полипептида ActRII дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении рассматриваются специфические мутации полипептидов ActRII для изменения гликозилирования этого полипептида. Такие мутации могут быть выбраны для введения или элиминации одного или нескольких сайтов гликозилирования, таких как O-связанные или N-связанные сайты гликозилирования. Сайты распознавания аспарагинсвязанного гликозилирования в основном содержат трипептидную последовательность, аспарагин-X-треонин или аспарагин-X-серин (где "X" представляет собой любую аминокислоту), которая специфически распознается соответствующими клеточными ферментами гликозилирования. Изменение также может осуществляться путем добавления или замены одного или нескольких остатков серина или треонина к последовательности полипептида ActRII дикого типа (для O-связанных сайтов гликозилирования). Целый ряд аминокислотных замен или делеций в одном или как в первом, так и в третьем положениях сайта распознавания гликозилирования (и/или аминокислотной делеции во втором положении) не приводит к гликозилированию в модифицированной трипептидной последовательности. Другим способом повышения количества углеводных частей на полипептиде ActRII является химическое или ферментативное соединение гликозидов с полипептидом ActRII. В зависимости от используемого способа соединения, сахар(а) могут быть присоединены к (a) аргинину и гистидину; (b) свободным карбоксильным группам; (c) свободным сульфгидрильным группам, таким как группы цистеина; (d) свободным гидроксильным группам, таким как группы серина, треонина или гидроксипролина; (e) ароматическим остаткам, таким как остаток фенилаланина, тирозина или триптофана; или (f) амидной группе глутамина. Удаление одной или нескольких углеводных частей, присутствующих на полипептиде ActRII, может осуществляться химически и/или ферментативно. Химическое гликозилирование включает, например, воздействие на полипептид ActRII соединением трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентным соединением. Эта обработ-

ка в результате приводит к расщеплению большинства или всех сахаров, за исключением связывающего сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), оставляя аминокислотную последовательность интактной. Ферментативное расщепление углеводных частей на полипептидах ActRII может достигаться благодаря использованию целого ряда эндо- и экзогликозидаз, описанных Thotakura et al. (1987) *Meth. Enzymol.* 138:350. Последовательность полипептида ActRII может быть скорректирована соответствующим образом в зависимости от типа используемой системы экспрессии, поскольку клетки млекопитающих, дрожжей, насекомых и растений могут иметь различные профили гликозилирования, на которые может влиять аминокислотная последовательность пептида. В основном белки ActRII для использования у людей могут быть экспрессированы в клеточных линиях млекопитающих, которые обеспечивают надлежащее гликозилирование, таких как клеточные линии HEK293 или CHO, хотя ожидается, что также подойдут и другие экспрессионные клеточные линии млекопитающих.

В этом описании, кроме того, рассматривается способ получения мутантов, в частности пары комбинаторных мутантов полипептида ActRII, а также процессированных мутантов; пулы комбинаторных мутантов особенно подходят для идентификации функционально активных вариантов последовательностей. Целью скрининга таких комбинаторных библиотек может быть получение, например, вариантов полипептида ActRII, которые связываются с активином или другими лигандами. Целый ряд скрининговых исследований представлен ниже, и такие исследования могут быть использованы для оценки вариантов. Например, вариант полипептида ActRII может подвергаться скринингу на способность связываться с лигандом ActRII для предотвращения связывания с лиганда ActRII с полипептидом ActRII или для нарушения передачи сигнала, вызываемого лигандом ActRII.

Активность полипептида ActRII или его вариантов также может быть протестирована в исследовании на основе клеток или *in vivo*. Например, можно оценить воздействие варианта полипептида ActRII на экспрессию генов, вовлеченных в гематопоз. При необходимости это можно выполнить в присутствии одного или нескольких рекомбинантных белков-лигандов ActRII (например, активина), и клетки могут быть трансфектированы таким образом, чтобы продуцировать полипептид ActRII и/или его варианты и, необязательно, лиганд ActRII. Подобным образом полипептид ActRII можно ввести мыши или другому животному и можно оценить один или несколько показателей крови, таких как количество эритроцитов, гемоглобин или количество ретикулоцитов.

Могут быть получены варианты комбинаторного происхождения, которые имеют селективную или в целом повышенную эффективность в отношении природного полипептида ActRII. Аналогичным образом мутагенез может давать начало вариантам, которые имеют внутриклеточные периоды полужизни, резко отличающиеся от соответствующего полипептида ActRII дикого типа. Например, измененный белок может стать либо более стабильным, либо менее стабильным в отношении протеолитического расщепления или других клеточных процессов, которые в результате приводят к деструкции или иной инактивации природного полипептида ActRII. Такие варианты и гены, которые их кодируют, могут быть использованы для изменения уровней полипептида ActRII посредством модулирования периода полужизни полипептидов ActRII. Например, короткий период полужизни может приводить к более неустойчивым биологическим эффектам и, в случае части индуцибельной системы экспрессии, может дать возможность осуществлять более жесткий контроль над уровнями рекомбинантного полипептида ActRII в клетке. В слитом белке Fc мутации могут быть сделаны в линкере (при наличии) и/или Fc части для изменения периода полужизни белка.

Комбинаторная библиотека может быть получена с помощью вырожденной библиотеки генов, кодирующих библиотеку полипептидов, каждый из которых содержит по меньшей мере часть потенциальных последовательностей полипептида ActRII. Например, смесь синтетических олигонуклеотидов может быть ферментативно лигирована в генные последовательности таким образом, чтобы вырожденное множество возможных нуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептид ActRII, экспрессировалось в виде отдельных полипептидов или, альтернативно, в виде множества более крупных слитых белков (например, для фагового дисплея).

Существует много способов, с помощью которых библиотека потенциальных гомологов может быть получена из вырожденной олигонуклеотидной последовательности. Химический синтез вырожденной генной последовательности можно проводить в автоматическом ДНК синтезаторе, и синтетические гены затем могут быть лигированы в соответствующий вектор экспрессии. Синтез вырожденных олигонуклеотидов хорошо известен из уровня техники (смотри, например, Narang, S.A. (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al., (1981) *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura et al., (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al., (1984) *Science* 198:1056; Ike et al., (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477). Такие методики были использованы в направленной эволюции других белков (смотри, например, 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; а также патенты США №№ 5223409, 5198346 и 5096815).

Альтернативно другие формы мутагенеза могут быть использованы для получения комбинаторной библиотеки. Например, варианты полипептида ActRII могут быть получены и выделены из библиотеки путем скрининга с использованием, например, аланинсканирующего мутагенеза и подобного (Ruf et al.,

(1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang et al., (1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balint et al., (1993) *Gene* 137:109-118; Grodberg et al., (1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashima et al., (1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892; Lowman et al., (1991) *Biochemistry* 30:10832-10838 и Cunningham et al., (1989) *Science* 244:1081-1085); с помощью сканирования линкером (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); с помощью насыщающего мутагенеза (Meyers et al., (1986) *Science* 232:613); с помощью ПЦР мутагенеза (Leung et al., (1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19) или случайным мутагенезом, в том числе химическим мутагенезом и тому подобным (Miller et al., (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY и Greener et al., (1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34). Сканирование линкером, в частности, в комбинаторных условиях, представляет собой эффективный способ идентификации процессированных (биологически активных) форм полипептидов ActRII.

Большое разнообразие методик известно из уровня техники для скрининга генных продуктов комбинаторных библиотек, созданных с помощью точковых мутаций и усечений, и, в этом отношении, для скрининга библиотек ДНК на генные продукты, имеющие определенные свойства. Такие методики в основном подходят для быстрого скрининга генных библиотек, полученных с помощью комбинаторного мутагенеза полипептидов ActRII. Наиболее широко используемые методики для скрининга больших генных библиотек обычно включают клонирование генной библиотеки в реплицируемые векторы экспрессии, трансформирование соответствующих клеток полученной в результате библиотекой векторов и экспрессию комбинаторных генов в условиях, в которых выявление желаемой активности способствует относительно простому выделению вектора, несущего ген, продукт которого был выявлен. Предпочтительные исследования включают исследования связывания с активинном и исследования опосредованных активинном клеточных путей передачи сигнала.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды ActRII по изобретению могут дополнительно содержать посттрансляционные модификации помимо любых природным образом присутствующих в полипептидах ActRII. Такие модификации включают, но ими не ограничиваются, ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, липидирование и ацилирование. В результате модифицированные полипептиды ActRII могут содержать неаминокислотные элементы, такие как полиэтиленгликоли, липиды, поли- или моносахариды и фосфаты. Действие таких неаминокислотных элементов на функциональную активность полипептида ActRII может быть протестировано, как раскрыто в описании для других вариантов полипептида ActRII. В тех случаях, когда полипептид ActRII продуцируется в клетках путем расщепления насцентной формы полипептида ActRII, посттрансляционный процессинг также может быть важным для правильной укладки и/или функционирования белка. Различные клетки (такие как CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 или HEK293) имеют особый клеточный механизм и характерные механизмы для таких посттрансляционных активностей и могут быть выбраны для обеспечения правильной модификации и процессинга полипептидов ActRII.

В некоторых аспектах функционально активные варианты модифицированных форм полипептидов ActRII включают слитые белки, имеющие по меньшей мере часть полипептидов ActRII и один или несколько слитых доменов. Хорошо известные примеры таких слитых доменов включают в себя, но ими не ограничиваются, полигистидин, Glu-Glu, глутатион S трансферазу (GST), тиоредоксин, белок A, белок G, константную область тяжелой цепи иммуноглобулина (Fc), белок, связывающий мальтозу (MBP) или сывороточный альбумин человека. Слитый домен может быть выбран таким образом, чтобы придать желаемые свойства. Например, некоторые слитые домены особенно подходят для выделения слитых белков с помощью аффинной хроматографии. Для целей аффинной очистки используют соответствующие матрицы для аффинной хроматографии, такие как глутатион-, амилаза- и никель- или кобальт-конъюгированные смолы. Многие из таких матриц доступны в виде "набора", например система очистки Pharmacia GST и система QIAexpress™ (Qiagen) используются с партнерами слияния (HIS₆). В качестве другого примера слитый домен может быть выбран для упрощения выявления полипептидов ActRII. Примеры таких детекционных доменов включают различные флуоресцирующие белки (например, GFP), а также "эпитопные метки", которые обычно представляют собой короткие пептидные последовательности, для которых имеется специфическое антитело. Хорошо известные эпитопные метки, для которых специфические моноклональные антитела легко доступны, включают FLAG, гемагглютинин вируса гриппа (HA) и тэги с-тус. В некоторых случаях слитые домены имеют сайт расщепления протеазой, например для фактора Ха или тромбина, что дает возможность соответствующим протеазам частично расщеплять слитые белки и, таким образом, высвобождать из них рекомбинантные белки. Высвобожденные белки затем могут быть выделены из слитого домена путем последующего хроматографического разделения. В некоторых предпочтительных вариантах полипептид ActRII слит с доменом, который стабилизирует полипептид ActRII *in vivo* ("стабилизирующий" домен). Под "стабилизирующим" понимают увеличение периода полужизни в сыворотке независимо от того, происходит ли это из-за снижения деструкции, уменьшения выведения почками или другого фармакокинетического эффекта. Слияния с частью Fc иммуноглобулина известны для придания желаемых фармакокинетических свойств широкому диапазону белков. Подобным образом, слияния с сывороточным альбумином человека могут придать желаемые свойства. Другие слитые домены, которые могут быть выбраны, включают в себя домены мульти-

меризации (например, димеризации, тетрамеризации) и функциональные домены (которые придают дополнительную биологическую функцию, такую как дополнительная стимуляция мышечного роста).

В качестве особого примера в настоящем изобретении представлен слитый белок, содержащий растворимый внеклеточный домен ActRIIa, слитый с доменом Fc (например, SEQ ID NO:6)

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV (A) VSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVP IEKTI S
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD S
 DGPFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHN (A) HYTQKLSLSLSPGK*

В качестве дополнительного особого примера в настоящем изобретении представлен слитый белок, содержащий растворимый внеклеточный домен ActRIIb, слитый с доменом Fc (например, SEQ ID NO:21)

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHICYASWANS SGTIELVKKG
 CWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVP IEKTI SKAKGQPREPQVY T
 LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

Необязательно, домен Fc имеет одну или несколько мутаций в таких остатках, как Asp-265, лизин 322 и Asn-434. В некоторых случаях мутантный домен Fc, имеющий одну или несколько таких мутаций (например, мутацию Asp-265), имеет пониженную способность связывания с рецептором Fcγ по сравнению с доменом Fc дикого типа. В других случаях мутантный домен Fc, имеющий одну или несколько таких мутаций (например, мутацию Asn-434), имеет повышенную способность связываться с Fc-рецептором (FcRN), родственным МНС класса I по сравнению с доменом Fc дикого типа.

