

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090053 (13) A2

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.04.30

(51) Int. Cl. A61K 38/18 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2012.10.17

(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НЕЭФФЕКТИВНОГО ЭРИТРОПОЭЗА

(31) 61/547,932

(32) 2011.10.17

(33) US

(62) 201490809; 2012.10.17

(71) Заявитель:
АКСЕЛЕРОН ФАРМА ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Сихра Джасбир, Пирсалл Роберт
Скотт, Кумар Равиндра, Сурагани
Нага Венката Саи раджасекхар (US)

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

(57) Настоящее изобретение относится к способам лечения неэффективного эритропоэза у пациента, включающим введение пациенту полипептида ActRIIB, по меньшей мере на 90% идентичного последовательности из 109 аминокислот SEQ ID NO: 1, где указанный полипептид содержит кислотную аминокислоту в положении 79.

202090053

A2

A2

202090053

СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НЕЭФФЕКТИВНОГО ЭРИТРОПОЭЗАПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Для настоящей заявки испрашивается приоритет по предварительной заявке США, регистрационный № 61/547932, поданной 17 октября 2011 года. Вся информация в вышеуказанной заявке включена в настоящий документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Зрелый эритроцит, или эритроцит, отвечает за транспорт кислорода в кровеносной системе позвоночных. Эритроциты содержат высокие концентрации гемоглобина, белка, который связывает кислород в легких при относительно высоком парциальном давлении кислорода (pO_2) и доставляет кислород к областям организма с относительно низким pO_2 .

Зрелые эритроциты образуются из плюрипотентных гематопоэтических стволовых клеток в процессе, который называется эритропоэз. Постнатальный эритропоэз главным образом происходит в костном мозге и в красной пульпе селезенки. Скоординированное действие различных путей передачи сигнала контролирует баланс клеточной пролиферации, дифференцировки, выживания и смерти. В нормальных условиях эритроциты производятся со скоростью, которая поддерживает постоянную массу красных клеток в организме, и выработка может увеличиваться или снижаться в ответ на различные стимулы, в том числе повышенное или пониженное давление кислорода или потребности тканей. Процесс эритропоэза начинается с формирования линии дифференцировки компетентных клеток-предшественников и проходит через серии различных типов клеток-предшественников. На конечных этапах эритропоэза образуются ретикулоциты, которые высвобождаются в кровоток и теряют свои митохондрии и рибосомы, приобретая морфологию зрелого эритроцита. Повышенный уровень ретикулоцитов или повышенное соотношение ретикулоцитов/эритроцитов в крови указывает на повышенную скорость выработки эритроцитов.

Эритропоэтин (ЕРО) широко известен как наиболее значимый

положительный регулятор постнатального эритропоэза у позвоночных. ЕРО регулирует компенсаторный эритропоэтический ответ на сниженное давление кислорода в тканях (гипоксию) и низкие уровни эритроцитов или низкие уровни гемоглобина. У людей повышенные уровни ЕРО способствуют образованию эритроцитов за счет стимуляции образования эритроидных клеток-предшественников в костном мозге и селезенке. У мышей ЕРО усиливает эритропоэз главным образом в селезенке.

Эффекты ЕРО опосредуются через рецептор клеточной поверхности, принадлежащий к суперсемейству рецепторов цитокинов. Ген рецептора ЕРО человека кодирует трансмембранный белок из 483 аминокислот, в то время как активный рецептор ЕРО как полагают, существует в виде мультимерного комплекса, даже в отсутствие лиганда (См. патент США № 6319499). Клонированный полноразмерный рецептор ЕРО, экспрессирующийся в клетках млекопитающих, связывает ЕРО с аффинностью, сходной с аффинностью нативного рецептора на эритроидных клетках-предшественниках. Связывание ЕРО с его рецептором вызывает конформационное изменение, которое приводит к активации рецептора и биологическим эффектам, включая повышенную пролиферацию незрелых эритробластов, повышенную дифференцировку незрелых эритробластов и сниженный апоптоз эритроидных клеток-предшественников (Liboi et al, 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:11351-11355; Koury et al, 1990, Science 248:378-381).

Врачи применяют различные формы рекомбинантного ЕРО для повышения уровней эритроцитов при ряде клинических состояний, и в частности, для лечения анемии. Анемия, в широком понимании этого слова, представляет собой состояние, которое характеризуется более низкими, чем в норме, уровнями гемоглобина или эритроцитов в крови. В некоторых случаях анемия вызвана первичным нарушением выработки или продолжительности жизни эритроцитов. Более часто анемия является вторичной по отношению к заболеваниям других систем (Weatherall & Provan (2000) 355 Lancet 1169-1175). Анемия может являться результатом сниженной скорости выработки или повышенной скорости разрушения эритроцитов или результатом потери эритроцитов из-за

кровотечения. Анемия может являться результатом ряда нарушений, которые включают, например, хроническую почечную недостаточность, лечение химиотерапевтическими препаратами, миелодисплазию, ревматоидный артрит и пересадку костного мозга.

Лечение ЕРО, как правило, вызывает повышение гемоглобина приблизительно на 1-3 г/дл у здоровых людей в течение недели. При введении индивидуумам с анемией, эта схема лечения часто обеспечивает значительное увеличение уровней гемоглобина и эритроцитов и приводит к улучшению качества жизни и продлению выживаемости. ЕРО не является одинаково эффективным, и многие индивидуумы невосприимчивы даже к высоким дозам (Horl et al. (2000) *Nephrol Dial Transplant* 15, 43-50). Более чем 50% пациентов со злокачественной опухолью имеют неадекватный ответ на ЕРО, приблизительно 10% с терминальной стадией почечной недостаточности имеют низкий ответ (Glaspy et al. (1997) *J Clin* 15 *Oncol* 1218-1234; Demetri et al. (1998) *J Clin* 16 *Oncol* 3412-3425), и менее чем 10% с миелодиспластическим синдромом имеют благоприятный ответ (Estey (2003) *Curr Opin Hematol* 10, 60-67). Несколько факторов, в том числе воспаление, дефицит железа и витаминов, нарушенный диализ, токсичное воздействие алюминия и гиперпаратиреоз могут предсказывать плохой терапевтический ответ. Молекулярные механизмы устойчивости к ЕРО до настоящего времени неясны. Недавнее исследование позволяет предположить, что более высокие дозы ЕРО могут быть ассоциированы с повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний, ростом опухоли и смертностью в некоторых популяциях пациентов (Krapf et al, 2009, *Clin J Am Soc Nephrol* 4:470-480; Glaspy, 2009, *Annu Rev Med* 60: 181-192). Таким образом, рекомендуется, чтобы терапевтические соединения на основе ЕРО (эритропоэтин-стимулирующие агенты, ESA) вводили в наименьшей дозе, достаточной для того, чтобы избежать необходимости переливания эритроцитов (Jelkmann et al, 2008, *Crit Rev Oncol. Hematol* 67:39-61).

Неэффективный эритропоэз представляет собой термин, который используют для описания группы эритроидных нарушений, при которых выработка эритроцитов снижена, несмотря на усиление

ранних стадий эритропоэза (см., например, Tanno, 2010, Adv Nematol 2010:358283). Неэффективный эритропоэз часто приводит к возникновению анемии, повышенным уровням эритропоэтина, образованию избыточного количества предшественников эритроцитов и перегрузке железом. Эти симптомы, в свою очередь, могут приводить к спленомегалии, заболеваниям печени и сердца и повреждению костей, а также к другим осложнениям. Поскольку уровни эндогенного эритропоэтина обычно очень высоки у пациентов с неэффективным эритропоэзом, терапевтические средства на основе ЕРО часто не лечат анемию у этих пациентов или могут приводить к усилению других аспектов заболевания, таких как спленомегалия и перегрузка железом.

Таким образом, задачей настоящего изобретения является создание альтернативных способов для повышения уровней эритроцитов и/или нацеленных на другие нарушения, связанных с неэффективным эритропоэзом.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Частично, изобретение демонстрирует, что ловушки GDF можно использовать для лечения неэффективного эритропоэза и нарушений и симптомов, которые ассоциированы с неэффективным эритропоэзом, в том числе, без ограничений, анемии, спленомегалии, перегрузки железом, гиперцеллюлярного костного мозга, повышенных уровней эндогенного эритропоэтина и повреждения костей. В частности, изобретение демонстрирует, что ловушка GDF, которая представляет собой растворимую форму полипептида ActRIIB с кислым остатком в положении 79 в SEQ ID NO: 1, при введении *in vivo*, повышает уровни эритроцитов в крови у нормальных здоровых индивидуумов, а также у животных моделей анемии и неэффективного эритропоэза. К удивлению, в дополнение к непосредственному повышению уровней эритроцитов, описанные молекулы облегчают другие симптомы, связанные с неэффективным эритропоэзом, включая спленомегалию, перегрузку железом и повреждения костей. В некоторых случаях, эти связанные нарушения имеют равную или большую важность для здоровья и качества жизни пациента, чем состояние анемии. Таким образом, в определенных вариантах осуществления изобретение

предлагает способы применения ловушек GDF для повышения уровней эритроцитов и гемоглобина у пациентов и для лечения нарушений, связанных с низкими уровнями эритроцитов, у нуждающихся в этом пациентов. В частности, изобретение предлагает способы для применения полипептидов-ловушек GDF для лечения осложнений, возникающих из-за нарушений при неэффективном эритропоэзе, включая такие серьезные осложнения как анемия, перегрузка тканей железом, экстрамедуллярный эритропоэз, патология костей, индуцированная эритробластами, и несообразно повышенные уровни эритропоэтина. При таких нарушениях можно использовать ловушки GDF для повышения уровня эритроцитов, одновременно снижая необходимость в переливании эритроцитов и в терапии хелаторами железа, и, таким образом, снижая заболеваемость и смертность, связанные с накоплением железа в уязвимых тканях. Частично, ловушку GDF можно использовать в комбинации с существующей поддерживающей терапией при неэффективном эритропоэзе, включая переливание эритроцитов и терапию хелаторами железа. Ловушки GDF также можно использовать в комбинации с агонистом гепсидина для лечения неэффективного эритропоэза. Как описано в патентной заявке США № 12/012652, включенной в настоящий документ посредством ссылки, ловушки GDF также можно использовать для увеличения мышечной массы и снижения жировой массы.