Понятно, что различные элементы слитых белков могут быть расположены любым образом, который совместим с желаемой функциональной активностью. Например, полипептид ActRII может быть расположен С-концом к гетерологичному домену, или, альтернативно, гетерологичный домен может быть расположен С-концом к полипептиду ActRII. Домен полипептида ActRII и гетерологичный домен не должны быть смежными в слитом белке, и дополнительные домены или аминокислотные последовательности могут быть включены С- или N-концом в любой домен или между доменами.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды ActRII по настоящему изобретению содержат одну или несколько модификаций, которые могут стабилизировать полипептиды ActRII. Например, такие модификации увеличивают период полужизни *in vitro* полипептидов ActRII, увеличивают период полужизни полипептидов ActRII в кровообращении или уменьшают протеолитическое расщепление полипептидов ActRII. Такие стабилизирующие модификации включают, но ими не ограничиваются, слитые белки (в том числе, например, слитые белки, содержащие полипептид ActRII и стабилизирующий домен), модификации сайта гликозилирования (в том числе, например, добавление сайта гликозилирования к полипептиду ActRII) и модификации углеводной части (в том числе, например, удаление углеводных частей из полипептида ActRII). Используемый в настоящем описании термин "стабилизирующий домен" относится не только к слитому домену (например, Fc), как в случае слитых белков, а также включает небелковые модификации, например, углеводной части или небелковой части, например, полиэтиленгликоля.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение делает возможным получение выделенных и/или очищенных форм полипептидов ActRII, которые выделены из других белков или иным образом, по существу, свободные от них. Полипептиды ActRII в основном будут получены с помощью экспрессии из рекомбинантных нуклеиновых кислот.

3. Нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды ActRII.

В некоторых аспектах изобретение относится к выделенным и/или рекомбинантным нуклеиновым кислотам, кодирующим любой из полипептидов ActRII (например, растворимые полипептиды ActRIIa и растворимые полипептиды ActRIIb), в том числе к фрагментам, функционально активным вариантам и слитым белкам, представленным в описании. Например, последовательность SEQ ID NO:4 кодирует природный полипептид-предшественник ActRIIa человека, а SEQ ID NO:5 кодирует процессированный внеклеточный домен ActRIIa. Например, SEQ ID NO:18 кодирует природный белок-предшественник ActRIIb человека, а SEQ ID NO:19 кодирует процессированный внеклеточный домен ActRIIb. Представленные нуклеиновые кислоты могут быть односпиральными или двухспиральными. Такие нуклеиновые кислоты могут представлять собой молекулы ДНК или РНК. Эти нуклеиновые кислоты могут быть использованы, например, для получения полипептидов ActRII или в качестве прямых терапевтических средств (например, в генной терапии).

В некоторых аспектах дополнительно подразумевается, что представленные нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды ActRIIa, включают нуклеиновые кислоты, которые являются вариантами последовательностей SEQ ID NO:4 или 5. В некоторых аспектах дополнительно подразумевается, что представленные нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды ActRIIb, включают нуклеиновые кислоты,

которые являются вариантами последовательностей SEQ ID NO:18 или 19. Варианты нуклеиновых последовательностей включают последовательности, которые отличаются одной или несколькими нуклеотидными заменами, добавлениями или делециями, например аллельные варианты.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к выделенным или рекомбинантным последовательностям нуклеиновых кислот, которые по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичны последовательностям SEQ ID NO:4, 5, 18 или 19. Специалисту в данной области будет понятно, что последовательности нуклеиновых кислот, комплементарные последовательностям SEQ ID NO:4, 5, 18 или 19 и вариантам последовательностей SEQ ID NO:4, 5, 18 или 19, также входят в объем настоящего изобретения. В дополнительных вариантах осуществления последовательности нуклеиновых кислот по изобретению могут быть выделенными, рекомбинантными и/или слитыми с гетерологичной нуклеиновой последовательностью, или в библиотеке ДНК.

В других вариантах осуществления нуклеиновые кислоты по изобретению также включают нуклеотидные последовательности, которые гибридизируются в условиях высокой жесткости с нуклеотидной последовательностью, охарактеризованной в последовательностях SEQ ID NO:4, 5, 18 или 19, последовательностью, комплементарной последовательностям SEQ ID NO:4, 5, 18 или 19, или их фрагментам. Как рассматривалось выше, специалисту в данной области будет понятно, что соответствующие условия жесткости, которые способствуют гибридизации ДНК, могут быть изменены. Специалисту в данной области будет понятно, что соответствующие условия жесткости, которые способствуют гибридизации ДНК, могут быть изменены. Например, можно проводить гибридизацию при 6,0×хлорид натрия/цитрат натрия (SSC) примерно при 45°C с последующим промыванием 2,0×SSC при 50°C. Например, концентрация соли на стадии промывания может быть выбрана от низкой жесткости примерно 2,0×SSC при 50°C до высокой жесткости примерно 0,2×SSC при 50°C. Кроме того, температура на стадии промывания может быть повышена от условий низкой жесткости при комнатной температуре, примерно 22°C, до условий высокой жесткости примерно при 65°C. Как температура, так и соль могут меняться, или температура или концентрация соли могут поддерживаться постоянными, тогда как другие переменные изменяются. В одном варианте осуществления изобретение относится к нуклеиновым кислотам, которые гибридизируются в условиях низкой жесткости 6×SSC при комнатной температуре с последующим промыванием 2×SSC при комнатной температуре.

Выделенные нуклеиновые кислоты, которые отличаются от нуклеиновых кислот, представленных в последовательностях SEQ ID NO:4, 5, 18 или 19 вследствие вырожденности генетического кода, также входят в объем настоящего изобретения. Например, ряд аминокислот обозначается более чем одним триплетом. Кодоны, которые определяют одну и ту же аминокислоту, или синонимы (например, CAU и CAC являются синонимами гистидина) могут в результате приводить к "молчащим" мутациям, которые не влияют на аминокислотную последовательность белка. Однако ожидается, что среди клеток млекопитающих будут существовать полиморфизмы последовательностей ДНК, которые приводят к изменениям в аминокислотных последовательностях рассматриваемых белков. Специалисту в данной области будет понятно, что такие вариации в одном или нескольких нуклеотидах (примерно вплоть до 3-5% нуклеотидов) нуклеиновых кислот, кодирующих конкретный белок, могут существовать у индивидуумов данных видов из-за природного аллельного разнообразия. Любая или все такие нуклеотидные варианты и полученные в результате аминокислотные полиморфизмы входят в объем настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть функционально связаны с одной или несколькими регуляторными нуклеотидными последовательностями в экспрессионной конструкции. Регуляторные нуклеотидные последовательности в основном будут соответствовать клетке-хозяину, используемой для экспрессии. Большое число различных типов соответствующих векторов экспрессии и подходящих регуляторных последовательностей известно из уровня техники для целого ряда клеток-хозяев. В основном указанная одна или несколько регуляторных последовательностей могут включать, но ими не ограничиваться, промоторные последовательности, лидерные или сигнальные последовательности, сайты связывания с рибосомой, последовательности начала и терминации транскрипции, последовательности начала и терминации трансляции и энхансерные или активаторные последовательности. Конститутивные или индуцибельные промоторы, известные из уровня техники, входят в объем настоящего изобретения. Промоторы могут быть либо природными, либо гибридными промоторами, которые сочетают в себе элементы более одного промотора. Экспрессионная конструкция может находиться в клетке на эписоме, такой как плаزمид, или экспрессионная конструкция может быть встроена в хромосому. В предпочтительном варианте осуществления вектор экспрессии содержит селективируемый маркерный ген для возможности селекции трансформированных клеток-хозяев. Селективируемые маркерные гены хорошо известны из уровня техники и будут изменяться вместе с используемой клеткой-хозяином.

В некоторых аспектах изобретения рассматриваемые нуклеиновые кислоты находятся в векторе экспрессии, содержащем нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид ActRII и функционально связанную по меньшей мере с одной регуляторной последовательностью. Регуляторные последовательности известны из уровня техники и их выбирают для направления экспрессии полипептида

ActRII. Таким образом, термин "регуляторная последовательность" включает промоторы, энхансеры и другие элементы, контролирующие экспрессию. Примеры регуляторных последовательностей описаны у Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990). Например, любая из большого числа разнообразных последовательностей, контролирующих экспрессию, которые контролируют экспрессию ДНК последовательности в случае функционального связывания с ней, может быть использована в этих векторах для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих полипептид ActRII. Такие подходящие последовательности, контролирующие экспрессию, включают, например, ранний и поздний промоторы SV40, tet промотор, немедленно-ранний промотор аденовируса или цитомегаловируса, RSV промоторы, lac систему, trp систему, TAC или TRC систему, T7 промотор, экспрессия которого направляется T7 РНК полимеразой, основной оператор и промоторные области фага лямбда, контрольные участки для покровного белка fd, промотор для 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, промоторы кислой фосфатазы, например Pho5, промоторы фактора спаривания дрожжей α , полигедронный промотор бакуловирусной системы и другие последовательности, известные для контроля экспрессии генов прокариотических или эукариотических клеток или их вирусов и различные их сочетания. Должно быть понятно, что конструкция вектора экспрессии может зависеть от таких факторов, как выбор трансформируемой клетки-хозяина и/или типа белка, экспрессия которого желательна. Более того, число копий вектора, способность контролировать такое число копий и экспрессия любого другого белка, кодируемого этим вектором, например маркеров антибиотиков, также должно рассматриваться.

Рекомбинантная нуклеиновая кислота по изобретению может быть получена путем лигирования клонированного гена, или его части, в вектор, подходящий для экспрессии в любых прокариотических клетках, эукариотических клетках (дрожжевых, клетках птиц, насекомых или млекопитающих) или в обоих. Экспрессионные носители для получения рекомбинантного полипептида ActRII включают плазмиды и другие векторы. Например, подходящие векторы включают плазмиды типов: pBR322-производные плазмиды, pEMBL-производные плазмиды, pEX-производные плазмиды, pVAc-производные плазмиды и pUC-производные плазмиды для экспрессии в прокариотических клетках, таких как *E. coli*.

Некоторые векторы экспрессии млекопитающих содержат как прокариотические последовательности для облегчения размножения вектора в бактериях, так и одну или несколько эукариотических транскрипционных единиц, которые экспрессируются в эукариотических клетках. Векторы, производные от pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pкneo и pNug, являются примерами векторов экспрессии млекопитающих, подходящих для трансфекции эукариотических клеток. Некоторые из этих векторов модифицированы последовательностями бактериальных плазмид, например pBR322, для облегчения репликации и отбора по резистентности к лекарственным средствам как в прокариотических, так и в эукариотических клетках. Альтернативно производные вирусов, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота (BPV-1) или вирус Эпштейна-Барра (pHEBo, pREP-производные и p205), могут быть использованы для транзитной экспрессии белков в эукариотических клетках. Примеры других вирусных (в том числе ретровирусных) экспрессионных систем можно найти далее в описании систем доставки для генной терапии. Различные способы, используемые в получении плазмид и в трансформации организмов-хозяев, хорошо известны из уровня техники. По другим подходящим экспрессионным системам как для прокариотических, так и для эукариотических клеток, а также общие рекомбинантные методики смотри *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3rd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). В некоторых случаях может быть желательно экспрессировать рекомбинантные полипептиды с помощью использования бакуловирусной экспрессионной системы. Примеры таких бакуловирусных экспрессионных систем включают pVL-производные векторы (такие как pVL1392, pVL1393 и pVL941), pAcUW-производные векторы (такие как pAcUW1) и pBlueVac-производные векторы (такие как pBlueVac III, содержащий β -gal).

В предпочтительном варианте осуществления вектор конструируют для продукции рассматриваемых полипептидов ActRII в клетках CHO, например вектор Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), векторы pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) и векторы pCI-neo (Promega, Madison, Wis.). Как будет понятно, рассматриваемые генные конструкции могут быть использованы для стимуляции экспрессии рассматриваемых полипептидов ActRII в клетках, размноженных в культуре, например, для продукции белков, в том числе слитых белков или вариантов белков, для очистки.

Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам, трансфектированным рекомбинантным геном, содержащим кодирующую последовательность (например, SEQ ID NO:4, 5, 18 или 19) для одного или нескольких рассматриваемых полипептидов ActRII. Клетка-хозяин может быть любой прокариотической или эукариотической клеткой. Например, полипептид ActRII по изобретению может экспрессироваться в бактериальных клетках, таких как *E. coli*, клетках насекомых (например, с помощью бакуловирусных экспрессионных систем), дрожжей или клетках млекопитающих. Другие подходящие клетки-хозяева известны специалистам в данной области.

Таким образом, настоящее изобретение дополнительно относится к способам получения рассматри-

ваемых полипептидов ActRII. Например, клетка-хозяин, трансфектированная вектором экспрессии, кодирующим полипептид ActRIIa или ActRIIb, может быть культивирована в соответствующих условиях, при которых возможна экспрессия полипептида ActRII. Полипептид ActRII может быть секретирован и выделен из смеси клеток и из среды, содержащей полипептид ActRII. Альтернативно полипептид ActRII может сохраняться цитоплазматически или в мембранной фракции, и клетки собирали, лизировали и выделяли белок. Клеточная культура содержит клетки-хозяева, среду и другие промежуточные продукты. Подходящие среды для клеточной культуры известны из уровня техники. Рассматриваемые полипептиды ActRII могут быть выделены из клеточной культуральной среды, клеток-хозяев или из того и другого методиками, известными из уровня техники для очистки белков, в том числе с помощью ионообменной хроматографии, гель-фильтрации, ультрафильтрации, электрофореза, иммуноаффинной очистки с помощью антител, специфичных к конкретным эпитопам полипептидов ActRII, и аффинной очистки с помощью соединения, которое связывается с доменом, слитым с полипептидом ActRII (например, колонка с белком А может быть использована для очистки слитых ActRIIa-Fc или ActRIIb-Fc). В предпочтительном варианте осуществления полипептид ActRII представляет собой слитый белок, содержащий домен, который облегчает его очистку. В предпочтительном варианте осуществления очистки достигается серией стадий колоночной хроматографии, включающих, например, три или более из следующих стадий, в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q сефарозой, хроматография с фенилсефарозой, гель-хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершить фильтрацией вирусов и сменой буфера. Как показано в настоящем описании, белок ActRIIa-hFc был очищен до чистоты >98% по данным гель-хроматографии и >95% по данным SDS PAGE. Этого уровня очистки было достаточно для достижения желаемых результатов у мышей, крыс и нечеловекообразных приматов.