В определенных аспектах настоящее изобретение предлагает ловушки GDF, которые представляют собой варианты полипептиды ActRIIB, в том числе полипептиды ActRIIB с амино- и карбокси-концевыми усечениями и изменениями последовательности. Необязательно, ловушки GDF по изобретению могут быть сконструированы для того, чтобы являться предпочтительными антагонистами одного или нескольких лигандов рецепторов ActRIIB, таких как GDF8 (также называемый миостатином), GDF11, Nodal и BMP7 (также называемый OP-1). Примеры ловушек GDF включают набор вариантов, производных ActRIIB, которые обладают значительно сниженной аффинностью к активину. Эти варианты демонстрируют желаемые эффекты на эритроцитах, одновременно снижая воздействия на другие ткани. Примеры таких вариантов включают варианты, которые имеют кислую аминокислоту (например,

аспарагиновую кислоту, D, или глутаминовую кислоту, E) в положении, соответствующем положению 79 в SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления полипептид-ловушка GDF содержит аминокислотную последовательность, которая включает, состоит из или состоит по существу из аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 7, 26, 28, 29, 32, 37 или 38, и полипептиды, которые на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичны любым из указанных выше.

В определенных аспектах изобретение предлагает фармацевтические препараты, содержащие ловушку GDF, которая связывается с лигандом ActRIIB, таким как GDF8, GDF11, активин (например, активин B), BMP7 или nodal, и фармацевтически приемлемый носитель. Необязательно, ловушка GDF связывается с лигандом ActRIIB с Kd менее чем 10 мкМ, менее чем 1 мкМ, менее чем 100 нМ, менее чем 10 нМ, или менее чем 1 нМ. Необязательно, ловушка GDF ингибирует передачу сигнала через ActRIIB, такую как внутриклеточные события передачи сигнала, которые запускаются лигандом ActRIIB. Ловушка GDF для применения в таком препарате может быть любой из описываемых в настоящем документе, включая, например, ловушки GDF с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 или 40, или ловушки GDF с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 или 40, или ловушки GDF с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 или 40, где положение, соответствующее L79 в SEQ ID NO: 1, представляет собой кислую аминокислоту. Предпочтительно, ловушка GDF для применения в таком препарате состоит из или состоит по существу из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26. Ловушка GDF может включать функциональный фрагмент природного полипептида ActRIIB, такого как полипептид, содержащий по меньшей мере 10, 20 или 30 аминокислот последовательности, выбранной из SEQ ID

NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38 или 40 или последовательности SEQ ID NO: 2, без C-концевых 1, 2, 3, 4, 5 или от 10 до 15 аминокислот и без 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот на N-конце. Предпочтительно, полипептид содержит усечение относительно SEQ ID NO: 2 или 40 от 2 до 5 аминокислот на N-конце и не более чем 3 аминокислоты на C-конце. Ловушка GDF может содержать одно или несколько изменений в аминокислотной последовательности полипептида ActRIIB (например, в лиганд-связывающем домене) относительно природного полипептида ActRIIB. Изменение в аминокислотной последовательности может, например, касаться гликозилирования полипептида при выработке в клетке млекопитающего, насекомого или другой эукариотической клетке или касаться протеолитического расщепления полипептида по сравнению с природным полипептидом ActRIIB.

Ловушка GDF может представлять собой слитый белок, который содержит в качестве одного домена полипептид ActRIIB (например, лиганд-связывающий домен ActRIIB с одним или несколькими изменениями последовательности) и один или несколько дополнительных доменов, которые обеспечивают желаемое свойство, такое как улучшенная фармакокинетика, более легкая очистка, нацеленность на конкретные ткани, и т.д. Например, домен слитого белка может улучшать одно или несколько свойств из следующих: стабильность *in vivo*, время полужизни *in vivo*, захват/введение, локализация или распределение в ткани, образование белковых комплексов, мультимеризация слитого белка и/или очистка. Слитые белки-ловушки GDF могут содержать Fc-домен иммуноглобулина (дикого типа или мутантный) или сывороточный альбумин. В определенных вариантах осуществления слитая ловушка GDF содержит относительно неструктурированный линкер, расположенный между Fc-доменом и внеклеточным доменом ActRIIB. Этот неструктурированный линкер может соответствовать в общих чертах неструктурированной области из 15 аминокислот на C-конце внеклеточного домена ActRIIB ("хвост"), или он может быть искусственной последовательностью в пределах от 3 до 5, 15, 20, 30, 50 или более аминокислот, которые относительно свободны по вторичной структуре. Линкер может быть богат

пролиновыми или глициновыми остатками и может, например, содержать повторяющиеся последовательности треонин/серин и глицины (например, TG₄ (SEQ ID NO: 13) или SG₄ (SEQ ID NO: 14) синглеты или повторы) или серии из трех глицинов. Слитый белок может включать субпоследовательность для очистки, такую как эпитопная метка, метка FLAG, полигистидиновая последовательность и слияние GST. В определенных вариантах осуществления слитый белок-ловушка GDF содержит лидерную последовательность. Лидерная последовательность может представлять собой природную лидерную последовательность ActRIIB или гетерологичную лидерную последовательность. В определенных вариантах осуществления лидерная последовательность представляет собой лидерную последовательность тканевого активатора плазминогена (ТРА). В варианте осуществления слитый белок-ловушка GDF содержит вышеизложенную аминокислотную последовательность по формуле А-В-С. Часть В представляет собой полипептид ActRIIB, усеченный с N- и С-конца, состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 25-131 SEQ ID NO: 2 или 40. Части А и С могут представлять собой независимо ноль, одну или более чем одну аминокислоту, и обе части А и С гетерологичны по отношению к В. Часть А и/или С может быть присоединена к части В посредством линкерной последовательности.

Необязательно, ловушка GDF включает вариантный полипептид ActRIIB с одним или несколькими модифицированными аминокислотными остатками, выбранными из следующих: гликозилированная аминокислота, пегилированная аминокислота, фарнезилированная аминокислота, ацетилированная аминокислота, биотинилированная аминокислота, аминокислота, конъюгированная с липидной частью, и аминокислота, конъюгированная с органическим дериватизирующим агентом. Фармацевтический препарат также может включать одно или несколько дополнительных соединений, таких как соединение, которое применяют для лечения нарушений, связанных с ActRIIB. Предпочтительно, фармацевтический препарат является по существу апирогенным. В основном, предпочтительно, чтобы ловушка GDF экспрессировалась в клеточной линии

млекопитающего, которая опосредует подходящее природное гликозилирование ловушки GDF, таким образом, чтобы уменьшить вероятность нежелательного иммунного ответа у пациента. Успешно применяют клеточные линии человека и CHO, и предполагают, что могут подходить другие распространенные экспрессирующие векторы млекопитающих.

В определенных аспектах изобретение предлагает упакованный фармацевтический препарат, включающий фармацевтический препарат, описываемый в настоящем документе, и инструкцию для применения для повышения уровней эритроцитов у человека.

В определенных аспектах изобретение предлагает ловушки GDF, которые представляют собой растворимые полипептиды ActRIIB, содержащие измененный лиганд-связывающий (например, GDF8-связывающий) домен. Ловушки GDF с измененными лиганд-связывающими доменами могут содержать, например, одну или несколько мутаций в аминокислотных остатках, таких как E37, E39, R40, K55, R56, Y60, A64, K74, W78, L79, D80, F82 и F101 ActRIIB человека (нумерация соответственно SEQ ID NO: 1). Необязательно, измененный лиганд-связывающий домен может иметь повышенную избирательность к лиганду, такому как GDF8/GDF11, по сравнению с лиганд-связывающим доменом рецептора ActRIIB дикого типа. Для иллюстрации эти мутации продемонстрированы в настоящем документе для повышения селективности измененного лиганд-связывающего домена по отношению к GDF11 (и, таким образом, вероятно, к GDF8) по сравнению с активином: K74Y, K74F, K74I, L79D, L79E и D80I. Следующие мутации оказывают обратное действие, повышая соотношение связывания активина по сравнению с GDF11: D54A, K55A, L79A и F82A. Общую активность связывания (GDF11 и активина) можно увеличить за счет включения "хвостовой" области или, возможно, неструктурированной линкерной области, и также за счет использования мутации K74A. Другие мутации, которые вызывают общее снижение аффинности связывания лиганда, включают: R40A, E37A, R56A, W78A, D80K, D80R, D80A, D80G, D80F, D80M и D80N. Мутации можно комбинировать для достижения желаемых эффектов. Например, многие из мутаций, которые влияют на соотношение связывания

GDF11:Активин, имеют общее негативное действие на связывание лиганда, и таким образом, эти мутации можно комбинировать с мутациями, которые в основном увеличивают связывание лиганда, для получения улучшенного связывающего белка с селективностью по отношению к лигандам. В иллюстративном варианте осуществления ловушка GDF представляет собой полипептид ActRIIB, который содержит мутацию L79D или L79E, необязательно в комбинации с дополнительными заменами, добавлениями или делециями аминокислот.

Необязательно, ловушка GDF, которая содержит измененный лиганд-связывающий домен, имеет соотношение K_d для связывания активина к K_d для связывания GDF8, которое, по меньшей мере, в 2, 5, 10 или даже в 100 раз больше по сравнению с соотношением для лиганд-связывающего домена дикого типа. Необязательно, ловушка GDF, которая содержит измененный лиганд-связывающий домен, имеет соотношение IC_{50} для ингибирования активина к IC_{50} для ингибирования GDF8/GDF11, которое в по меньшей мере 2, 5, 10, или даже в 100 раз больше по сравнению с соотношением для лиганд-связывающего домена ActRIIB дикого типа. Необязательно, ловушка GDF, которая содержит измененный лиганд-связывающий домен, ингибирует GDF8/GDF11 с IC_{50} , в по меньшей мере 2, 5, 10, или даже 100 раз меньшей, чем IC_{50} для ингибирования активина. Эти ловушки GDF могут быть слитыми белками, которые включают Fc-домен иммуноглобулина (дикого типа или мутантного). В конкретных случаях, указанные растворимые ловушки GDF являются антагонистами (ингибиторами) GDF8 и/или GDF11.

Также рассматриваются другие ловушки GDF, такие как нижеследующие. Слитый белок-ловушка GDF, который содержит часть, полученную из последовательности ActRIIB из SEQ ID NO: 1 или 39, и вторую полипептидную часть, где часть, полученная из ActRIIB, соответствует последовательности, которая начинается с любой из аминокислот 21-29 из SEQ ID NO: 1 или 39 (необязательно, которая начинается с 22-25 из SEQ ID NO: 1 или 39) и заканчивается любой из аминокислот 109-134 из SEQ ID NO: 1 или 39, и где слитый белок-ловушка GDF ингибирует передачу сигнала активинном, миостатином и/или GDF11 в анализе на

клетках. Вышеописанный слитый белок-ловушка GDF, где часть, полученная из ActRIIB, соответствует последовательности, которая начинается с любой из аминокислот 20-29 из SEQ ID NO: 1 или 39 (необязательно, которая начинается с 22-25 из SEQ ID NO: 1 или 39) и заканчивается любой из аминокислот 109-133 из SEQ ID NO: 1 или 39. Вышеописанный слитый белок-ловушка GDF, где часть, полученная из ActRIIB, соответствует последовательности, которая начинается с любой из аминокислот 20-24 из SEQ ID NO: 1 или 39 (необязательно, которая начинается с 22-25 из SEQ ID NO: 1 или 39) и заканчивается любой из аминокислот 109-133 из SEQ ID NO: 1 или 39. Вышеописанный слитый белок-ловушка GDF, где часть, полученная из ActRIIB, соответствует последовательности, которая начинается с любой из аминокислот 21-24 из SEQ ID NO: 1 или 39 и заканчивается любой из аминокислот 109-134 из SEQ ID NO: 1 или 39. Вышеописанный слитый белок-ловушка GDF, где часть, полученная из ActRIIB, соответствует последовательности, которая начинается с любой из аминокислот 20-24 из SEQ ID NO: 1 или 39 и заканчивается любой из аминокислот 118-133 из SEQ ID NO: 1 или 39. Вышеописанный слитый белок-ловушка GDF, где часть, полученная из ActRIIB, соответствует последовательности, которая начинается с любой из аминокислот 21-24 из SEQ ID NO: 1 или 39 и заканчивается любой из аминокислот 118-134 of SEQ ID NO: 1 или 39. Вышеописанный слитый белок-ловушка GDF, где часть, полученная из ActRIIB, соответствует последовательности, которая начинается с любой из аминокислот 20-24 из SEQ ID NO: 1 или 39 и заканчивается любой из аминокислот 128-133 из SEQ ID NO: 1 или 39. Вышеописанный слитый белок-ловушка GDF, где часть, полученная из ActRIIB, соответствует последовательности, которая начинается с любой из аминокислот 20-24 из SEQ ID NO: 1 или 39 и заканчивается любой из аминокислот 128-133 из SEQ ID NO: 1 или 39. Вышеописанный слитый белок-ловушка GDF, где часть, полученная из ActRIIB, соответствует последовательности, которая начинается с любой из аминокислот 21-29 из SEQ ID NO: 1 или 39 и заканчивается любой из аминокислот 118-134 из SEQ ID NO: 1 или 39. Вышеописанный слитый белок-ловушка GDF, где часть, полученная из ActRIIB, соответствует последовательности,

которая начинается с любой из аминокислот 20-29 из SEQ ID NO: 1 или 39 и заканчивается любой из аминокислот 118-133 из SEQ ID NO: 1 или 39. Вышеописанный слитый белок-ловушка GDF, где часть, полученная из ActRIIB, соответствует последовательности, которая начинается с любой из аминокислот 21-29 из SEQ ID NO: 1 или 39 и заканчивается любой из аминокислот 128-134 из SEQ ID NO: 1 или 39. Вышеописанный слитый белок-ловушка GDF, где часть, полученная из ActRIIB, соответствует последовательности, которая начинается с любой из аминокислот 20-29 из SEQ ID NO: 1 и заканчивается любой из аминокислот 128-133 из SEQ ID NO: 1 или 39. Неожиданно, конструкции, которые начинаются с 22-25 из SEQ ID NO: 1 или 39, имели уровни активности выше, чем белки с полным внеклеточным доменом ActRIIB человека. В предпочтительном варианте осуществления слитый белок-ловушка GDF включает, содержит по существу или содержит аминокислотную последовательность, которая начинается с аминокислотного положения 25 из SEQ ID NO: 1 или 39 и заканчивается в аминокислотном положении 131 из SEQ ID NO: 1 или 39. В других предпочтительных вариантах осуществления полипептид-ловушка GDF содержит по существу или содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 7, 26, 28, 29, 32, 37 или 38. Любые из вышеописанных слитых белков-ловушек GDF можно получать в виде гомодимера. Любые из вышеописанных слитых белков-ловушек GDF могут иметь гетерологичную часть, которая состоит из константной области тяжелой цепи IgG, такой как Fc-домен. Любые из вышеописанных слитых белков-ловушек GDF могут содержать кислотную аминокислоту в положении, соответствующем положению 79 из SEQ ID NO: 1, необязательно в комбинации с одной или несколькими дополнительными заменами аминокислот, делециями или вставками относительно SEQ ID NO: 1.

Также рассматриваются другие ловушки GDF, такие как нижеследующие. Белок-ловушка GDF, включающий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична последовательности аминокислот 29-109 из SEQ ID NO: 1 или 39, где положение, соответствующее 64 в SEQ ID NO: 1 представляет собой R или K, и где белок-ловушка GDF ингибирует передачу

сигнала активинном, миостатином и/или GDF11 в анализе на клетках. Вышеописанный белок-ловушка GDF, где по меньшей мере одно изменение относительно последовательности из SEQ ID NO: 1 или 39 расположено вне лиганд-связывающего "кармана". Вышеописанный белок-ловушка GDF, где по меньшей мере одно изменение относительно последовательности из SEQ ID NO: 1 или 39 представляет собой консервативное изменение, расположенное внутри лиганд-связывающего "кармана". Вышеописанный белок-ловушка GDF, где по меньшей мере одно изменение относительно последовательности из SEQ ID NO: 1 или 39 представляет собой изменение по одному или нескольким положениям, выбранным из группы, состоящей из K74, R40, Q53, K55, F82 и L79. Вышеописанный белок-ловушка GDF, где белок содержит по меньшей мере одну последовательность N-X-S/T в положении ином, чем нативная последовательность N-X-S/T в ActRIIB, и в положении вне лиганд-связывающего "кармана".

Также рассматриваются другие ловушки GDF, такие как нижеследующие. Белок-ловушка GDF, содержащий аминокислотная последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична последовательности аминокислот 29-109 SEQ ID NO: 1 или 39, и где белок содержит по меньшей мере одну последовательность N-X-S/T в положении, ином, чем нативная последовательность N-X-S/T в ActRIIB, и в положении вне лиганд-связывающего "кармана". Вышеописанная ловушка GDF, где белок-ловушка GDF содержит N в положении, соответствующем положению 24 из SEQ ID NO: 1 или 39, и S или T в положении, соответствующем положению 26 из SEQ ID NO: 1 или 39, и где ловушка GDF ингибирует передачу сигнала активинном, миостатином и/или GDF11 в анализе на клетках. Вышеописанная ловушка GDF, где белок-ловушка GDF содержит R или K в положении, соответствующем положению 64 из SEQ ID NO: 1 или 39. Вышеописанная ловушка GDF, где белок ActRIIB содержит D или E в положении, соответствующем положению 79 из SEQ ID NO: 1 или 39, и где ловушка GDF ингибирует передачу сигнала активинном, миостатином и/или GDF11 в анализе на клетках. Вышеописанная ловушка GDF, где по меньшей мере одно изменение относительно последовательности из SEQ ID NO: 1 или 39 представляет собой

консервативное изменение, расположенное внутри лиганд-связывающего "кармана". Вышеописанная ловушка GDF, где по меньшей мере одно изменение относительно последовательности из SEQ ID NO: 1 или 39 представляет собой изменение по одному или нескольким положениям, выбранным из группы, состоящей из K74, R40, Q53, K55, F82 и L79. Вышеописанная ловушка GDF, где белок представляет собой слитый белок, дополнительно включающий гетерологичную часть. Любые из вышеописанных слитых белков-ловушек GDF можно получать в виде гомодимера. Любые из вышеописанных слитых белков-ловушек GDF могут иметь гетерологичную часть, которая включает константную область тяжелой цепи IgG, такую как Fc-домен.

В определенных аспектах изобретение предлагает нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид-ловушку GDF. Выделенный полинуклеотид может содержать кодирующую последовательность для растворимого полипептида-ловушки GDF, такого как описано выше. Например, выделенная нуклеиновая кислота может включать последовательность, кодирующую ловушку GDF, которая содержит внеклеточный домен (например, лиганд-связывающий домен) полипептида ActRIIB с одним или несколькими изменениями последовательности и последовательность, которая могла бы кодировать часть или весь трансмембранный домен и/или цитоплазматический домен полипептида ActRIIB, кроме стоп-кодона, расположенного внутри трансмембранного домена или цитоплазматического домена, или расположенного между внеклеточным доменом и трансмембранным доменом или цитоплазматическим доменом. Например, выделенный полинуклеотид, кодирующий ловушку GDF, может включать полноразмерную полинуклеотидную последовательность ActRIIB, такую как SEQ ID NO: 4 с одним или несколькими изменениями, или частично укороченную версию, указанный выделенный полинуклеотид, дополнительно включающий кодон терминации транскрипции за по меньшей мере шестьсот нуклеотидов до 3'-конца или в ином положении, таким образом, что трансляция полинуклеотида дает внеклеточный домен, необязательно слитый с укороченной частью полноразмерного ActRIIB. Нуклеиновые кислоты, описываемые в

настоящем документе, могут быть функционально связаны с промотором для экспрессии, и изобретение предлагает клетки, трансформированные такими рекомбинантными полинуклеотидами. Предпочтительно клетка представляет собой клетку млекопитающего, такую как клетка CHO.