В другом варианте осуществления слитый ген, кодирующий лидерную последовательность для очистки, например последовательность сайта расщепления поли-(His)/энтерокиназой на N-конце желаемой части рекомбинантного полипептида ActRII, может дать возможность очистить экспрессированный слитый белок с помощью аффинной хроматографии, используя Ni^{2+} металлическую смолу. Лидерную последовательность для очистки затем можно впоследствии удалить посредством обработки энтерокиназой с получением очищенного полипептида ActRII (например, смотри Hochuli et al., (1987) *J. Chromatography* 411:177 и Janknecht et al., *PNAS USA* 88:8972).

Способы получения слитых генов хорошо известны. Главным образом, соединение различных фрагментов ДНК, кодирующих различные полипептидные последовательности, проводят в соответствии с общепринятыми методиками, используя слепые или болтающиеся концы для лигирования, расщепление ферментами рестрикции для получения соответствующих концов, заполнение липких концов при необходимости, обработку щелочной фосфатазой во избежание нежелательного соединения и ферментативное лигирование. В другом варианте осуществления слитый ген может быть синтезирован с помощью общепринятых методик, включающих автоматизированные ДНК синтезаторы. Альтернативно ПЦР амплификация генных фрагментов может быть выполнена с использованием якорных праймеров, которые образуют комплементарные липкие концы между двумя последовательными генными фрагментами, которые впоследствии можно отжигать с получением химерной генной последовательности (см., например, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

4. Альтернативные антагонисты активина и ActRII.

Данные, представленные в настоящем описании, демонстрируют, что антагонисты сигнального пути активин-ActRII могут быть использованы для повышения уровня эритроцитов или гемоглобина. Хотя растворимые полипептиды ActRIIa и ActRIIb и, в частности, ActRIIa-Fc и ActRIIb-Fc являются предпочтительными антагонистами и хотя такие антагонисты могут влиять на уровни эритроцитов благодаря механизму, отличному от антагонизма активина, (например, ингибирование активина может быть показателем тенденции соединения ингибировать активности спектра молекул, в том числе, возможно, других представителей суперсемейства TGF-бета, и такое совместное ингибирование может приводить к желаемому действию на гематопоез), ожидается, что могут быть эффективными другие типы антагонистов активин-ActRII, в том числе антитела к активину (например, активин β_A , β_B , β_C и β_E), антитела к ActRIIa, антитела к ActRIIb, антисмысловые нуклеиновые кислоты РНКи или рибозима, которые ингибируют продукцию ActRIIa и/или ActRIIb, и другие ингибиторы активина, ActRIIb или ActRIIa, в частности те, которые нарушают связывание активин-ActRIIa и/или активин-ActRIIb.

Антитело, которое специфически взаимодействует с полипептидом ActRII (например, растворимым полипептидом ActRIIa или ActRIIb) и которое либо связывается конкурентно с лигандом с полипептидом ActRII, либо иным путем ингибирует опосредованную ActRII передачу сигнала, может быть использовано в качестве антагониста активности полипептида ActRII. Подобным образом, антитело, которое специфически взаимодействует с полипептидом активина β_A , β_B , β_C или β_E или любым его гетеродимером и которое нарушает связывание ActRIIa и/или ActRIIb, может быть использовано в качестве антагониста.

Используя иммуногены, полученные из полипептида ActRIIa, полипептида ActRIIb или полипептида активина, антибелковые/антипептидные антисыворотки или моноклональные антитела могут быть получены с помощью стандартных протоколов (см., например, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. by

Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Млекопитающее, такое как мышь, хомяк или кролик, может быть иммунизировано иммуногенной формой полипептида активина, ActRIIa или ActRIIb, антигенным фрагментом, который способен вызывать антителный ответ, или слитым белком. Методики придания иммуногенности белку или пептиду включают конъюгирование с носителями или другие методики, известные из уровня техники. Иммуногенную часть полипептида ActRII или активина можно вводить в присутствии адъюванта. Развитие иммунизации можно наблюдать путем определения титров антител в плазме или сыворотке. Стандартные ELISA или другие иммуноанализы могут быть использованы с иммуногеном в качестве антигена для оценки уровней антител.

После иммунизации животного антигенным препаратом полипептида активина, ActRIIa или ActRIIb, может быть получена антисыворотка, и, при желании, поликлональные антитела также могут быть выделены из сыворотки. Для получения моноклональных антител антитело-продуцирующие клетки (лимфоциты) могут быть получены из иммунизированного животного и слиты с помощью стандартных методик слияния соматических клеток с иммортализованными клетками, такими как клетки миеломы, с получением гибридомных клеток. Такие методики хорошо известны из уровня техники и включают, например, гибридомную технологию (первоначально разработанную Kohler and Milstein, (1975) *Nature*, 256:495-497), гибридомную технологию В клеток человека (Kozbar et al., (1983) *Immunology Today*, 4:72) и гибридомную технологию EBV для получения моноклональных антител человека (Cole et al., (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pp.77-96). Гибридомные клетки могут быть подвергнуты иммунохимическому скринингу для получения антител, специфически взаимодействующих с полипептидом активина, ActRIIa или ActRIIb и моноклональные антитела, выделенные из культуры, содержащей такие гибридомные клетки.

Термин "антитело", используемый в настоящем описании, включает целые антитела, например, любого изотипа (IgG, IgA, IgM, IgE и тому подобное), и включает фрагменты или домены иммуноглобулинов, которые взаимодействуют с выбранным антигеном. Антитела могут быть фрагментированы с использованием общепринятых методик, и эти фрагменты подвергают скринингу на эффективность и/или взаимодействие со специфическим эпитопом, представляющим интерес. Таким образом, этот термин включает сегменты протеолитически расщепленных или полученных рекомбинантными способами частей молекулы антитела, которые способны к селективному взаимодействию с конкретным белком. Неограничивающие примеры таких протеолитических и/или рекомбинантных фрагментов включают Fab, F(ab')₂, Fab', Fv и одноцепочечные антитела (scFv), содержащие домен V[L] и/или V[H], соединенные пептидным линкером. scFv могут быть ковалентно или нековалентно связаны с получением антител, имеющих два или несколько сайтов связывания. Термин "антитело" также включает поликлональные, моноклональные или другие очищенные препараты антител и рекомбинантные антитела. Термин "рекомбинантное антитело" означает антитело, или антигенсвязывающий домен иммуноглобулина, экспрессируемое из нуклеиновой кислоты, которая была сконструирована с использованием технологий молекулярной биологии, например, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело, полученное из одноцепочечного антитела. Однодоменные и одноцепочечные антитела также включены в термин "рекомбинантное антитело".

В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению представляет собой моноклональное антитело, и в некоторых вариантах осуществления изобретение представляет доступные способы получения новых антител. Например, способ получения моноклонального антитела, которое связывается специфически с полипептидом ActRIIa, полипептидом ActRIIb или полипептидом активина, может включать введение мыши некоторого количества иммуногенной композиции, содержащей антигенный полипептид, эффективный для стимуляции обнаруживаемого иммунного ответа, получение антитело-продуцирующих клеток (например, клеток селезенки) от мыши и слияние антитело-продуцирующих клеток с миеломными клетками с получением антитело-продуцирующего гибридом, и тестирование антитело-продуцирующего гибридом для идентификации гибридомы, которая продуцирует моноклональные антитела, которые специфически связываются с антигеном. После получения гибридома может размножаться в клеточной культуре, необязательно в культуральных условиях, при которых клетки гибридомы продуцируют моноклональные антитела, которые специфически связываются с антигеном. Моноклональные антитела могут быть очищены из клеточной культуры.

Определение "специфически взаимодействующее с", используемое в отношении антитела, означает, как в основном принято в данной области, что антитело является достаточно селективным между интересующим антигеном (например, активинем, ActRIIa или полипептидом ActRIIb) и другими антигенами, которые не представляют интерес, что это антитело подходит как минимум для выявления наличия интересующего антигена в конкретном типе биологического образца. В некоторых способах использования антитела, таких как терапевтическое применение, может потребоваться более высокая степень специфичности связывания. Моноклональные антитела в основном имеют более высокую тенденцию (по сравнению с поликлональными антителами) к эффективному распознаванию желаемых антигенов и перекрестно-реагирующих полипептидов. Одной характеристикой, которая влияет на специфичность взаимодействия антитела:антиген, является аффинность антитела к антигену. Хотя желаемая специфичность может достигаться с целым рядом различных аффинностей, главным образом, предпочтительные анти-

тела будут иметь аффинность (константу диссоциации) примерно 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} М или менее.

Кроме того, методики, используемые для скрининга антител для идентификации желаемого антитела, могут влиять на свойства полученных антител. Например, если антитело используется для связывания с антигеном в растворе, то может быть желательным протестировать связывание в растворе. Целый ряд различных методик доступен для тестирования взаимодействия между антителами и антигенами для идентификации особенно подходящих антител. Такие методики включают ELISA, анализы связывания методом поверхностного плазмонного резонанса (например, анализ связывания Biacore™, Biacore AB, Uppsala, Sweden), сэндвич-анализы (например, система парамагнитных бус IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), Вестерн блоты, анализы иммунопреципитации и иммуногистохимия.

Примеры категорий соединений нуклеиновых кислот, которые являются антагонистами активина или ActRII, включают антисмысловые нуклеиновые кислоты, конструкции РНК и конструкции каталитических нуклеиновых кислот. Соединение нуклеиновой кислоты может быть односпиральным или двухспиральным. Двухспиральное соединение также может включать "липкие" участки или некомплементарности, где одна или другие цепи являются односпиральными. Односпиральное соединение может содержать участки самокомплементарности, означая, что это соединение образует так называемую "шпилечную" структуру или структуру "стебель-петля", с областью двухспиральной структуры. Соединение нуклеиновой кислоты может содержать нуклеотидную последовательность, которая комплементарна области, состоящей не более чем из 1000, не более чем из 500, не более чем из 250, не более чем из 100 или не более чем из 50, 35, 25, 22, 20, 18 или 15 нуклеотидов полноразмерной последовательности нуклеиновых кислот ActRII или последовательности нуклеиновой кислоты активина β_A , β_B , β_C или β_E . Область комплементарности предпочтительно будет составлять по меньшей мере 8 нуклеотидов и, необязательно, примерно от 18 до 35 нуклеотидов. Область комплементарности может оказаться в интроне, кодирующей последовательности или некодирующей последовательности целевого транскрипта, например часть кодирующей последовательности. В основном соединение нуклеиновой кислоты будет иметь длину примерно от 8 примерно до 500 нуклеотидов или пар оснований в длину, и, необязательно, длина будет составлять примерно от 14 до 50 нуклеотидов. Нуклеиновая кислота может быть ДНК (в частности, для использования в качестве антисмысловой), РНК или гибридом РНК:ДНК. Любая одна цепь может содержать смесь ДНК и РНК, а также модифицированные формы, которые трудно классифицировать, либо как ДНК, либо как РНК. Подобным образом, двухспиральное соединение может представлять собой ДНК:ДНК, ДНК:РНК или РНК:РНК, и любая одна цепь также может содержать смесь ДНК и РНК, а также модифицированные формы, которые трудно классифицировать либо как ДНК, либо как РНК. Соединение нуклеиновой кислоты может содержать любую из целого ряда модификаций, в том числе одну или модификации скелета (сахар-фосфатной части в природной нуклеиновой кислоты, содержащей межнуклеотидные связи) или основной части (пуриновой или пиримидиновой части природной нуклеиновой кислоты). Длина соединения антисмысловой нуклеиновой кислоты предпочтительно составляет примерно от 15 примерно до 30 нуклеотидов и, как правило, содержит одну или несколько модификаций, улучшающих характеристики, такие как стабильность в сыворотке, в клетке или в том месте, куда доставляют соединение, например в желудке в случае пероральной доставки соединений и в легких для ингалируемых соединений. В случае конструкции РНК комплементарная цепь мишеневого транскрипта в основном будет представлять собой РНК или ее модификации. Другая цепь может представлять собой РНК, ДНК или любой другой вариант. Часть дуплекса двухспиральной или односпиральной "шпилечной" конструкции РНК в основном будет иметь длину от 18 до 40 нуклеотидов и, необязательно, примерно от 21 до 23 нуклеотидов в длину, при условии, что она служит в качестве субстрата Дайсера. Каталитические или ферментативные нуклеиновые кислоты могут представлять собой рибозимы или ДНК-ферменты и также могут содержать модифицированные формы. Соединения нуклеиновых кислот могут ингибировать экспрессию мишени примерно на 50, 75, 90% или более при контактировании с клетками в физиологических условиях и при концентрации, при которой несмысловой или смысловой контроль оказывает небольшой эффект или вовсе не оказывает эффекта. Предпочтительные концентрации для тестирования эффекта соединений нуклеиновых кислот составляют 1, 5 и 10 мкМ. Соединения нуклеиновых кислот также могут быть протестированы, например, на воздействие на уровни эритроцитов.