В определенных аспектах изобретение предлагает способы для получения полипептида-ловушки GDF. Такой способ может включать экспрессию любой из нуклеиновых кислот (например, SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 или 31), описываемых в настоящем документе, в подходящей клетке, такой как клетка яичника китайского хомячка (CHO). Такой способ может включать: а) культивирование клетки в условиях, подходящих для экспрессии полипептида-ловушки GDF, где указанная клетка трансформирована экспрессирующей конструкцией ловушки GDF; и b) извлечение полипептида-ловушки GDF, экспрессирующегося таким образом. Полипептиды-ловушки GDF могут быть извлечены в виде неочищенных, частично очищенных или высокоочищенных фракций с использованием любых хорошо известных способов для получения белка из клеточных культур.

В определенных аспектах полипептид-ловушку GDF, описываемый в настоящем документе, можно использовать в способе для облегчения выработки эритроцитов или повышения уровней эритроцитов у индивидуума. В определенных вариантах осуществления изобретение предлагает способы лечения нарушения, связанного с низким числом эритроцитов или низкими уровнями гемоглобина (например, анемия, синдром миелодисплазии и т.д.), или для облегчения выработки эритроцитов у пациентов, которым это необходимо. Способ может включать введение нуждающемуся в этом индивидууму эффективного количества полипептида-ловушки GDF. В определенных аспектах изобретение предлагает применение полипептидов-ловушек GDF для получения лекарственного средства для лечения нарушения или состояния, описанного в настоящем документе.

Частично, изобретение демонстрирует, что ловушки GDF можно использовать в комбинации (например, вводить в одно время или в разные моменты времени, но, как правило, таким образом, чтобы достичь перекрывающихся фармакологических воздействий) с

активаторами рецептора ЕРО для повышения уровней эритроцитов (эритропоэза) или лечения анемии у пациентов, которым это необходимо. Частично, изобретение демонстрирует, что ловушку GDF можно вводить в комбинации с активатором рецептора ЕРО для того, чтобы синергетически повысить образование эритроцитов у пациента. Таким образом, эффект этого комбинированного лечения может быть значительно больше, чем сумма эффектов ловушки GDF и активатора рецептора ЕРО, когда их вводят отдельно в соответствующих дозах. В определенных вариантах осуществления этот синергизм может быть выгоден, поскольку позволяет достичь целевых уровней эритроцитов с меньшими дозами активатора рецептора ЕРО, что позволяет избежать потенциальных неблагоприятных воздействий или других проблем, связанных с высокими уровнями активации рецептора ЕРО.

Активатор рецептора ЕРО может стимулировать эритропоэз путем непосредственного контакта и активации рецептора ЕРО. В определенных вариантах осуществления активатор рецептора ЕРО представляет собой один из классов соединений на основе последовательности из 165 аминокислот нативного ЕРО, в основном, известных как агенты, стимулирующие эритропоэз (ESA), примерами которых являются эпоэтин альфа, эпоэтин бета, ээтин дельта и эпоэтин омега. В других вариантах осуществления ESA включают синтетические белки-эритропоэтины (SEP) и производные ЕРО с непептидными модификациями, придающими желаемые фармакокинетические свойства (удлиненный период полувыведения из циркуляции), примерами которых являются дарбэпоэтин альфа и метокси-полиэтилен-гликоль эпоэтин бета. В определенных вариантах осуществления активатор рецептора ЕРО может представлять собой агонист рецептора ЕРО, который не содержит остов полипептида ЕРО или, как правило, не классифицируется как ESA. Такие агонисты рецептора ЕРО в качестве неограничивающих примеров могут включать пептидные и непептидные миметики ЕРО, антитела-агонисты, нацеленные на рецептор ЕРО, слитые белки, содержащие домен миметика ЕРО и ограниченные агонисты рецептора эритропоэтина с увеличенной продолжительностью действия (EREDLA).

В определенных вариантах осуществления активатор рецептора EPO может стимулировать эритропоэз косвенно, без контакта с рецептором EPO, способствуя выработке эндогенного EPO. Например, факторы транскрипции, индуцируемые гипоксией (HIF), являются эндогенными стимуляторами экспрессии гена EPO, которые супрессированы (дестабилизированы) при условиях с нормальным содержанием кислорода за счет клеточных механизмов регуляции. Частично, изобретение предлагает повышенный эритропоэз у пациента за счет комбинированного лечения ловушкой GDF и непрямым активатором рецептора EPO с HIF-стабилизирующими свойствами, таким как ингибитор пропилгидроксилазы.

В определенных аспектах изобретение предлагает способы для введения пациенту полипептида-ловушки GDF. Частично, изобретение демонстрирует, что полипептиды-ловушки GDF можно использовать для повышения уровня гемоглобина и эритроцитов. Частично, изобретение демонстрирует, что полипептиды-ловушки GDF можно использовать для лечения пациентов с неэффективным эритропоэзом и для уменьшения одного или нескольких состояний, связанных с неэффективным эритропоэзом, таких как анемия, спленомегалия, перегрузка железом или костные нарушения. В определенных аспектах изобретение предлагает способы для применения полипептидов-ловушек GDF для лечения неэффективного эритропоэза у пациента с талассемией одновременно с уменьшением необходимости в переливании эритроцитов и снижением заболеваемости и смертности, связанных с накоплением железа в уязвимых тканях. В частности, полипептид-ловушку GDF можно использовать таким образом для лечения синдромов [бета]-талассемии, включая промежуточную форму [бета]-талассемии. Полипептиды-ловушки GDF также можно использовать для лечения или профилактики других терапевтических состояний, таких как содействие мышечному росту. При определенных обстоятельствах, при введении полипептида-ловушки GDF для содействия мышечному росту, может быть желательным контролировать воздействие на эритроциты во время введения полипептида-ловушки GDF, или для определения или корректировки дозирования полипептида-ловушки GDF, для того чтобы уменьшить нежелательные эффекты на

эритроциты. Например, повышение уровня эритроцитов, уровней гемоглобина или уровней гематокрита может приводить к повышению артериального давления.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг.1 представлено выравнивание внеклеточных доменов ActRIIA человека (SEQ ID NO: 15) и ActRIIB человека (SEQ ID NO: 2) с остатками, которые установлены в настоящем документе на основании композитного анализа нескольких кристаллических структур ActRIIB и ActRIIA, для прямого контакта с лигандом (лиганд-связывающий "карман"), указанными рамками.

На фиг.2 представлено множественное выравнивание последовательностей различных белков ActRIIB позвоночных и ActRIIA человека (SEQ ID NO: 16-23).

На фиг.3 представлена полная аминокислотная последовательность для ловушки GDF ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (SEQ ID NO: 11), включая лидерную последовательность TPA (двойное подчеркивание), внеклеточный домен ActRIIB (остатки 20-134 в SEQ ID NO: 1; подчеркнуты), и hFc-домен. Аспартат, замещенный в положении 79 в нативной последовательности, подчеркнут двойной линией и выделен цветом, так же как и глицин, выявленный при помощи секвенирования, как N-концевой остаток в зрелом слитом белке.

На фиг.4 представлена нуклеотидная последовательность, кодирующая ActRIIB(L79D 20-134)-hFc. SEQ ID NO: 25 соответствует смысловой цепи, и SEQ ID NO: 33 соответствует антисмысловой цепи. Лидерная последовательность TPA (нуклеотиды 1-66) подчеркнута двойной линией, и внеклеточный домен ActRIIB (нуклеотиды 76-420) подчеркнут одной линией.

На фиг.5 представлена полная аминокислотная последовательность для усеченной ловушки GDF ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (SEQ ID NO: 26), в том числе лидерная последовательность TPA (подчеркнута двойной линией), усеченный внеклеточный домен ActRIIB (остатки 25-131 в SEQ ID NO: 1; подчеркнут одной линией), и hFc-домен. Аспартат, замещенный в положении 79 в нативной последовательности, подчеркнут двойной линией и выделен цветом, так же как и глутаминат, выявленный

при помощи секвенирования, как N-концевой остаток в зрелом слитом белке.

На фиг.6 представлена нуклеотидная последовательность, кодирующая ActRIIB(L79D 25-131)-hFc. SEQ ID NO: 27 соответствует смысловой цепи, и SEQ ID NO: 34 соответствует антисмысловой цепи. Лидерная последовательность ТРА (нуклеотиды 1-66) подчеркнута двойной линией, и усеченный внеклеточный домен ActRIIB (нуклеотиды 76-396) подчеркнут одной линией. Также представлена аминокислотная последовательность для внеклеточного домена ActRIIB (остатки 25-131 в SEQ ID NO: 1).

На фиг.7 представлена аминокислотная последовательность для усеченной ловушки GDF ActRIIB(L79D 25-131)-hFc без лидерной последовательности (SEQ ID NO: 28). Усеченный внеклеточный домен ActRIIB (остатки 25-131 в SEQ ID NO: 1) подчеркнут. Аспартат, замещенный в положении 79 в нативной последовательности, подчеркнут двойной линией и выделен цветом, так же как и глутаминат, выявленный при помощи секвенирования, как N-концевой остаток в зрелом слитом белке.

На фиг.8 представлена аминокислотная последовательность для усеченной ловушки GDF ActRIIB(L79D 25-131) без лидерной последовательности, hFc домена и линкера (SEQ ID NO: 29). Аспартат, замещенный в положении 79 в нативной последовательности, подчеркнут двойной линией и выделен цветом, так же как и глутаминат, выявленный при помощи секвенирования, как N-концевой остаток в зрелом слитом белке.

На фиг.9 представлена альтернативная нуклеотидная последовательность, кодирующая ActRIIB(L79D 25-131)-hFc. SEQ ID NO: 30 соответствует смысловой цепи, и SEQ ID NO: 35 соответствует антисмысловой цепи. Лидерная последовательность ТРА (нуклеотиды 1-66) подчеркнута двойной линией, и усеченный внеклеточный домен ActRIIB (нуклеотиды 76-396) подчеркнут одной линией, а замены во нуклеотидной последовательности внеклеточного домена дикого типа подчеркнуты двойной линией и выделен цветом (сравните с SEQ ID NO: 27, фиг.6). Также представлена аминокислотная последовательность для внеклеточного домена ActRIIB (остатки 25-131 в SEQ ID NO: 1).

На фиг.10 представлены нуклеотиды 76-396 (SEQ ID NO: 31) альтернативной нуклеотидной последовательности, показанной на фиг.9 (SEQ ID NO: 30). Те же нуклеотидные замены, которые указаны на фиг.9, здесь также подчеркнуты двойной линией и выделен цветом. SEQ ID NO: 31 кодирует только укороченный внеклеточный домен ActRIIB (соответствующий остаткам 25-131 в SEQ ID NO: 1) с заменой L79D, например, ActRIIB(L79D 25-131).

На фиг.11 представлено действие ActRIIB(L79D 25-131)-hFc на концентрацию гемоглобина на мышинной модели анемии, индуцированной химиотерапией. Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM. **, $P < 0,01$ по сравнению с паклитакселом в тот же момент времени. Эта ловушка GDF прекращает анемию, индуцированную лечением паклитакселом.

На фиг.12 представлено действие ActRIIB(L79D 25-131)-hFc на уровне эритроцитов (RBC) на мышинной модели с хроническим заболеванием почек с односторонней нефрэктомией (NEPHX). Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM. ***, $P < 0,001$ по сравнению с исходными данными. Эта ловушка GDF инвертирует течение анемии, индуцированной нефрэктомией, у контрольных мышей.

На фиг.13 представлено действие ActRIIB(L79D 25-131)-hFc на уровне эритроцитов (RBC), гемоглобина (HGB) и гематокрита (HCT) на мышинной модели с хроническим заболеванием почек с односторонней нефрэктомией (NEPHX). Данные представляют собой средние изменения исходных данных через 4 недели ($\pm$ SEM). *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ по сравнению с контролями NEPHX. Эта ловушка GDF предупреждает снижение данных эритроцитарных параметров, ассоциированное с нефрэктомией, повышая каждый из них до величины, аналогичной величине у мышей с интактной почкой (sham).

На фиг.14 представлено действие ActRIIB(L79D 25-131)-hFc на уровне эритроцитов (RBC) на крысиной модели анемии, индуцированной острой кровопотерей. Удаление крови производили в День -1, с введением дозы в Дни 0 и 3. Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM. **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ по сравнению с растворителем в тот же момент времени. Эта ловушка GDF улучшает скорость и степень восстановления от анемии, индуцированной

кровопотерей.

На фиг.15 представлено действие лечения ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (серый цвет) или ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (черный цвет) на абсолютное изменение концентрации эритроцитов от исходной величины у яванских макак. VEN = растворитель. Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM. n=4-8 на группу.

На фиг.16 представлено действие лечения ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (серый цвет) или ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (черный цвет) на абсолютное изменение гематокрита от исходной величины у яванских макак. VEN = растворитель. Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM. n=4-8 на группу.

На фиг.17 представлено действие лечения ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (серый цвет) или ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (черный цвет) на абсолютное изменение концентрации гемоглобина от исходной величины у яванских макак. VEN = растворитель. Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM. n=4-8 на группу.

На фиг.18 представлено действие лечения ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (серый цвет) или ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (черный цвет) на абсолютное изменение концентрации циркулирующих ретикулоцитов от исходной величины у яванских макак. VEN = растворитель. Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM. n=4-8 на группу.

На фиг.19 представлено действие комбинированного лечения эритропоэтином (EPO) и ActRIIB(L79D 25-131)-hFc в течение 72 часов на гематокрит у мышей. Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM (n=4 на группу), и средние, которые значительно отличаются друг от друга ($p < 0,05$, непарный t-тест) обозначены различными буквами. Комбинированное лечение увеличивает гематокрит на 23% по сравнению с растворителем, синергическое увеличение больше, чем сумма отдельных эффектов EPO и ActRIIB(L79D 25-131)-hFc.

На фиг.20 представлено действие комбинированного лечения EPO и ActRIIB(L79D 25-131)-hFc в течение 72 часов на концентрации гемоглобина у мышей. Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM (n=4 на группу), и средние, которые значительно отличаются друг от друга ($p < 0,05$) обозначены различными буквами. Комбинированное лечение повышает концентрации

гемоглобина на 23% по сравнению с растворителем, что также является синергическим действием.

На фиг.21 представлено действие комбинированного лечения ЕРО и ActRIIB(L79D 25-131)-hFc в течение 72 часов на концентрации эритроцитов у мышей. Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM (n=4 на группу), и средние, которые значимо отличаются друг от друга ($p<0,05$) обозначены различными буквами. Комбинированное лечение повышает концентрации на 20% по сравнению с растворителем, что также является синергическим действием.

На фиг.22 представлено действие комбинированного лечения ЕРО и ActRIIB(L79D 25-131)-hFc в течение 72 часов на число эритропоэтических клеток-предшественников в селезенке мышей. Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM (n=4 на группу), и средние, которые значимо отличаются друг от друга ($p<0,05$) обозначены различными буквами. В то время как ЕРО сам по себе резко увеличил количество базофильных эритробластов (BasoE) за счет созревания предшественников на поздней стадии, комбинированное лечение повысило количество BasoE в меньшей, но все еще значительной степени одновременно поддерживая неумещающееся созревание предшественников на поздней стадии.

Фиг.23 сравнивает параметры RBC у мышинной модели β -талассемии $Hbb^{-/-}$ с параметрами у мышей дикого типа (WT). Анализировали образцы крови от нелеченных мышей в возрасте 2-6 месяцев для определения количества эритроцитов (RBC; A), гематокрита (HCT; B), и концентрации гемоглобина (Hgb; C). Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM (n=4 на группу), $p<0,001$. Было подтверждено, что у мышей $Hbb^{-/-}$ тяжелая анемия.

На фиг.24 представлено действие ActRIIB(L79D 25-131)-mFc на количество RBC у мышинной модели β -талассемии $Hbb^{-/-}$. Образцы крови собирали после четырех недель лечения. Данные представляют собой среднее из 2 на группу, с чертами, указывающими диапазон. Лечение ActRIIB(L79D 25-131)-mFc вдвое уменьшило дефицит RBC у $Hbb^{-/-}$ мышей.

На фиг.25 представлено действие ActRIIB(L79D 25-131)-mFc на морфологию RBC у мышинной модели β -талассемии $Hbb^{-/-}$.

Изображения мазков крови, окрашенных по Гимза, от мышей, которых лечили в течение четырех недель, получали при 100-кратном увеличении. Обратите внимание на гемолиз, продукты распада клеток и множество маленьких или неправильной формы RBC в крови мышей *Hbb*^{-/-}, которых лечили растворителем. Для сравнения, лечение ActRIIB(L79D 25-131)-mFc значительно уменьшило гемолиз, клеточный распад и появление RBC неправильной формы, одновременно повысив число RBC с нормальной формой.

На фиг.26 представлено действие лечения ActRIIB(L79D 25-131)-mFc в течение двух месяцев на число RBC у мышинной модели β -талассемии *Hbb*^{-/-}, с данными от мышей дикого типа, которым вводили растворитель, приведенными для сравнения. Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM; n=7 на группу. **, P<0,01 по сравнению с мышами *Hbb*^{-/-}, которых лечили растворителем. Лечение ActRIIB(L79D 25-131)-mFc уменьшило средний дефицит RBC у мышей *Hbb*^{-/-} более чем на 50%.

На фиг.27 представлено действие лечения ActRIIB(L79D 25-131)-mFc в течение двух месяцев на уровни сывороточного билирубина у мышинной модели β -талассемии *Hbb*^{-/-}, с данными от мышей дикого типа, которым вводили растворитель, приведенными для сравнения. Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM. ###, P<0,001 по сравнению с мышами дикого типа, которых лечили растворителем; *, P<0,05 по сравнению с мышами *Hbb*^{-/-}, которых лечили растворителем. Лечение ActRIIB(L79D 25-131)-mFc значительно снизило уровни общего билирубина у мышей *Hbb*^{-/-}.

На фиг.28 представлено действие лечения ActRIIB(L79D 25-131)-mFc в течение двух месяцев на уровень EPO в сыворотке у мышинной модели β -талассемии *Hbb*^{-/-}, с данными от мышей дикого типа, которым вводили растворитель, приведенными для сравнения. Данные представляют собой среднее $\pm$ SEM. ###, P<0,001 по сравнению с мышами дикого типа, которых лечили растворителем; *, P<0,05 по сравнению с мышами *Hbb*^{-/-}, которых лечили растворителем. Лечение ActRIIB(L79D 25-131)-mFc снизило средние уровни циркулирующего EPO у мышей *Hbb*^{-/-} более чем на 60%.

На фиг.29 представлено действие ActRIIB(L79D 25-131)-mFc

на спленомегалию у мышинной модели β -талассемии $Hbb^{-/-}$, с данными от мышей дикого типа, которым вводили растворитель, приведенными для сравнения. А. Среднее $\pm$ SEM от мышей, начиная с трехмесячного возраста, после лечения 1 мг/кг дважды в неделю в течение двух месяцев. ###, $P < 0,001$ по сравнению с мышами дикого типа, которых лечили растворителем; *, $P < 0,05$ по сравнению с мышами $Hbb^{-/-}$, которых лечили растворителем. В. Типичные размеры селезенки, которые наблюдали в отдельном исследовании у мышей, начиная с возраста 6–8 месяцев, после лечения 1 мг/кг дважды в неделю в течение трех месяцев. Лечение ActRIIB(L79D 25-131)-mFc значительно уменьшило массу селезенки у мышей $Hbb^{-/-}$.

На фиг.30 представлено действие лечения ActRIIB(L79D 25-131)-mFc в течение двух месяцев на минеральную плотность костей у мышинной модели β -талассемии $Hbb^{-/-}$, с данными от мышей дикого типа, которым вводили растворитель, приведенными для сравнения. Среднее $\pm$ SEM на основании анализа бедренной кости. #, $P < 0,05$ по сравнению с мышами дикого типа, которых лечили растворителем; *, $P < 0,05$ по сравнению с мышами $Hbb^{-/-}$, которых лечили растворителем. Лечение ActRIIB(L79D 25-131)-mFc нормализовало минеральную плотность костей у мышей $Hbb^{-/-}$.