5. Скрининговые исследования.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к применению пептидов ActRII (например, растворимых полипептидов ActRIIa или ActRIIb) и полипептидов активина для идентификации соединений (средств), которые являются агонистами или антагонистами пути передачи сигнала активин-ActRIIa и/или активин ActRIIb. Соединения, идентифицированные с помощью этого скрининга, могут быть протестированы для оценки их способности модулировать уровни эритроцитов, гемоглобина и/или ретикулоцитов *in vivo* или *in vitro*. Эти соединения могут быть протестированы, например, на моделях животных.

Существует целый ряд подходов для скрининга терапевтических средств, повышающих уровень эритроцитов или гемоглобина нацеливанием на путь передачи сигнала активина и ActRII. В некоторых вариантах осуществления высокопроизводительный скрининг соединений может проводиться для иден-

тификации средств, которые нарушают активин или ActRII-опосредованные эффекты на выбранной клеточной линии. В некоторых вариантах осуществления такое исследование проводят для скрининга и идентификации соединений, которые специфически ингибируют или уменьшают связывание полипептида ActRIIa или ActRIIb с активином. Альтернативно исследование может быть использовано для идентификации соединений, которые усиливают связывание полипептида ActRIIa или ActRIIb с активином. Еще в одном варианте осуществления соединения могут быть идентифицированы по их способности взаимодействовать с активином, полипептидом ActRIIb или полипептидом ActRIIa.

Подходит целый ряд исследований различного формата и в свете настоящего описания те исследования, которые не представлены в описании конкретно, тем не менее, будут понятны специалисту в данной области. Описанные в настоящем изобретении тестируемые соединения (средства) по изобретению могут быть получены любым комбинаторным химическим способом. Альтернативно рассматриваемые соединения могут быть природными биомолекулами, синтезированными *in vivo* или *in vitro*. Соединения (средства), тестируемые на их способность действовать в качестве модуляторов тканевого роста, могут быть получены, например, с помощью бактерий, дрожжей, растений или других организмов (например, природные продукты), получены химически (например, малые молекулы, в том числе пептидомиметики) или получены рекомбинантно. Тестируемые соединения, рассматриваемые в настоящем изобретении, включают непептидные органические молекулы, пептиды, полипептиды, пептидомиметики, сахара, гормоны и молекулы нуклеиновых кислот. В конкретном варианте осуществления тестируемое средство представляет собой малую органическую молекулу с молекулярной массой примерно менее 2000 Да.

Тестируемые соединения по изобретению могут быть представлены в виде отдельных дискретных единиц или представлены в библиотеках большей сложности, например полученные с помощью комбинаторной химии. Эти библиотеки могут содержать, например, спирты, алкилгаллиды, амины, амиды, сложные эфиры, альдегиды, простые эфиры и другие классы органических соединений. Введение тестируемых соединений в тест-систему может быть либо в выделенной форме, либо в виде смеси соединений, особенно на начальных стадиях скрининга. Необязательно, соединения могут быть получены в виде производных с помощью других соединений и иметь производные группы, которые облегчают выделение этих соединений. Неограничивающие примеры производных групп включают биотин, флуоресцеин, дигоксигенин, зеленый флуоресцирующий белок, изотопы, полигистидин, магнитные бусы, глутатион S трансферазу (GST), фотоактивируемые поперечно-связывающие вещества или их сочетания.

Во многих программах скрининга, в которых тестируемые библиотеки соединений и природных экстрактов, исследования с высокой пропускной способностью желательны для максимально высокого количества соединений, проанализированы в заданный период времени. Исследования, проводимые в бесклеточных системах, те, которые могут быть получены с использованием очищенных или полуочищенных белков, зачастую являются предпочтительными в качестве "первичных" скринингов, в которых они могут быть получены для быстрой разработки и относительного легкого выявления изменения в молекулярной мишени, которое опосредовано тестируемым соединением. Более того, эффекты клеточной токсичности или биодоступности тестируемого соединения в основном могут остаться незамеченными в *in vitro* системе, это исследование вместо фокусирования главным образом на действии лекарственного средства на молекулярную мишень как может проявляться в изменении аффинности связывания между полипептидом ActRIIa и активином и/или между полипептидом ActRIIb и активином.

Только в качестве примера в приводимом в качестве примера скрининговом исследовании по настоящему изобретению соединение, представляющее интерес, контактирует с выделенным и очищенным полипептидом ActRIIa, который способен связываться с активином. К смеси соединения и полипептида ActRIIa затем добавляют композицию, содержащую лиганд ActRIIa. Выявление и количественный анализ комплексов ActRIIa/активин обеспечивает средство для определения эффективности соединения в отношении ингибирования (или потенцирования) образования комплекса между полипептидом ActRIIa и активином. Эффективность соединения можно оценить с помощью построения кривых доза-ответ на основании полученных данных, используя различные концентрации тестируемого соединения. Более того, контрольное исследование также может проводиться для получения фонового значения для сравнения. Например, в контрольном исследовании выделенный и очищенный активин добавляют в композицию, содержащую полипептид ActRIIa, количественно оценивают образование комплекса ActRIIa/активин в отсутствие тестируемого соединения. Понятно, что в основном порядок, в котором реактивы могут смешиваться, может быть разным, и их можно смешивать одновременно. Более того, вместо очищенных белков клеточные экстракты и лизаты могут быть использованы для воспроизведения подходящей бесклеточной системы анализа. Соединения, которые влияют на передачу сигнала ActRIIb, могут быть идентифицированы аналогичным образом с использованием полипептида ActRIIb и лиганда ActRIIb.

Образование комплекса между полипептидом ActRII и активином можно выявить с помощью целого ряда способов. Например, модуляция образования комплексов может быть проанализирована количественно, например, с помощью способных к обнаружению меченых белков, например, радиоактивно-меченых (например, ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C или ^3H), флуоресцентно-меченых (например, FITC) или ферментативно-меченых полипептидов ActRIIa или ActRIIb или активина, с помощью иммуноанализа или с помощью

хроматографического определения.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению флуоресцентной поляризации и анализа резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) при измерении, либо напрямую, либо опосредованно, степени взаимодействия между полипептидом ActRII и его связывающим белком. Кроме того, другие способы выявления, например способы на основе оптических волноводов (публикация PCT W0 96/2 6432 и патент США № 5677196), поверхностного плазмонного резонанса (SPR), детекторов поверхностного заряда и детекторов силы поверхностного натяжения, совместимы со многими вариантам осуществления настоящего изобретения.

Более того, в настоящем изобретении рассматривается применение анализа улавливания взаимодействия, также известного как "двугибридный анализ" для идентификации соединений, которые нарушают или потенцируют взаимодействие между полипептидом ActRII и его связывающим белком (см., например, патент США № 5283317; Zervos et al. (1993) *Cell* 72:223-232; Madura et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) *Biotechniques* 14:920-924 и Iwabuchi et al. (1993) *Oncogene* 8:1693-1696). В конкретном варианте осуществления в настоящем изобретении рассматривается применение обратных двугибридных систем для идентификации соединений (например, низкомолекулярных или пептидов), которые разобщают взаимодействия между полипептидом ActRII и его связывающим белком (см., например, Vidal and Legrain, (1999) *Nucleic Acids Res* 27:919-29; Vidal and Legrain, (1999) *Trends Biotechnol* 17:374-81; патенты США №№ 5525490, 5955280 и 5965368.

В некоторых вариантах осуществления рассматриваемые соединения идентифицируют по их способности взаимодействовать с полипептидом ActRII или активином в соответствии с изобретением. Взаимодействие соединения и полипептида ActRIIa, ActRIIb или активина может быть ковалентным или нековалентным. Например, такое взаимодействие может быть идентифицировано на белковом уровне биохимическими методами *in vitro*, в том числе фотопоперечным связыванием, связыванием с радиоактивно-меченым лигандом и аффинной хроматографией (Jakoby W.B. et al., 1974, *Methods in Enzymology* 46:1). В некоторых случаях соединения могут подвергаться скринингу в анализе, основанном на конкретном механизме, например, в анализе для выявления соединений, которые связываются с активином или полипептидом ActRII. Это исследование может включать твердофазное связывание или связывание в жидкой фазе. Альтернативно ген, кодирующий активин или полипептид ActRII, может быть трансфектирован вместе с репортерной системой (например, β -галактозидазой, люциферазой или зеленым флуоресцирующим белком) в клетку и подвергнут скринингу в сравнении с библиотекой, необязательно с помощью высокопроизводительного скрининга, или с помощью отдельных представителей из библиотеки. Могут быть использованы другие анализы связывания, основанные на конкретном механизме, например анализы связывания, которые выявляют изменения свободной энергии. Анализы связывания можно проводить с использованием мишени, фиксированной в лунке, на бусах или чипе, или захваченной иммобилизованным антителом, или разделенной с помощью капиллярного электрофореза. Связанные соединения могут быть выявлены обычно с помощью колориметрического, флуоресцентного или поверхностного плазмонного резонанса.

6. Примеры терапевтического применения.

В некоторых вариантах осуществления антагонисты активин-ActRII (например, полипептиды ActRIIa или ActRIIb) по настоящему изобретению могут быть использованы для повышения уровней эритроцитов у млекопитающих, таких как грызуны и приматы, и, в частности, у пациентов людей. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения или профилактики анемии у индивидуума путем введения этому индивидууму терапевтически эффективного количества антагониста активин-ActRIIa, такого как полипептид ActRIIa, или терапевтически эффективного количества антагониста активин-ActRIIb, например полипептида ActRIIb. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам стимуляции формирования эритроцитов у индивидуума путем введения этому индивидууму терапевтически эффективного количества антагониста активин-ActRII, в частности полипептида ActRII. Эти способы могут быть использованы для терапевтического и профилактического лечения млекопитающих и, в частности, людей.

Как используется в настоящем описании, лекарственное средство, которое "оказывает профилактическое действие" в отношении расстройства или состояния, относится к соединению, которое в статистическом примере снижает частоту возникновения расстройства или состояния в случае лечения по сравнению с контрольным случаем, когда лечение не проводится, или задерживает проявление или снижает тяжесть одного или нескольких симптомов расстройства или состояния по сравнению с контрольным случаем, когда лечение не проводится. Термин "лечение", используемый в настоящем описании, включает профилактику названного состояния, или улучшение, или устранение этого состояния после его установления. В любом случае профилактика или лечение могут рассматриваться в диагностике, проводимой лечащим врачом или другим медицинским работником, и ожидать результат от введения терапевтического средства.

Как показано в настоящем изобретении, антагонисты активин-ActRIIa и антагонисты активин-ActRIIb могут быть использованы для повышения уровней эритроцитов, гемоглобина или ретикулоцитов у здоровых людей, и такие антагонисты могут быть использованы для выбранных групп пациентов.

Примеры соответствующих групп пациентов включают группы с нежелательно низкими уровнями эритроцитов или гемоглобина, например пациентов с анемией и тех, у которых имеется риск развития нежелательно низких уровней эритроцитов или гемоглобина, например пациентов, которых готовят к обширному функциональному вмешательству или другим процедурам, в результате которых может происходить значительная потеря крови. В одном из вариантов осуществления пациенту с достаточными уровнями эритроцитов проводят лечение антагонистом активин-ActRIIa для повышения уровней эритроцитов, а затем берут кровь и хранят для последующего использования при трансфузиях. В одном из вариантов осуществления пациенту с достаточными уровнями эритроцитов проводят лечение антагонистом активин-ActRIIb для повышения уровней эритроцитов, а затем берут кровь и хранят для последующего использования при трансфузиях.

Описанные в настоящем изобретении антагонисты активин-ActRII, и, в частности, белки ActRIIa-Fc и ActRIIb, могут быть использованы для повышения уровней эритроцитов у пациентов с анемией. При наблюдении уровней гемоглобина у людей уровень ниже нормального для соответствующего возраста и пола может быть показателем анемии, хотя во внимание принимаются индивидуальные отличия. Например, уровень гемоглобина 12 г/дл в основном считается нижней границей нормы для всей популяции взрослых людей. Возможные причины включают потерю крови, недостаток питательных веществ, воздействие лекарственной терапии, различные нарушения работы костного мозга и различные заболевания. Более конкретно, анемия была связана с целым рядом нарушений, которые включают, например, хроническую почечную недостаточность, миелодиспластический синдром, ревматоидный артрит, трансплантацию костного мозга. Анемия также может быть связана со следующими состояниями: солидными опухолями (например, раком груди, раком легких, раком кишечника); опухолями лимфатической системы (например, хроническим лимфолейкозом, неходжкинскими и ходжкинскими лимфомами); опухолями гематопоетической системы (например, лейкозом, миелодиспластическим синдромом, множественной миеломой); лучевой терапией; химиотерапией (например, схемы лечения, предусматривающие введение платины); воспалительными и аутоиммунными заболеваниями, в том числе, но ими не ограничиваясь, ревматоидным артритом, другими воспалительными артритами, системной красной волчанкой (СКВ), острыми или хроническими заболеваниями кожи (например, псориазом), воспалительным заболеванием кишечника (например, болезнью Крона и язвенным колитом); острым или хроническим заболеванием почек или недостаточностью, в том числе идиопатическими или конгенитальными состояниями; острым или хроническим заболеванием печени; острым или хроническим кровотечением; ситуации, при которой трансфузия эритроцитов невозможна из-за алло- или аутоантител пациента и/или по религиозным причинам (например, некоторые Свидетели Иеговы); инфекциями (например, малярия, остеомиелит); гемоглобинопатиями, в том числе, например, серповидно-клеточная анемия, талассемии; применение или злоупотребление лекарственными препаратами, например злоупотребление алкоголем; дети с анемией любого генеза во избежание трансфузии и пожилые пациенты или пациенты с лежащим в основе сердечно-легочным заболеванием с анемией, которые не могут получать трансфузии в связи с беспокойством по поводу перегрузки кровообращения.