На фиг.31 представлено действие лечения ActRIIB(L79D 25-131)-mFc в течение двух месяцев на параметры гомеостаза железа у мышинной модели β -талассемии $Hbb^{-/-}$. Среднее $\pm$ SEM для сывороточного железа (А), сывороточного ферритина (В), и насыщения трансферина (С). *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ по сравнению с мышами $Hbb^{-/-}$, которых лечили растворителем. Лечение ActRIIB(L79D 25-131)-mFc значительно снизило каждый параметр перегрузки железом у мышей $Hbb^{-/-}$.

На фиг.32 представлено действие лечения ActRIIB(L79D 25-131)-mFc в течение двух месяцев на тканевую перегрузку железом у мышинной модели β -талассемии $Hbb^{-/-}$. Уровни железа в срезах тканей (200 мкм) из селезенки (А-С), печени (D-F) и почки (G-I) определяли при помощи окрашивания по Перлсу. Окрашивание железа в селезенке дикого типа (А) было в избытке в красной пульпе (стрелки), но отсутствовало в белой пульпе (*). Повышенный

уровень окрашивания железа в селезенке у мышей *Hbb*^{-/-} (В) отражает расширение областей красной пульпы из-за экстрамедуллярного эритропоэза. ActRIIB(L79D 25-131)-mFc у мышей *Hbb*^{-/-} снизил эритропоэз в селезенке и восстановил паттерн окрашивания железа в селезенке, характерный для дикого типа (С). Кроме того, нормализовалось патологическое окрашивание железа в клетках Купфера в печени (Н, стрелки) и в коре почек (Е, стрелки) у мышей *Hbb*^{-/-} за счет ActRIIB(L79D 25-131)-mFc (F и I). Увеличение, 200х.

На фиг.33 представлено действие лечения ActRIIB(L79D 25-131)-mFc в течение двух месяцев на уровне мРНК гепсидина в печени у мышинной модели β -талассемии *Hbb*^{-/-}. Среднее $\pm$ SEM; *, $P < 0,05$ по сравнению с мышами *Hbb*^{-/-}, которых лечили растворителем. Лечение ActRIIB(L79D 25-131)-mFc значительно повысило экспрессию гепсидина мРНК у мышей *Hbb*^{-/-}.

На фиг.34 представлено действие ActRIIB(L79D 25-131)-mFc на уровне активных формы кислорода в циркуляции (ROS) у мышинной модели β -талассемии *Hbb*^{-/-}, с данными от мышей дикого типа, которым вводили растворитель, приведенными для сравнения. Данные представляют собой среднее геометрическое $\pm$ SEM. ###, $P < 0,001$ по сравнению с мышами дикого типа, которых лечили растворителем; ***, $P < 0,001$ по сравнению с мышами *Hbb*^{-/-}, которых лечили растворителем. Лечение ActRIIB(L79D 25-131)-mFc значительно снизило ROS у мышей *Hbb*^{-/-}.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Общий обзор

Суперсемейство трансформирующего фактора роста бета (TGF- β) включает ряд факторов роста, которые имеют общие элементы последовательности и структурные мотивы. Известно, что эти белки оказывают биологическое воздействие на целый ряд типов клеток, как у позвоночных, так и у беспозвоночных. Члены суперсемейства выполняют важные функции во время эмбрионального развития при формировании структур и специализации тканей и могут влиять на ряд процессов дифференцировки, включая адипогенез, миогенез, хондрогенез, кардиогенез, гемопоэз,

нейрогенез и дифференцировку эпителиальных клеток. Управляя активностью члена семейства TGF- β , зачастую возможно вызвать значительные физиологические изменения в организме. Например, породы крупного рогатого скота пьемонтская и бельгийская голубая несут мутацию с потерей функции в гене GDF8 (также называемом миостатин), которая вызывает выраженное увеличение мышечной массы. Grobet et al., Nat Genet. 1997, 17(1):71-4. Кроме того, у людей неактивные аллели GDF8 ассоциированы с повышенной мышечной массой и, по имеющимся данным, с исключительной силой. Schuelke et al, N Engl J Med 2004, 350:2682-8.

Сигналы TGF- β опосредуются при помощи гетеромерных комплексов серин-треонинкиназных рецепторов типа I и типа II, которые фосфорилируют и активируют нижележащие белки Smad при стимуляции лигандом (Massague, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1: 169-178). Эти рецепторы типа I и типа II представляют собой трансмембранные белки, состоящие из лиганд-связывающего внеклеточного домена с цистеин-богатой областью, трансмембранного домена и цитоплазматического домена с предсказанной серин/треониновой специфичностью. Рецепторы типа I необходимы для передачи сигнала. Рецепторы типа II необходимы для связывания лигандов и экспрессии рецепторов типа I. Рецепторы активина типа I и типа II образуют стабильный комплекс после связывания лиганда, что приводит к фосфорилированию рецепторов типа I рецепторами типа II.

Два родственных рецептора типа II (ActRII), ActRIIA и ActRIIB, идентифицированы как рецепторы типа II для активинов (Mathews и 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 , включая BMP7, Nodal, GDF8 и GDF11 (Yamashita et al, 1995, J. Cell Biol. 130:217-226; Lee и McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311; Yeo и Whitman, 2001, Mol. Cell 7: 949-957; Oh et al, 2002, Genes Dev. 16:2749-54). ALK4 представляет собой основной рецептор типа I для активинов, в частности, для активина A, и ALK-7 также может служить в

качестве рецептора для активинов, в частности, для активина В. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антагонизму лиганда рецепторов ActRIIB (также обозначаемому как лиганд ActRIIB) при помощи объекта изобретения полипептида-ловушки GDF. Примеры лигандов рецепторов ActRIIB включают некоторых членов семейства TGF- β , таких как активин А, активин В, Nodal, GDF8, GDF11 и BMP7.

Активины представляют собой димерные полипептидные факторы роста, которые принадлежат к суперсемейству TGF- β . Есть три основные формы активина (А, В, и АВ), которые представляют собой гомо/гетеродимеры 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, а также известны гетеродимерные формы, включающие β_C или β_E . В суперсемействе TGF- β , активины являются уникальными и многофункциональными факторами, которые могут стимулировать выработку гормона в клетках яичника и плаценты, поддерживать выживание нервных клеток, положительно или отрицательно влиять на процесс клеточного цикла 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). Кроме того, было обнаружено, что эритроидный фактор дифференцировки (EDF), выделенный из стимулированных моноцитарных лейкоцитов человека, идентичен активину А (Murata et al., 1988, PNAS, 85:2434). Полагают, что активин А способствует эритропоэзу в костном мозге. В некоторых тканях антагонистическое действие на передачу сигнала активином оказывает родственный ему гетеродимер, ингибин. Например, во время высвобождения фолликулостимулирующего гормона (FSH) из гипофиза, активин способствует секреции и синтезу FSH, в то время как ингибин предотвращает секрецию и синтез FSH. Другие белки, которые могут регулировать биоактивность и/или связывание активина, включают фоллистатин (FS), родственную фоллистатину белок (FSRP) и α_2 -макроглобулин.

Белки Nodal участвуют в индукции и формировании мезодермы и энтодермы, а также в последующей организации осевых структур, таких как сердце и желудок в раннем эмбриогенезе. Показано, что дорсальная ткань у развивающегося эмбриона позвоночных участвует преимущественно в осевых структурах нотохорды и прехордальной пластинки, хотя она привлекает к участию окружающие клетки для образования не-осевых эмбриональных структур. Nodal, по видимому, передают сигнал через оба типа рецепторов I и II и внутриклеточные эффекторы, известные как белки Smad. Недавние исследования поддерживают идею, что ActRIIA и ActRIIB служат в качестве рецепторов типа II рецепторы для Nodal (Sakuma et al, Genes Cells. 2002, 7:401-12). Предполагают, что лиганды Nodal взаимодействуют с их кофакторами (например, cripto) для активации рецепторов активина типа I и II, которые фосфорилируют Smad2. Белки Nodal вовлечены во множество событий, важных для раннего эмбриогенеза позвоночных, включая образование мезодермы, формирование переднего отдела и определение оси лево-право. Экспериментальные данные показали, что сигнал Nodal активирует pAR3-Lux, репортерный ген люциферазы, который ранее демонстрировал ответ исключительно на активин и TGF- β . Однако, Nodal не способен индуцировать pTlx2-Lux, репортерный ген, который реагирует исключительно на морфогенетические белки кости. Последние результаты обеспечивают прямое биохимическое доказательство, что сигнал Nodal опосредуется обоими белками Smad пути активин-TGF- β , Smad2 и Smad3. Дополнительное исследование показало, что для передачи сигнала Nodal необходим внеклеточный белок cripto, что отличает этот сигнал от сигнала активина или TGF- β .

Фактор роста и дифференцировки-8 (GDF8) также известен как миостатин. GDF8 является негативным регулятором массы скелетных мышц. GDF8 экспрессируется на высоком уровне в развивающейся и взрослой скелетной мышце. Нуль-мутация GDF8 у трансгенных мышей характеризуется выраженной гипертрофией и гиперплазией скелетной мышцы (McPherron et al., Nature, 1997, 387:83-90). Аналогичное увеличение массы скелетных мышц проявляется при

природных мутациях GDF8 у крупного рогатого скота (Ashmore et al, 1974, *Growth*, 38:501-507; Swatland and Kieffer, *J. Anim. Sci.*, 1994, 38:752-757; McPherron and Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94:12457-12461; and Kambadur et al, *Genome Res.*, 1997, 7:910-915) и, поразительно, у людей (Schuelke et al, *N Engl J Med* 2004;350:2682-8). Исследования также показали, что мышечная атрофия, связанная с инфекцией ВИЧ у людей, сопровождается повышением экспрессии белка GDF8 (Gonzalez-Cadavid et al, *PNAS*, 1998, 95: 14938-43). Кроме того, GDF8 может регулировать выработку ферментов, специфичных для мышц (например, креатинкиназы) и регулировать клеточную пролиферацию миобластов (WO 00/43781). Пропептид GDF8 может нековалентно связываться димером домена зрелого GDF8, инактивируя его биологическую активность (Miyazono et al. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263: 6407-6415; Wakefield et al. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263: 7646-7654; и Brown et al. (1990) *Growth Factors*, 3: 35-43). Другие белки, которые связываются с GDF8 или структурно родственными ему белками и ингибируют их биологическую активность, включают фоллистатин и, возможно, родственные фоллистатину белки (Gamer et al. (1999) *Dev. Biol.*, 208: 222-232).

Фактор роста и дифференцировки-11 (GDF11), также известный как BMP11, представляет собой секретируемый белок (McPherron et al, 1999, *Nat. Genet.* 22: 260-264). GDF11 экспрессируется в хвостовой почке, зачатке конечности, верхнечелюстной и нижнечелюстной дугах и в дорсальных корешковых ганглиях во время развития мышцы (Nakashima et al., 1999, *Mech. Dev.* 80: 185-189). GDF11 играет уникальную роль в формировании паттерна, как мезодермальной, так и нервной ткани (Gamer et al., 1999, *Dev Biol.*, 208:222-32). Было показано, что GDF11 является негативным регулятором хондрогенеза и миогенеза в развивающейся конечности цыпленка (Gamer et al., 2001, *Dev Biol.* 229:407-20). экспрессия GDF11 в мышце также подтверждает его роль в регуляции мышечного роста аналогично GDF8. Кроме того, экспрессия GDF11 в головном мозге позволяют предположить, что GDF11 может также обладать активностью, которая связана с

функционированием нервной системы. Примечательно, было обнаружено, что GDF11 ингибирует нейрогенез в обонятельном эпителии (Wu et al, 2003, Neuron. 37: 197-207).

Морфогенетический белок кости (BMP7), который также называют остеогенный белок-1 (OP-1), хорошо известен, как индуктор образования хряща и кости. Кроме того, BMP7 регулирует широкий ряд физиологических процессов. Например, BMP7 может быть остеоиндуктивным фактором, который отвечает за феномен эпителиального остеогенеза. Установлено также, что BMP7 принимает участие в регуляции обмена кальция и гомеостаза кости. Подобно активину, BMP7 связывается с рецепторами типа II, ActRIIA и ActRIIB. Однако BMP7 и активин используют различные рецепторы типа I в гетеромерном рецепторном комплексе. Основным наблюдаемым рецептором типа I для BMP7 был ALK2, в то время как активин связывался исключительно с ALK4 (ActRIIB). BMP7 и активин вызывают различные биологические ответы и активируют различные пути Smad (Macias-Silva et al, 1998, J Biol Chem. 273:25628-36).

Как показано в настоящем документе, полипептид-ловушка GDF, который представляет собой вариантный полипептид ActRIIB (ActRIIB), является более эффективным для увеличения уровней эритроцитов *in vivo* по сравнению с растворимым полипептидом ActRIIB дикого типа и оказывает положительное воздействие на ряд животных моделей с анемией и неэффективным эритропоэзом. Дополнительно показано, что применение полипептида-ловушки GDF в комбинации с активатором рецептора EPO вызывает существенное повышение образования эритроцитов. Следует отметить, что гемопоэз представляет собой сложный процесс, который регулируется рядом факторов, включая эритропоэтин, G-CSF и гомеостаз железа. Термины "повышает уровни эритроцитов" и "способствует образованию эритроцитов" относятся к клинически наблюдаемым показателям, таким как гематокрит, число эритроцитов и показатели гемоглобина, и нейтральны в отношении того механизма, посредством которого происходят такие изменения.

В дополнение к стимуляции уровня эритроцитов, полипептиды-

ловушки GDF подходят для ряда терапевтических применений, включая, например, стимуляцию мышечного роста (см. публикация РСТ No. WO 2006/012627 и WO 2008/097541, которые, таким образом, включены посредством ссылки в полном объеме). В некоторых случаях, при введении полипептида-ловушки GDF с целью увеличения мышц, может быть желательным уменьшить или минимизировать воздействие на эритроциты. Контролируя различные гематологические параметры у проходящих лечение пациентов, или у тех, кто является кандидатами на лечение, можно определять подходящее дозирование полипептида-ловушки GDF (включая количество и частоту введения) на основании индивидуальных потребностей пациента, исходных гематологических параметров и цели лечения. Кроме того, терапевтический прогресс и воздействие на один или несколько гематологических параметров с течением времени могут быть полезны для ведения пациентов, которым вводят полипептид-ловушку GDF, за счет облегчения ухода за пациентом, определения соответствующего поддерживающего дозирования (как количества, так и частоты), и т.д.

ЕРО представляет собой гликопротеиновый гормон, который участвует в росте и созревании эритроидных клеток-предшественников в эритроциты. ЕРО вырабатывается печенью во время внутриутробной жизни и почками у взрослых. Сниженная выработка ЕРО, которая часто встречается у взрослых как следствие почечной недостаточности, приводит к анемии. ЕРО производят при помощи способов генетической инженерии, основанных на экспрессии и секреции белка клеткой-хозяином, которая была трансфицирована геном ЕРО. Введение такого рекомбинантного ЕРО оказалось эффективным при лечении анемии. Например, Eschbach et al. (1987, N Engl J Med 316:73) описывает применение ЕРО для коррекции анемии, вызванной хронической почечной недостаточностью.

Эффекты ЕРО опосредуются путем связывания с рецептором клеточной поверхности, который принадлежит суперсемейству цитокиновых рецепторов и обозначается рецептор ЕРО, и его активации. Рецепторы ЕРО человека и мыши были клонированы и экспрессированы (D'Andrea et al., 1989, Cell 57:277; Jones et

al, 1990, Blood 76:31; Winkelman et al, 1990, Blood 76:24; WO 90/08822/патент США № 5278065). Ген рецептора ЕРО человека кодирует трансмембранный белок из 483 аминокислот, который содержит внеклеточный домен приблизительно из 224 аминокислот и демонстрирует приблизительно 82% идентичность аминокислотных последовательностей с рецептором ЕРО мышей (См. патент США № 6319499). Клонированный полноразмерный рецептор ЕРО, который экспрессируется в клетках млекопитающих (66-72 кДа), связывает ЕРО с аффинностью ($K_D=100-300$ нМ), сходной с аффинностью нативного рецептора на эритроидных клетках-предшественниках. Таким образом, как полагают, эта форма содержит основную детерминанту, связывающую ЕРО, и обозначается как рецептор ЕРО. По аналогии с другими близкородственными рецепторами цитокинов, полагают, что рецептор ЕРО димеризуется при связывании агониста. Однако, детальная структура рецептора ЕРО, который может представлять собой мультимерный комплекс, и его специфический механизм активации полностью не выяснены (патент США № 6319499).

Активация рецептора ЕРО приводит к нескольким биологическим эффектам. Эти эффекты включают повышенную пролиферацию незрелых эритробластов, повышенную дифференцировку незрелых эритробластов и уменьшение апоптоза эритроидных клеток-предшественников (Liboi et al, 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90: 11351-11355; Koury et al, 1990, Science 248:378-381). Пути передачи сигнала для пролиферации и дифференцировки через рецептор ЕРО, по-видимому, различны (Noguchi et al, 1988, Mol Cell Biol 8:2604; Patel et al, 1992, J Biol Chem 1992, 267:21300; Liboi et al, там же). Некоторые результаты позволяют предположить, что для опосредования сигнала дифференцировки может быть необходим вспомогательный белок (Chiba et al., 1993, Nature 362:646; Chiba et al., 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90: 11593); однако существуют разногласия относительно роли вспомогательных белков в дифференцировке, поскольку конститутивно активированная форма рецептора может стимулировать и пролиферацию, и дифференцировку (Pharr et al., 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:938). Активаторы рецептора ЕРО

включают низкомолекулярные соединения, стимулирующие эритропоэз (ESA), а также соединения на основе ЕРО. Примером последних является димерный агонист на основе пептида, ковалентно связанный с полиэтиленгликолем (патентованное название Хематид), который продемонстрировал эритропоэз-стимулирующие свойства у здоровых добровольцев и у пациентов, как с хроническим заболеванием почек, так и с эндогенными антителами к ЕРО (Stead et al, 2006, Blood 108: 1830-1834; Macdougall et al, 2009, N Engl J Med 361: 1848-1855). Другие примеры включают ESA непептидной природы (Qureshi et al, 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96: 12156-12161).

Активаторы рецептора ЕРО также включают соединения, которые стимулируют эритропоэз опосредованно, без контакта с рецептором ЕРО, путем повышения выработки эндогенного ЕРО. Например, факторы транскрипции, индуцируемые гипоксией (HIF), являются эндогенными стимуляторами экспрессии гена ЕРО, которые супрессированы (дестабилизированы) за счет клеточных механизмов регуляции при условиях с нормальным содержанием кислорода. Таким образом, ингибиторы HIF пролилгидроксилазных ферментов исследуются на предмет ЕРО-индуцирующего действия *in vivo*. Другие не прямые активаторы рецептора ЕРО включают ингибиторы фактора транскрипции GATA-2 (Nakano et al., 2004, Blood 104:4300-4307), который тонически ингибирует экспрессию гена ЕРО, и ингибиторы фосфатазы гемопоетических клеток (HCP или SHP-1), которая функционирует как негативный регулятор трансдукции сигнала от рецептора ЕРО (Klingmuller et al., 1995, Cell 80:729-738).

Термины, применяемые в этом описании, как правило, имеют свое обычное значение в данной области, в пределах контекста по настоящему изобретению, и в пределах конкретного контекста, в котором применяют каждый термин. Определенные термины обсуждаются ниже или где-либо в описании для того, чтобы дать дополнительные указания практикующему специалисту при описании композиций и способов по изобретению, и того, как их производить и применять. Объем или значение любого применения термина будут ясны из конкретного контекста, в котором

применяют термин.

"Примерно" и "приблизительно", как правило, следует понимать как допустимую степень ошибки для количества, измеренного с учетом основных свойств или точности измерений. Как правило, примерные степени ошибки находятся в пределах 20 процентов (%), предпочтительно в пределах 10% и более предпочтительно в пределах 5% от данной величины или диапазона величин.