Пациенты могут получать лечение в режиме дозирования, предназначенном для восстановления у пациента заданного уровня гемоглобина, обычно примерно от 10 г/дл примерно до 12,5 г/дл и обычно примерно 11,0 г/дл (также смотри Jacobs et al. (2000) *Nephrol Dial Transplant* 15, 15-19), хотя более низкие уровни могут снижать побочные эффекты со стороны сердечно-сосудистой системы. Альтернативно уровень гематокрита (процент объема образца крови, занятого клетками) может быть использован в качестве критерия состояния эритроцитов. Уровень гематокрита для здоровых индивидуумов находится в интервале от 41 до 51% для взрослых лиц мужского пола и от 35 до 45% для взрослых лиц женского пола. Заданные уровни гематокрита обычно составляют примерно 30-33%. Более того, уровни гемоглобина/гематокрита изменяются у разных людей. Таким образом, оптимальный уровень гемоглобина/гематокрита может быть индивидуальным для каждого пациента.

Быстрое воздействие на уровни эритроцитов антагонистов активин-ActRIIa, описанных в настоящем изобретении, свидетельствует о том, что механизм действия этих средств отличается от Epo. Соответственно эти антагонисты могут быть использованы для повышения уровней эритроцитов и гемоглобина у пациентов, у которых отсутствует хороший ответ на Epo. Например, антагонист активин-ActRIIa может быть эффективен для пациентов, у которых введения нормальной - повышенной (>300 МЕ/кг/неделя) дозы Epo не приводит в результате к повышению уровня гемоглобина до заданного уровня. Пациенты с неадекватным ответом на Epo отмечены при всех типах анемии, но более высокое число пациентов, не отвечающих на Epo, наблюдалось особенно часто среди больных раком и у пациентов с терминальной стадией заболевания почек. Неадекватный ответ на Epo может быть либо конститутивным (т.е. наблюдаемым при первом лечении с использованием Epo), либо приобретенным (например, наблюдаемым при повторном лечении с использованием Epo).

Антагонисты активин-ActRII также могут быть использованы для лечения пациентов, которые подвержены побочным действиям Epo. Наиболее серьезными побочными эффектами Epo являются чрезмерное повышение уровней гематокрита или гемоглобина и полицитемия. Повышенные уровни гематокрита могут приводить к гипертензии (более конкретно к обострению гипертензии) и сосудистому тромбозу.

Другими побочными эффектами Epo, о которых сообщалось, некоторые из которых относятся к гипертензии, являются головные боли, гриппоподобный синдром, обструкция шунтов, инфаркты миокарда и церебральные судороги вследствие тромбоза, гипертензивная энцефалопатия и аплазия эритроцитов (Singibarti, (1994) *J. Clin Investig* 72 (suppl 6), S36-S43; Horl et al. (2000) *Nephrol Dial Transplant* 15 (suppl 4), 51-56; Delanty et al. (1997) *Neurology* 49, 686-689; Bunn (2002) *N Engl J. Med.* 346(7), 522-523).

7. Фармацевтические композиции.

В некоторых вариантах осуществления антагонисты активин-ActRII (например, полипептиды ActRIIa и ActRIIb) по настоящему изобретению включают в состав композиции с фармацевтически приемлемым носителем. Например, полипептид ActRII можно вводить отдельно или как компонент фармацевтической композиции (терапевтической композиции). Рассматриваемые соединения могут быть введены в состав композиции, предназначенной для введения любым удобным путем и использования у людей или в ветеринарии.

В некоторых вариантах осуществления терапевтический способ по изобретению включает введение композиции системно или местно в виде имплантата или устройства. При введении терапевтическая композиция, используемая в соответствии с изобретением находится, конечно, в апирогенной физиологически приемлемой форме. Терапевтически подходящие средства, отличные от антагонистов активин-ActRII, которые также необязательно могут быть введены в композицию, описанную выше, могут быть введены одновременно или последовательно с рассматриваемыми соединениями (например, полипептидами ActRIIa и ActRIIb) в способах по изобретению.

Обычно антагонисты активин-ActRII вводятся парентерально. Фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, могут содержать один или несколько полипептидов ActRII в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями или стерильными порошками, которые могут быть восстановлены в стерильные инъекционные растворы или дисперсии непосредственно перед применением, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатики, растворенные вещества, которые делают композиции изотоничными с кровью заданного реципиента, или суспендирующие вещества, или загустители. Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут быть использованы в фармацевтических композициях по изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Можно поддерживать соответствующую текучесть, например, используя покрытия, такие как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем использования поверхностно-активных веществ.

Дополнительно композиция может быть инкапсулирована или инъекцирована в форме для доставки в участок ткани-мишени (например, костный мозг). В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению могут включать матрицу, способную доставлять одно или несколько терапевтических соединений (например, полипептиды ActRIIa или ActRIIb) в участок ткани-мишени (например, костный мозг), обеспечивая структуру для развития ткани и оптимально способную к резорбции в организме. Например, матрица может обеспечивать медленное высвобождение полипептидов ActRII. Такие матрицы могут быть сформированы из материалов, используемых в настоящее время для других имплантируемых медицинских применений.

Выбор материала матрицы основан на биосовместимости, биоразлагаемости, механических свойствах, косметическом виде и свойствах поверхности раздела. Конкретное применение рассматриваемых композиций будет зависеть от соответствующего состава. Возможные матрицы для композиций могут представлять собой биоразлагаемый и химически определенный сульфат кальция, трикальция фосфат, гидроксиапатит, полимолочную кислоту и полиангидриды. Другие возможные материалы являются биоразлагаемыми и биологически хорошо охарактеризованными, такими как кость или кожный коллаген. Дополнительно матрицы составлены из чистых белков или компонентов внеклеточного матрикса. Другие возможные матрицы являются биологически неразлагаемыми и химически охарактеризованные, такими как синтерированный гидроксиапатит, биологическое стекло, алюминаты или другие керамические материалы. Матрицы могут состоять из сочетаний любых упомянутых выше типов материала, например полимолочной кислоты и гидроксиапатита или коллагена и трикальция фосфата. Биокерамические материалы могут быть изменены в композиции, например, в кальций-алюминат-фосфате, и обработаны для изменения размера пор, размера частиц, формы частиц и биоразлагаемости.

В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению могут предусматривать пероральное введение, например в форме капсул, саше, пилюль, таблеток, леденцов (используя вкусоароматическую основу, обычно сахарозу и акацию или трагакант), порошков, гранул, или в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости, или в виде жидкой эмульсии масло-в-воде или вода-в-масле, или в виде эликсира или сиропа, или в виде пастилок (используя инертную основу, такую как желатин и глицерин или сахароза и акация), и/или в виде полосканий для полости рта и подобного, каждое содержит заранее определенное количество средства в качестве активного ингредиента. Средство также можно вводить в виде болуса, электуария или пасты.

В твердых лекарственных формах для перорального введения (капсулах, таблетках, пилюлях, драже, порошках, гранулах и подобных) одно или несколько терапевтических соединений по настоящему изобретению могут быть смешаны с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, такими как цитрат натрия или дикальция фосфат, и/или любым из следующего: (1) наполнителями или сухими разбавителями, такими как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; (2) связующими, такими как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или акация; (3) увлажнителями, такими как глицерин; (4) дезинтегрантами, такими как агар-агар, карбонат кальция, картофельный крахмал или тапиока, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия; (5) раствором замедляющих агентов, таких как парафин; (6) усилителями абсорбции, такими как соединения четвертичного аммония; (7) увлажнителями, например, такими как цетиловый спирт и моностеарат глицерина; (8) абсорбентами, такими как каолиновая и бентонитовая глина; (9) смазывающими веществами, такими как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси; и (10) красителями. В случае капсул, таблеток и пилюль, фармацевтические композиции также могут содержать буферные агенты. Твердые композиции аналогичного типа также могут быть использованы в качестве наполнителей в мягких и твердых желатиновых капсулах, используя такие эксципиенты, как лактоза или молочные сахара, а также полиэтиленгликоли высокой молекулярной массы и подобное.

Жидкие лекарственные формы для перорального введения включают фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. Кроме активного ингредиента жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно используемые в этой области, такие как вода или другие растворители, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, масло ростков, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот сорбитана и их смеси. Помимо инертных разбавителей пероральные композиции также могут содержать адъюванты, такие как увлажнители, эмульгаторы и суспендирующие агенты, подсластители, вкусовые добавки, красители, ароматизаторы и консерванты.

Суспензии, кроме активных соединений, могут содержать суспендирующие агенты, такие как этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтиленсорбит и сложные эфиры сорбитана, микрокристаллическую целлюлозу, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант и их смеси.

Композиции по изобретению также могут содержать адъюванты, такие как консерванты, увлажнители, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Предотвращение действия микроорганизмов может быть обеспечено включением различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и подобного. Также может быть желательным включить изотонические агенты, такие как сахара, хлорид натрия и подобные, в композиции. Кроме того, длительная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть вызвана включением агентов, которые задерживают абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Понятно, что режим дозирования будет определяться лечащим врачом с учетом различных факторов, которые модифицируют действие рассматриваемых соединений по изобретению (например, полипептидов ActRIIa и ActRIIb). Различные факторы включают, но ими не ограничиваются, количество эритроцитов у пациента, уровень гемоглобина или другие диагностические показатели, желаемое заданное количество эритроцитов, возраст пациента, пол и рацион питания, тяжесть любого заболевания, которое может вносить вклад в снижение уровня эритроцитов, время введения и другие клинические факторы. Добавление других известных факторов роста к конечной композиции также может влиять на дозу. Прогресс можно контролировать путем периодической оценки уровней эритроцитов и гемоглобина, а также путем оценки уровней ретикулоцитов и других показателей процесса гемопоэза.

Эксперименты с приматами и людьми показали, что действие ActRIIa-Fc на уровне эритроцитов определяется, когда соединение дозируют с интервалами и в количествах, достаточных для достижения сывороточных концентраций примерно 100 нг/мл или более, в течение периода времени по меньшей мере примерно от 20 до 30 дней. Также можно применять дозы для достижения сывороточных уровней 200, 500, 1000 нг/мл или более в течение периода времени по меньшей мере от 20 до 30 дней. Действие на костную ткань может наблюдаться при сывороточных уровнях примерно 200 нг/мл с существенными воздействиями, начиная примерно с 1000 нг/мл или выше, за период времени по меньшей мере примерно от 20 до 30 дней. Таким образом, если желательно достичь воздействия на эритроциты при незначительном воздействии на костную ткань, схема введения дозы может быть составлена для доставки сывороточной концентрации примерно от 100 до 1000 нг/мл за период времени примерно от 20 до 30 дней. У людей сывороточные уровни 200 нг/мл могут достигаться с использованием однократной дозы 0,1 мг/кг или более, а сывороточные уровни 1000 нг/мл могут достигаться с использованием однократной дозы 0,3 мг/кг или более. Наблюдаемый период полужизни в сыворотке этих молекул составляет примерно от 20 до 30 дней, значительно дольше, чем у большинства Fc слитых белков, и, следовательно, может быть достигнут длительный эффективный уровень в сыворотке, например, путем введения дозы примерно от 0,05 до 0,5 мг/кг на еженедельной или двухнедельной основе, или более высокие дозы могут быть ис-

пользованы с более длительными интервалами между введениями доз. Например, дозы от 0,1 до 1 мг/кг могут быть использованы на ежемесячной или двухмесячной основе.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к генной терапии для *in vivo* продукции полипептидов ActRII. Терапевтический эффект такого лечения может достигаться путем введения полинуклеотидных последовательностей ActRIIa или ActRIIb в клетки или ткани, имеющие перечисленные выше нарушения. Доставка полинуклеотидных последовательностей ActRII может достигаться с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, такого как химерный вирус или коллоидная дисперсионная система. Предпочтительным для терапевтической доставки полинуклеотидных последовательностей ActRII является применение нацеленных липосом.

Различные вирусные векторы, которые могут быть использованы для генной терапии, как сообщалось в настоящем изобретении, включают аденовирусы, герпес вирус, вирус оспы или РНК вирус, такой как ретровирус. Ретровирусный вектор может быть производным мышиноного или птичьего ретровируса. Примеры ретровирусных векторов, в которые может быть вставлен единичный чужеродный ген, включают, но ими не ограничиваются, вирус мышиноного лейкоза Молони (MoMuLV), вирус саркомы мышей Харви (HaMuSV), вирус опухоли молочной железы у мышей (MuMTV) и вирус саркомы Рауса (RSV). Целый ряд дополнительных ретровирусных векторов могут заключать в себе множественные гены. Все эти векторы могут переносить или заключать в себе ген для селективируемого маркера, таким образом, чтобы трансдуцированные клетки могли быть идентифицированы и генерированы. Ретровирусные векторы можно сделать специфичными к мишени путем присоединения, например, сахара, гликолипида или белка. Предпочтительное нацеливание осуществляется путем использования антитела. Специалистам в данной области будет понятно, что специфические полинуклеотидные последовательности могут быть вставлены в ретровирусный геном или присоединены к оболочке вируса, для того чтобы была возможность осуществить специфическую доставку к мишени ретровирусного вектора, содержащего полинуклеотид ActRII.

Альтернативно клетки тканевой культуры могут быть непосредственно трансфектированы плазмидами, кодирующими структурные гены ретровирусов gag, pol и env, посредством общепринятой трансфекции с использованием фосфата кальция. Эти клетки затем трансфектируют векторной плазмидой, содержащей интересующие гены. Полученные в результате клетки высвобождают ретровирусный вектор в культуральную среду.

Другая система направленной доставки полинуклеотидов ActRII представляет собой коллоидную дисперсионную систему. Коллоидные дисперсионные системы включают макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросферы, бусы и системы на основе липидов, в том числе эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Предпочтительной коллоидной системой по настоящему изобретению является липосома. Липосомы представляют собой искусственные мембранные везикулы, которые используют в качестве носителей *in vitro* и *in vivo*. РНК, ДНК и интактные вирионы могут быть инкапсулированы в водном внутреннем пространстве и могут быть доставлены в клетки в биологически активной форме (см., например, Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Способы эффективного генного переноса с помощью липосомных носителей известны из уровня техники (см., например, Manino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988). Состав липосом обычно представляет собой сочетание фосфолипидов обычно в комбинации со стероидами, особенно холестерином. Другие фосфолипиды или другие липиды также могут быть использованы. Физические характеристики липосом зависят от pH, ионной силы и присутствия двухвалентных катионов.

Примеры липидов, используемых в получении липосом, включают соединения фосфатидила, такие как фосфатидилглицерин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтанолламин, сфинголипиды, цереброзиды и ганглиозиды. Иллюстративные фосфолипиды включают яичный фосфатидилхолин, дилпальмитоилфосфатидилхолин и дистеароилфосфатидилхолин.

Нацеливание липосом также возможно, например, исходя из органной специфичности, клеточной специфичности и специфичности органелл, и известно из уровня техники.

Примеры

Изобретение, описанное в общем виде, будет более понятно со ссылкой на следующие примеры, которые приведены лишь с целью иллюстрации некоторых вариантов осуществления и вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначены для ограничения этого изобретения.

Пример 1. Слитые белки ActRIIa-Fc.

Заявители сконструировали растворимый слитый белок ActRIIa, который имеет внеклеточный домен ActRIIa человека, слитый с доменом Fc человека или мыши с минимальным линкером между ними. Эти конструкции были обозначены как ActRIIa-hFc и ActRIIa-mFc соответственно.

ActRIIa-hFc, представлен ниже, в очищенной форме из клеточных линий CHO (SEQ ID NO:7)

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTVGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGC
 WLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPREPQVYV
 LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

Белки ActR1Ia-hFc и ActR1Ia-mFc экспрессировали в клеточных линиях CHO. Рассматривали три различные лидерные последовательности:

- (i) меллитина медоносной пчелы (HBML): MKFLVNVVALVFMWYISYIYA (SEQ ID NO:8);
- (ii) активатора тканевого плазминогена (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO:9);
- (iii) нативную: MGAAAKLAFVFLISCSGA (SEQ ID NO:10).

В выбранной форме используется TPA лидер, и она имеет следующую непроцессированную аминокислотную последовательность:

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTVGVEPCYGD
 KDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSY
 FPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPVPPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSPREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO:13).

Этот полипептид кодируется следующей последовательностью нуклеиновых кислот:

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGAGCAGTCTTCG
 TTTCGCCCGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTTTAATGCTAA
 TTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACG
 GCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCATGAATAGTGAACAAGTTGT
 TGGCTGGATGATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAA
 GTATATTTCTGTTGTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTATTTTCGGGAGATG
 GAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGAACCTCAC
 ACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCCTTCCCCCA
 AAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG
 AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
 AAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCCTCACCGTCC
 CTGACACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA
 GTCCCATCGAGAAAACATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACACAGGTGTACACC
 CTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
 TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGGAGAAACAATACAAG
 ACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTATAGCAAGCTACCGTGGAC
 AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC
 CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGAGAATTC (SEQ ID
 NO:14).

Как ActR1Ia-hFc, так и ActR1Ia-mFc были заметно подвержены рекомбинантной экспрессии. Как показано на фиг. 1, белок был очищен в виде одиночного хорошо различимого пика белка. N-концевая последовательность продемонстрировала одиночную последовательность - ILGRSTQE (SEQ ID NO:11). Очистка достигалась серий стадий колоночной хроматографии, в том числе, например, трех или более из следующих, в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография с Q сепфарозой, хроматография с фенилсепфарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистка может быть завершена фильтрацией вирусов и сменой буфера. Белок ActR1Ia-hFc очищали до чистоты >98% по данным эксклюзионной хроматографии и >95% по данным SDS PAGE.

ActR1Ia-hFc и ActR1Ia-mFc демонстрировали высокую аффинность к лигандам, в частности к активину А. GDF-11 или активин А ("ActA") иммобилизовали на чипе Biacore CM5 с использованием стандартной процедуры аминного связывания. Белки ActR1Ia-hFc и ActR1Ia-mFc загружали в систему, и измеряли связывание. ActR1Ia-hFc связывался с активинном с константой диссоциации (K_D) 5×10^{12} , и этот белок связывается с GDF11 с K_D $9,96 \times 10^{-9}$ (см. фиг. 2). ActR1Ia-mFc вел себя аналогично.

ActR1Ia-hFc был очень стабильным в фармакокинетических исследованиях. Крысам вводили дозу 1, 3 или 10 мг/кг белка ActR1Ia-hFc, и плазменные уровни этого белка измеряли на 24, 48, 72, 144 и 168 ч. В отдельном исследовании крысам вводили дозу 1, 10 или 30 мг/кг. У крыс период полужизни в сыворотке

ActRIIa-hFc составил 11-14 дней, и уровни в кровотоке лекарственного средства были достаточно высокими через две недели (11, 110 или 304 мкг/мл для начальных введений 1, 10 или 30 мг/кг соответственно.) У яванских макаков период полужизни в плазме значительно превышал 14 дней, и уровни в кровотоке этого лекарственного средства составили 25, 304 или 1440 мкг/мл для начальных введений 1, 10 или 30 мг/кг соответственно.

Пример 2. ActRIIa-hFc повышает уровни эритроцитов у нечеловекообразных приматов.

В этом исследовании использовали четыре группы из пяти самцов и пяти самок яванских макаков в каждой, у трех особей каждого пола на группу по схеме предусматривалось завершение на 29 день, и у двух особей каждого пола на группу по схеме предусматривалось завершение на 57 день. Каждому животному вводили носитель (группа I) или ActRIIa-hFc в дозе 1, 10, или 30 мг/кг (группы 2, 3 и 4 соответственно) путем внутривенной (IV) инъекции на 1, 8, 15 и 22 день. Величину дозы поддерживали на уровне 3 мл/кг. Различные показатели уровней эритроцитов оценивали за два дня до первого введения и на 15, 29 и 57 день (для оставшихся двух животных) после первого введения.

ActRIIa-hFc вызывает статистически значимые повышения параметров эритроцитов в среднем (количество эритроцитов [RBC], гемоглобин [HGB] и гематокрит [HCT]) у самцов и самок, на всех уровнях доз и во всех моментах времени на протяжении всего исследования, что сопровождалось повышениями абсолютного и относительного количества ретикулоцитов (ARTC; RTC) (см. фиг. 3-6).

Статистическую значимость рассчитывали для каждой испытуемой группы относительно среднего для испытуемой группы на исходном уровне.

Отмечено, что повышения количеств эритроцитов и уровней гемоглобина приблизительно эквивалентны по значению эффектам, о которых сообщалось в отношении эритропоэтина. Эти эффекты проявляются быстрее с ActRIIa-hFc, чем с эритропоэтином.

Аналогичные результаты наблюдались у крыс и мышей.

Пример 3. ActRIIa-hFc повышает уровни эритроцитов у пациентов людей.

Слитый белок ActRIIa-hFc, описанный в примере 1, вводили пациентам людям в рандомизированном двойном слепом плацебо контролируемом испытании, которое проводили для оценки, в первую очередь, безопасности этого белка у здоровых женщин в период постменопаузы. 48 пациентов разделяли на группы случайным образом по 6 человек для введения либо однократной дозы ActRIIa-hFc, либо плацебо (5 активное вещество:1 плацебо). Уровни доз находились в диапазоне от 0,01 до 3,0 мг/кг внутривенно (IV) и от 0,03 до 0,1 мг/кг подкожно (SC). За всеми пациентами наблюдали в течение 120 дней. Дополнительно к фармакокинетическим (ПК) анализам также оценивали биологическую активность ActRIIa-hFc путем измерения биохимических маркеров образования и резорбции кости и уровней FSH.

Для обнаружения возможных изменений гемоглобин и количество эритроцитов изучали подробно у всех пациентов на протяжении всего исследования и сравнивали с исходными уровнями. Количество тромбоцитов сравнивали на протяжении того же времени в качестве контроля. Не было клинически значимых изменений по сравнению с исходными значениями на протяжении периода времени в отношении количества тромбоцитов.

ПК-анализ ActRIIa-hFc показал линейный профиль в зависимости от дозы, и средний период полужизни составил приблизительно 25-32 дня. Площадь под кривой (AUC) для ActRIIa-hFc была линейнозависима от дозы, и абсорбция после SC введения дозы, по существу, была полной (см. фиг. 7 и 8). Эти данные указывают на то, что SC является желательным подходом для введения дозы, поскольку обеспечивает эквивалентную биодоступность и период полужизни в сыворотке для этого лекарственного средства, избегая пиков сывороточных концентраций лекарственного средства, связанных с первыми несколькими днями введения дозы внутривенно (IV) (см. фиг. 8). ActRIIa-hFc вызывал быстрое, длительное дозозависимое повышение сывороточных уровней щелочной фосфатазы, специфичной к костной ткани (BAP), которая является маркером анаболического роста кости, и дозозависимое снижение уровней C-концевого телопептида коллагена 1 типа и тартрат-резистентной кислой фосфатазы 5b, которые являются маркерами резорбции кости. Другие маркеры, такие как PINP, показали результаты, не позволяющие сделать окончательные выводы. Уровни BAP показали почти насыщающие эффекты при наивысших дозах лекарственного средства, указывая на то, что половина максимального воздействия на этот анаболический костный биомаркер может достигаться при дозе 0,3 мг/кг с повышением диапазона вплоть до 3 мг/кг. Рассчитанная как отношение фармакодинамического эффекта к AUC для лекарственного средства, EC50 составляет 51,465 (день×нг/мл) (см. фиг. 9). Эти изменения костного биомаркера были непрерывными на протяжении приблизительно 120 дней при наивысших тестируемых уровнях доз. Также было дозозависимое снижение сывороточных уровней FSH, соответствующее ингибированию активина.

В целом было очень небольшое не связанное с лекарственным средством снижение гемоглобина на протяжении первой недели исследования, возможно связанное с исследованием флеботомии в группах, получающих 0,01 и 0,03 мг/кг внутривенно или подкожно. Результаты по гемоглобину в группе, получающей 0,1 мг/кг SC и IV, были стабильными или демонстрировали умеренные повышения к 8-15 дню. При уровне дозы 0,3 мг/кг, введенной внутривенно (IV), было очевидное повышение уровней HGB, видимое уже на 2 день и зачастую достигающее максимума на 15-29 день, что не наблюдалось у пациентов, получающих плацебо. В этот момент исследования это изменение не достигло статистической значимо-

сти.

В целом ActRIIa-hFc показал дозозависимый эффект в отношении количества эритроцитов и количества ретикулоцитов. Суммарные результаты гематологических изменений показаны на фиг. 10-13.

Пример 4. Альтернативные белки ActRIIa-Fc.

Целый ряд вариантов ActRIIa, которые могут быть использованы в соответствии со способами, описанными в настоящем изобретении, описаны в международной патентной заявке, опубликованной как WO 2006/012627 (см., например, с. 55-58), приведенной в описании в качестве ссылки в полном объеме. Альтернативная конструкция может иметь делецию С-концевого фрагмента (последние 15 аминокислот внеклеточного домена ActRIIa. Эта последовательность для такой конструкции представлена ниже (Fc часть подчеркнута))(SEQ ID NO:12):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGC
WLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMTGGGTHTCPPELGGPS
VFLFPPKPKDITLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCSV
HEALHNHYTQKSLSLSPGK.

Пример 5. Слитые белки ActRIIb-Fc.

Заявители сконструировали растворимый слитый белок ActRIIb, который имеет внеклеточный домен ActRIIb человека, слитый с Fc-доменом человека. Совместная кристаллическая структура активина и внеклеточного ActRIIb не продемонстрировала какой-либо роли концевых (С-концевых) 15 аминокислот (называемых здесь "концевым фрагментом") внеклеточного домена в лигандном связывании. Эта последовательность не образует кристаллическую структуру, что дает возможность предположить, что эти остатки находятся в гибкой петле, которая не упакована однородно в кристалле (Thompson et al. EMBO J. 2003 Apr 1; 22 (7):1555-66). Эта последовательность также мало консервативна между ActRIIb и ActRIIa. Соответственно эти остатки были пропущены в основной, или исходной, слитой конструкции ActRIIb-Fc. Дополнительно положение 64 в исходной форме занято аланином, который в основном считается формой "дикого типа", хотя аллель A64R встречается в природе. Таким образом, исходное слияние ActRIIb-Fc имеет последовательность (Fc часть подчеркнута)(SEQ ID NO:20):

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHICYASWANSSGTIELVKKG
CWLDDFNICYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGGTHTCPPELGGPS
VFLFPPKPKDITLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCSV
HEALHNHYTQKSLSLSPGK.

Неожиданно было обнаружено, что С-концевой фрагмент усиливает связывание активина с GDF-11, следовательно, предпочтительный вариант ActRIIb-Fc имеет последовательность (Fc часть подчеркнута)(SEQ ID NO:21):

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHICYASWANSSGTIELVKKG
CWLDDFNICYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTH
TCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDITLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
KSRWQOQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK.

Целый ряд вариантов ActRIIb, которые могут быть использованы в соответствии с описанными здесь способами, описан в международной патентной заявке, опубликованной как WO 2006/012627 (см., например, с. 59, 60), приведенной в описании в качестве ссылки в полном объеме.

Пример 6. ActRIIb-hFc стимулирует эритропоз у нечеловекообразных приматов.

ActRIIb-hFc (IgG1) вводили один раз в неделю в течение 1 месяца самцам и самкам яванских макаков путем подкожной инъекции. 48 яванских макаков (24/на пол) распределяли на 4 испытываемые группы (6 животных/пол/группа), и им вводили подкожно либо носитель, либо ActRIIb-hFc в дозе 3, 10 или 30 мг/кг раз в неделю в течение 4 недель (всего 5 доз). Оцениваемые параметры включали общую клиническую патологию (гематологию, клиническую химию, коагуляцию и анализ мочи). ActRIIb-hFc вызывал статистически значимое повышение абсолютных средних величин ретикулоцитов к 15 дню у животных, получающих лечение. К 36 дню ActRIIb-hFc вызывал некоторые гематологические изменения, в том числе повышенное среднее абсолютное количество ретикулоцитов и распределение эритроцитов в широких значениях, и более низкую среднюю концентрацию корпускулярного гемоглобина. Были затронуты все испытываемые группы обоих полов. Эти эффекты совпадают с положительным действием ActRIIb-hFc на высвобождение незрелых ретикулоцитов из костного мозга. Этот эффект был обратимым после вымыва-

ния лекарственного средства из организма испытуемых животных (к 56 дню исследования). В соответствии с этим авторы изобретения делают вывод о том, что ActRIIb-hFc стимулирует эритропоэз.

Включение в качестве ссылки

Все публикации и патенты, упомянутые в настоящем описании, включены в качестве ссылки в полном объеме, как если бы было особо оговорено и отдельно указано, что каждая отдельная публикация или патент включены в качестве ссылки.

Хотя были рассмотрены конкретные варианты осуществления объекта изобретения, представленное выше описание является иллюстрирующим и неограничивающим. Многие варианты будут очевидны специалистам в данной области после ознакомления с настоящим описанием и представленной ниже формулой изобретения. Полный объем изобретения должен определяться ссылкой на формулу изобретения наряду с полным объемом их эквивалентов и описанием наряду с вариантами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение полипептида, который ингибирует опосредованный активинном сигнальный путь, в качестве лекарственного средства для повышения уровня гемоглобина, повышения уровня гематокрита или повышения уровня ретикулоцитов, которое включает введение пациенту указанного полипептида,

где указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

- a) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:2;
- b) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:3;
- c) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:16; и
- d) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:17.

2. Применение полипептида, который ингибирует опосредованный активинном сигнальный путь, в качестве лекарственного средства для стимуляции эритропоэза, которое включает введение пациенту указанного полипептида,

где указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

- a) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:2;
- b) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:3;
- c) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:16; и
- d) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:17.

3. Применение по п.1 или 2, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO:2.

4. Применение по п.1 или 2, где полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2.

5. Применение по п.1 или 2, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO:3.

6. Применение по п.1 или 2, где полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3.

7. Применение по п.1 или 2, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO:16.

8. Применение по п.1 или 2, где полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16.

9. Применение по п.1 или 2, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO:17.

10. Применение по п.1 или 2, где полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17.

11. Применение по любому из пп.1-10, в котором указанный полипептид представляет собой слитый белок, содержащий один или несколько гетерологичных частей, которые улучшают одно или несколько из стабильности *in vivo*, периода полужизни *in vivo*, локализации или распределения в ткани, образования белковых комплексов и/или очистки.

12. Применение по п.11, в котором указанный слитый белок включает полипептидную часть, выбранную из Fc-домена иммуноглобулина и сывороточного альбумина.

13. Применение по п.12, где Fc-домен иммуноглобулина представляет собой Fc-домен IgG1.

14. Применение по п.12 или 13, где полипептид представляет собой Fc-слитый белок, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из:

- a) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:7;
- b) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:12;

с) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:20; и

d) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:21.

15. Применение по п.14, где слитый Fc белок содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO:7.

16. Применение по п.14, где слитый Fc белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7.

17. Применение по п.14, где слитый Fc белок содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO:12.

18. Применение по п.14, где Fc слитый белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

19. Применение по п.14, где слитый Fc белок содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO:20.

20. Применение по п.14, где Fc слитый белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20.

21. Применение по п.14, где слитый Fc белок содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO:21.

22. Применение по п.14, где Fc слитый белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21.

23. Применение по любому из пп.1-22, в котором указанный полипептид содержит одну или несколько модифицированных аминокислотных остатков, выбранных из гликозилированной аминокислоты, ПЭГилированной аминокислоты, фарнезилированной аминокислоты, ацетилированной аминокислоты, биотинилированной аминокислоты, аминокислоты, конъюгированной с липидной частью.

24. Применение по любому из пп.1-23, где полипептид имеет одну или несколько следующих характеристик:

i) связывает лиганд ActRII со значением K_D , равным 10^{-7} ; и

ii) ингибирует сигнальный путь ActRII в клетке.

25. Применение по любому из пп.1-24, где полипептид связывается с активином А.

26. Применение по любому из пп.1-25, где полипептид вызывает повышение скелетной мышечной массы у пациента по меньшей мере на 15%.

27. Применение по любому из пп.1-26, где пациент страдает анемией.

28. Применение по п.27, где анемией является анемия при множественной миеломе.

29. Применение по п.27, где анемией является анемия с миелодиспластическим синдромом.

30. Применение по п.27, где анемией является анемия при талассемии.

31. Применение по п.27, где анемией является анемия при хронической почечной недостаточности.

32. Применение по п.27, где анемией является анемия при острой почечной недостаточности.

33. Применение по п.27, где анемией является анемия при конечной стадии почечного заболевания.

34. Применение по п.1, где применение предназначено для повышения уровня гемоглобина у пациента.

35. Применение по п.1, где применение предназначено для повышения уровня гематокрита у пациента.

36. Применение по п.1, где применение предназначено для повышения уровня ретикулоцитов у пациента.

37. Применение полипептида, который ингибирует опосредованный активином сигнальный путь, для получения лекарственного средства для повышения уровня гемоглобина, повышения уровня гематокрита или повышения уровня ретикулоцитов у пациента,

где полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

a) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 или 95% идентична SEQ ID NO:2;

b) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 или 95% идентична SEQ ID NO:3;

c) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 или 95% идентична SEQ ID NO:16;

d) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 или 95% идентична SEQ ID NO:17;

e) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 или 95% идентична SEQ ID NO:7;

f) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 или 95% идентична SEQ ID NO:12;

g) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 или 95% идентична SEQ ID NO:20; и

h) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 или 95% идентична SEQ ID NO:21.

38. Применение полипептида, который ингибирует опосредованный активинном сигнальный путь, для получения лекарственного средства для индукции эритропоэза у пациента,

где полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

a) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 или 95% идентична SEQ ID NO:2;

b) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 или 95% идентична SEQ ID NO:3;

c) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 или 95% идентична SEQ ID NO:16;

d) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 или 95% идентична SEQ ID NO:17;

e) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 или 95% идентична SEQ ID NO:7;

f) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 или 95% идентична SEQ ID NO:12;

g) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 или 95% идентична SEQ ID NO:20; и

h) аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90 или 95% идентична SEQ ID NO:21.

39. Применение полипептида, который ингибирует опосредованный активинном сигнальный путь, для получения лекарственного средства для повышения уровня гемоглобина, повышения уровня гематокрита или повышения уровня ретикулоцитов у пациента,

где указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

a) аминокислотной последовательности, которая на 100% идентична SEQ ID NO:2;

b) аминокислотной последовательности, которая на 100% идентична SEQ ID NO:3;

c) аминокислотной последовательности, которая на 100% идентична SEQ ID NO:16;

d) аминокислотной последовательности, которая на 100% идентична SEQ ID NO:17;

e) аминокислотной последовательности, которая на 100% идентична SEQ ID NO:7;

f) аминокислотной последовательности, которая на 100% идентична SEQ ID NO:12;

g) аминокислотной последовательности, которая на 100% идентична SEQ ID NO:20; и

h) аминокислотной последовательности, которая на 100% идентична SEQ ID NO:21.

40. Применение полипептида, который ингибирует опосредованный активинном сигнальный путь, для получения лекарственного средства для стимуляции эритропоэза у пациента,

где указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

a) аминокислотной последовательности, которая на 100% идентична SEQ ID NO:2;

b) аминокислотной последовательности, которая на 100% идентична SEQ ID NO:3;

c) аминокислотной последовательности, которая на 100% идентична SEQ ID NO:16;

d) аминокислотной последовательности, которая на 100% идентична SEQ ID NO:17;

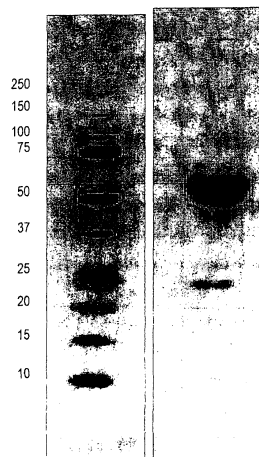
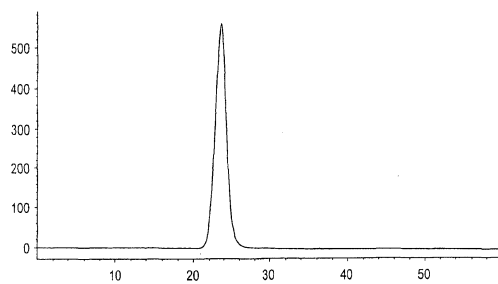
e) аминокислотной последовательности, которая на 100% идентична SEQ ID NO:7;

f) аминокислотной последовательности, которая на 100% идентична SEQ ID NO:12;

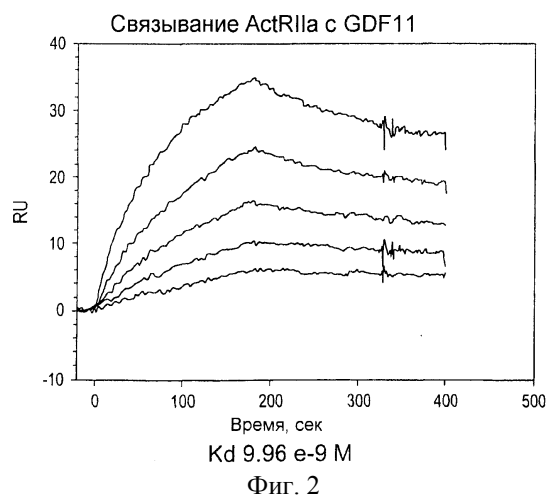
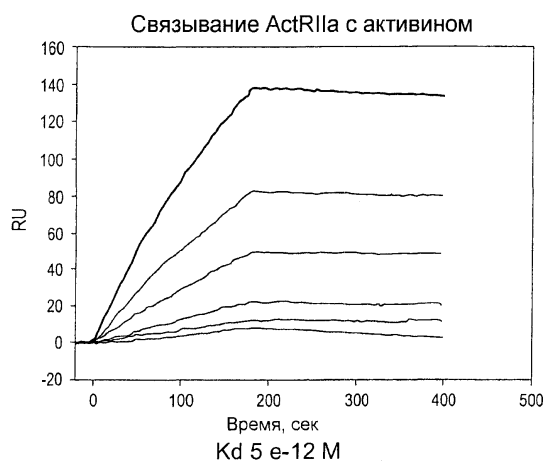
g) аминокислотной последовательности, которая на 100% идентична SEQ ID NO:20; и

h) аминокислотной последовательности, которая на 100% идентична SEQ ID NO:21.

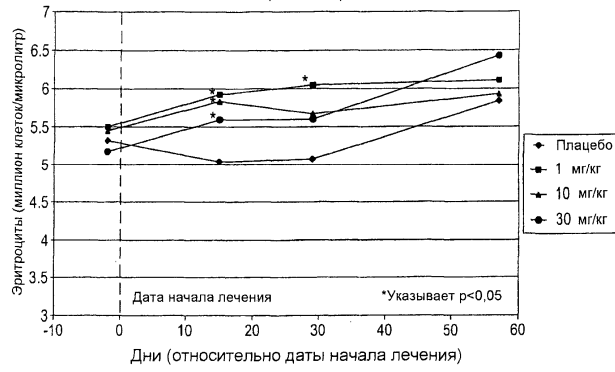
035911



Фиг. 1

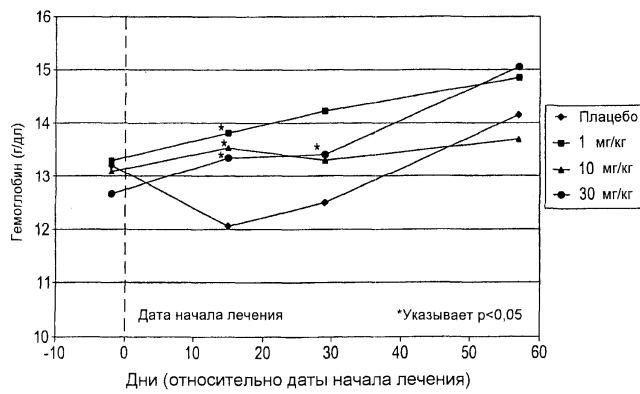


Действие ActRIIA-Fc на количество эритроцитов у самок нечеловекообразных приматов



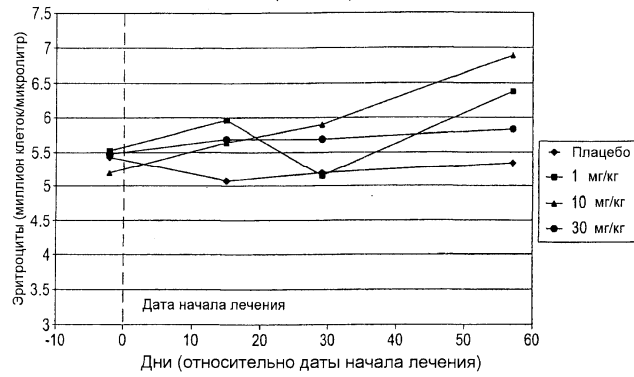
Фиг. 3А

Действие ActRIIA-Fc на гемоглобин у самок нечеловекообразных обезьян



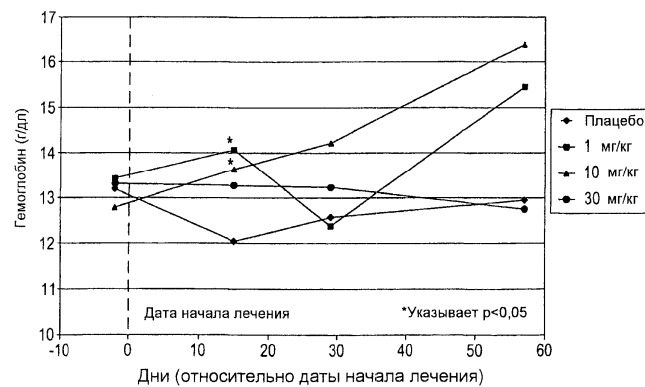
Фиг. 3В

Действие ActRIIA-Fc на количество эритроцитов у самцов нечеловекообразных приматов



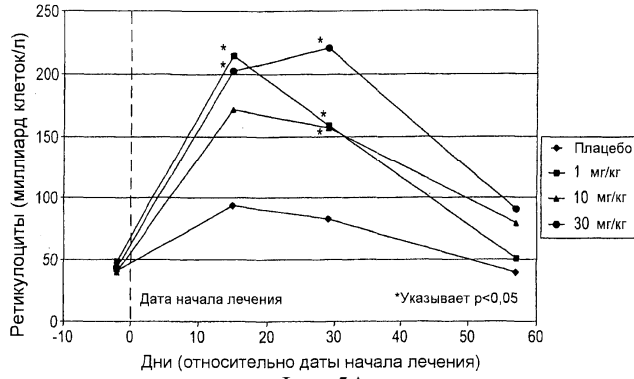
Фиг. 4А

Действие ActRIIA-Fc на гемоглобин у самцов нечеловекообразных обезьян



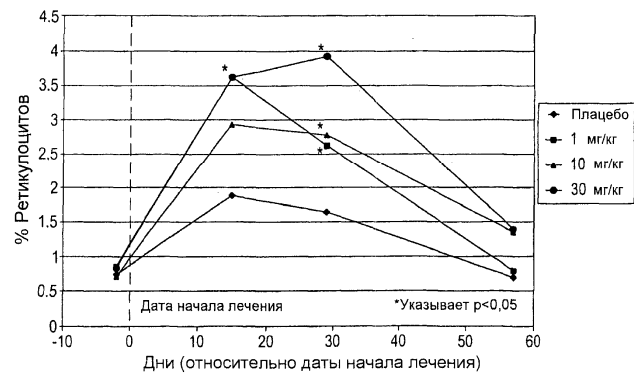
Фиг. 4В

Действие ActRIIA-Fc на количество ретикулоцитов у самок нечеловекообразных приматов



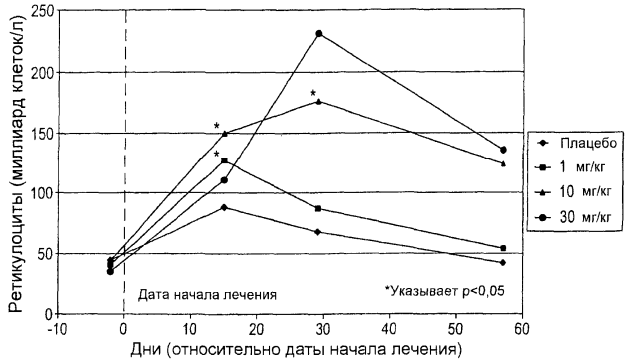
Фиг. 5А

Действие ActRIIA-Fc на процентное содержание ретикулоцитов у самок нечеловекообразных приматов



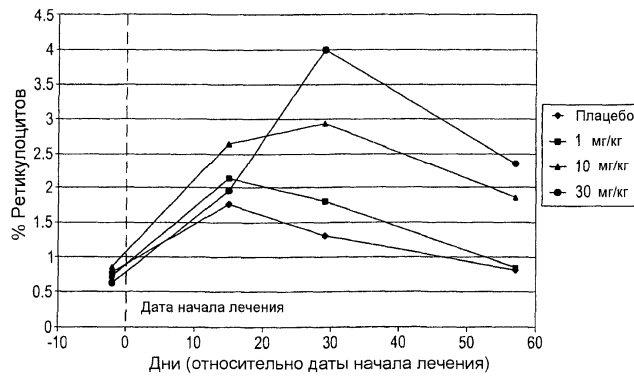
Фиг. 5В

Действие ActRIIA-Fc на количество ретикулоцитов у самцов нечеловекообразных приматов



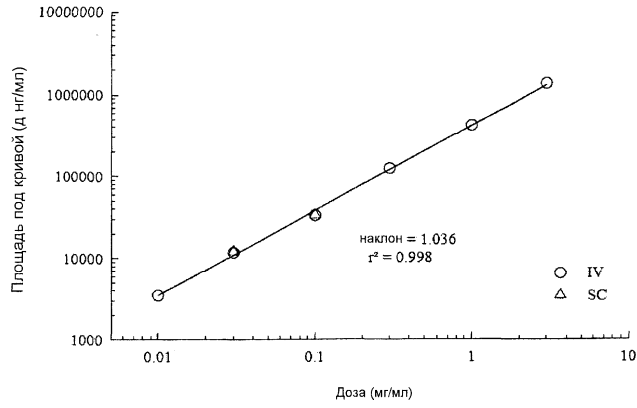
Фиг. 6А

Действие ActRIIA-Fc на процентное содержание ретикулоцитов у самцов нечеловекообразных приматов

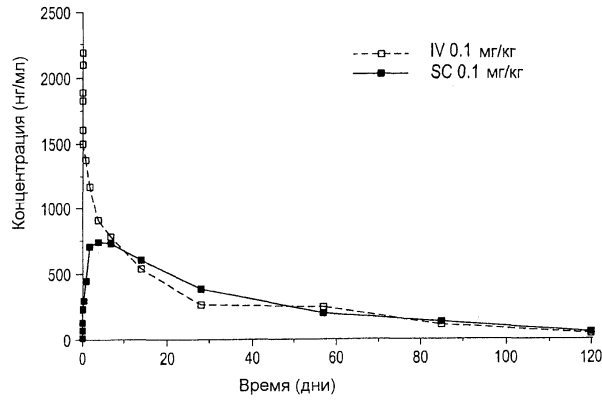


Фиг. 6В

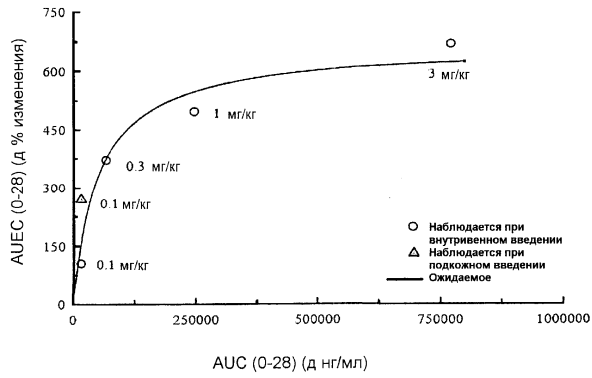
035911



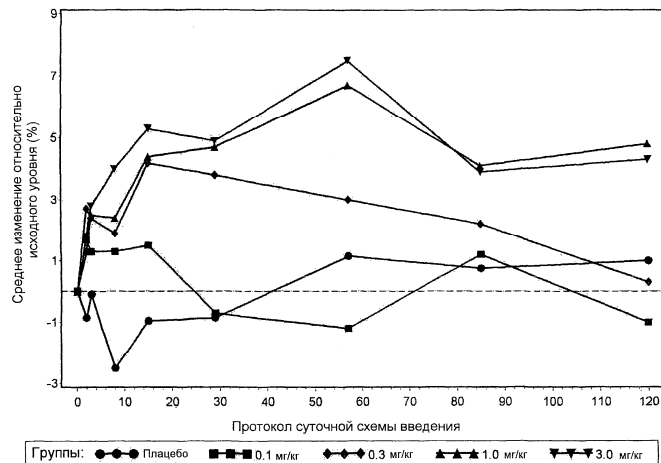
Фиг. 7



Фиг. 8

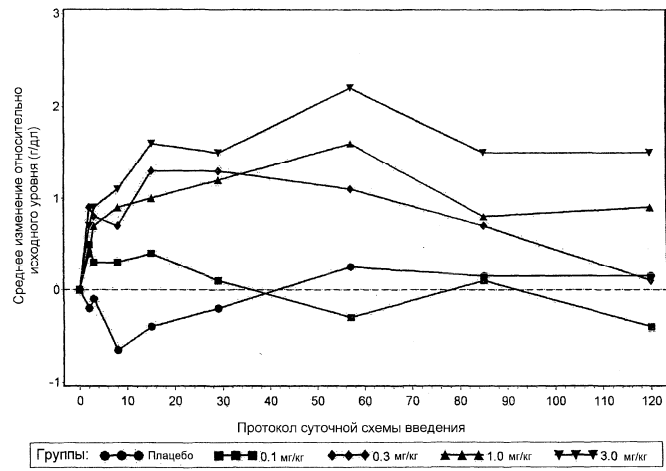


Фиг. 9



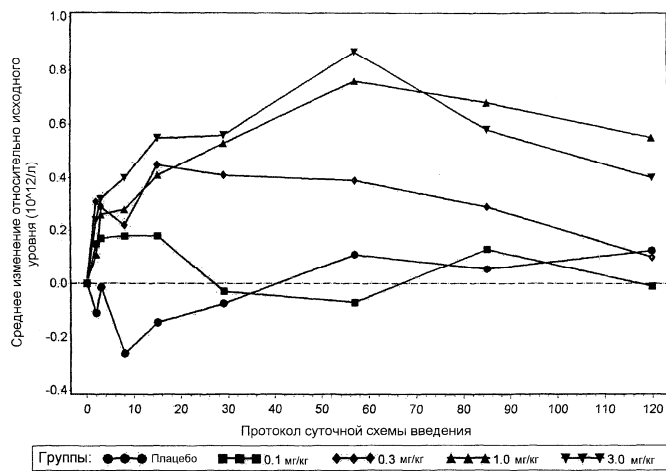
Фиг. 10

Среднее изменение и диапазон изменений относительно исходного уровня при внутривенном введении – гемоглобин



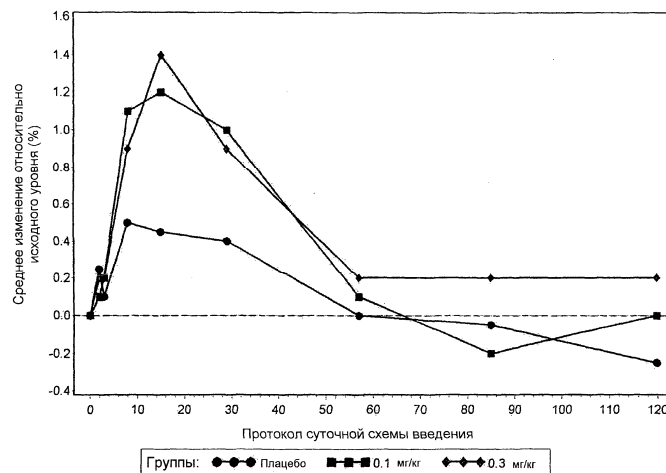
Фиг. 11

Среднее изменение и диапазон изменений относительно исходного уровня при внутривенном введении – эритроциты



Фиг. 12

Среднее изменение относительно исходного уровня – количество ретикулоцитов (%)



Фиг. 13