Альтернативно и конкретно в биологических системах, термины "примерно" и "приблизительно" могут означать величины, которые находятся в пределах порядка величины, предпочтительно в пределах 5-кратной величины и более предпочтительно в пределах 2-кратной величины от приведенного значения. Численные величины, приведенные в настоящем документе, являются приблизительными, если не указано иначе, означая, что термин "приблизительно" или "примерно" подразумевается, если прямо не указано.

Способы по изобретению могут включать этапы сравнения последовательностей друг с другом, в том числе последовательности дикого типа с одной или несколькими мутантными (вариантными последовательностями). Такие сравнения, как правило, включают выравнивание последовательностей полимеров, например, с использованием программ и/или алгоритмов для выравнивания последовательностей, которые хорошо известны в данной области (например, BLAST, FASTA и MEGALIGN, чтобы назвать несколько). Специалисты в данной области могут легко понять, что, в таких выравниваниях, где мутация включает вставку или делецию остатка, выравнивание последовательностей будет вводить "пропуск" (как правило, представленный тире или "A") в последовательности полимера, которая не содержит вставку или делецию остатка.

"Гомологичный" во всех его грамматических формах и вариантах написания относится к взаимосвязи между двумя белками, которые обладают "общим эволюционным происхождением", включая белки из суперсемейств тех же самых видов организмов, а также гомологичные белки из различных видов организмов. Такие

белки (и кодирующие их нуклеиновые кислоты) имеют гомологию последовательностей, что отражается в сходстве их последовательностей, или в отношении процента идентичности, или за счет присутствия специфичных остатков или мотивов и консервативных положений.

Термин "сходство последовательностей" во всех его грамматических формах, относится к степени идентичности или соответствия между нуклеиновыми кислотами или аминокислотными последовательностями, которые могут иметь или не иметь общее эволюционное происхождение.

Однако в обиходе и в настоящей заявке, термин "гомологичный" при модификации наречием, таким как "высоко" может относиться к сходству последовательностей и может быть связан или не связан с общим эволюционным происхождением.

2. Полипептиды-ловушки GDF

В определенных аспектах изобретение относится к полипептидам-ловушкам GDF, например, растворимым вариантным полипептидам ActRIIB, включая, например, фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы полипептидов ActRIIB. В определенных вариантах осуществления полипептиды-ловушки GDF имеют по меньшей мере одну сходную или такую же активность, что и соответствующий полипептид ActRIIB дикого типа. Например, полипептид-ловушка GDF по изобретению может связываться с лигандом ActRIIB (например, активином А, активином АВ, активином В, Nodal, GDF8, GDF11 или BMP7) и ингибировать его функцию. Необязательно, полипептид-ловушка GDF повышает уровень эритроцитов. Примеры полипептидов-ловушек GDF включают предшественники полипептидов ActRIIB человека (SEQ ID NO: 1 или 39) с одним или несколькими изменениями последовательности, и растворимые полипептиды ActRIIB человека (например, SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 и 41) с одним или несколькими изменениями последовательности.

Применяемый в настоящем документе термин "ActRIIB" относится к семейству белков-рецепторов активина типа IIb (ActRIIB) из любых видов и к вариантам, полученным из таких белков ActRIIB путем мутагенеза или другой модификации. Ссылку

на ActRIIB в настоящем документе следует понимать как ссылку на любую одну из форм, идентифицированных к настоящему времени. Члены семейства ActRIIB представляют собой, как правило, трансмембранные белки, состоящие из лиганд-связывающего внеклеточного домена с областью, богатой цистеином, трансмембранного домена и цитоплазматического домена с предсказанной серин/треониновой киназной активностью. Аминокислотные последовательности растворимого внеклеточного домена ActRIIA человека (представленные для сравнения) и растворимого внеклеточного домена ActRIIB показаны на фиг.1.

Термин "полипептид ActRIIB" включает полипептиды, содержащие любой природный полипептид члена семейства ActRIIB, а также любые его варианты (в том числе, мутанты, фрагменты, слияния и пептидомиметические формы), которые сохраняют полезную активность. См., например, WO 2006/012627. Например, полипептиды ActRIIB включают полипептиды, полученные из последовательности любого известного ActRIIB, с последовательностью, на по меньшей мере приблизительно 80% идентичной последовательности полипептида ActRIIB, и необязательно, с по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или большей идентичностью. Например, полипептид ActRIIB может связываться с белком ActRIIB и/или активинем и ингибировать его функцию. Полипептид ActRIIB, который представляет собой ловушку GDF, можно выбирать для действия, способствующего образованию эритроцитов *in vivo*. Примеры полипептидов ActRIIB включают предшественник полипептида ActRIIB человека (SEQ ID NO: 1 и 39) и растворимые полипептиды ActRIIB человека (например, SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 и 41). Нумерация аминокислот для всех полипептидов, относящихся к ActRIIB и описываемых в настоящем документе, приведена на основании SEQ ID NO: 1, если конкретно не обозначено иное.

Последовательность белка-предшественника ActRIIB человека представлена ниже:

MTAPWVALALLWGSLWPGS**GRGEAETRECIYYNANWELERT**N**QSGLERC**
EGEQDKRLHCYASWRN**SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ**
VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTLLTLVLAYSLLPIG
 GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPPSPLVGLKPLQLEIK
 ARGRFGCVWKAQLMNDNFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLL
 QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGNIITWNELCHVAETM
 SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLA
 VRFEFGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLV
 LWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIK
 DHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS
 DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEQ ID NO: 1)

Сигнальный пептид подчеркнут одной линией; внеклеточный домен выделен жирным, и потенциальные N-связанные участки гликозилирования находятся в рамках.

Форма с аланином в положении 64, также описанная в литературе, представлена ниже:

MTAPWVALALLWGSLWPGS**GRGEAETRECIYYNANWELERT**N**QSGLERC**
EGEQDKRLHCYASWAN**SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ**
VYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTLLTLVLAYSLLPIG
 GLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPPSPLVGLKPLQLEIK
 ARGRFGCVWKAQLMNDNFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLL
 QFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGNIITWNELCHVAETM
 SRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLA
 VRFEFGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLV
 LWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKMRPTIK
 DHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS
 DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI (SEQ ID NO: 39)

Последовательность растворимого (внеклеточного) процессированного полипептида ActRIIB человека представлена ниже:

GRGEAETRECIYYNANWELERTN**QSGLERCEGEQDKRLHCYASWR**NSSG
 TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQ**VYFCCCEGNFCNERFTHL**
PEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 2)

Альтернативная форма с A64 представлена ниже:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG
 TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
EAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 40)

При некоторых условиях белок можно получать с "SGR..." последовательностью на N-конце. С-концевой "хвост" внеклеточного домена подчеркнут. Последовательность с удаленным "хвостом" (последовательность Δ15) представлена ниже:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG
 TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
 EA (SEQ ID NO: 3)

Альтернативная форма с A64 представлена ниже:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG
 TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLP
 EA (SEQ ID NO: 41)

При некоторых условиях белок можно получать с "SGR..." последовательностью на N-конце. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-предшественник ActRIIB человека, представлена ниже: (нуклеотиды 5-1543 из записи Genbank NM_001106) (Как показано, последовательность содержит аланин в положении 64 и может быть модифицирована для содержания вместо него аргинина)

ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGGC
 CCGGCTCTGGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAA
 CGCCAACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGC
 GAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACA
 GCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTT
 CAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAG
 GTGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTC
 ATTTGCCAGAGGCTGGGGGCCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGAC
 AGCCCCCACCCTGCTCACGGTGCTGGCCTACTCACTGCTGCCCATCGGG
 GGCCTTTCCTCATCGTCCTGCTGGCCTTTTGGATGTACCGGCATCGCA
 AGCCCCCCTACGGTCATGTGGACATCCATGAGGACCCTGGGCCTCCACC
 ACCATCCCCTCTGGTGGGCCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAAG
 GCTCGGGGGCGCTTTGGCTGTGTCTGGAAGGCCAGCTCATGAATGACT
 TTGTAGCTGTCAAGATCTTCCCACTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAG

TGAACGGGAGATCTTCAGCACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCTGCTA
 CAGTTCATTGCTGCCGAGAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAGCTGT
 GGCTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCCTCACGGATTACCTCAA
 GGGGAACATCATCACATGGAACGAACTGTGTCATGTAGCAGAGACGATG
 TCACGAGGCCTCTCATACTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGCCGTGGCG
 AGGGCCACAAGCCGTCTATTGCCACAGGGACTTTAAAAGTAAGAATGT
 ATTGCTGAAGAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCTGACTTTGGCTTGGCT
 GTTCGATTTGAGCCAGGGAAACCTCCAGGGGACACCCACGGACAGGTAG
 GCACGAGACGGTACATGGCTCCTGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTT
 CCAGAGAGATGCCTTCCTGCGCATTGACATGTATGCCATGGGGTTGGTG
 CTGTGGGAGCTTGTGTCTCGCTGCAAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATG
 AGTACATGCTGCCCTTTGAGGAAGAGATTGGCCAGCACCCCTTCGTTGGA
 GGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTGCACAAGAAGATGAGGCCACCATTA
 AAGATCACTGGTTGAAACACCCGGGCCTGGCCCAGCTTTGTGTGACCATCG
 AGGAGTGCTGGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTGTCCGCGGGCTGTGT
 GGAGGAGCGGGTGTCCCTGATTCGGAGGTCGGTCAACGGCACTACCTCG
 GACTGTCTCGTTTCCCTGGTGACCTCTGTACCAATGTGGACCTGCCCC
 CTAAGAGTCAAGCATCTAA (SEQ ID NO: 4)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей растворимый (внеклеточный) полипептид ActRIIB человека представлена ниже (Как показано, последовательность содержит аланин в положении 64 и может быть модифицирована для содержания вместо него аргинина):

GGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCAACT
 GGGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGGCGA
 GCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGGCCAACAGCTCTGGC
 ACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACTGCT
 ACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTA
 CTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTTGCCA
 GAGGCTGGGGGCCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCGACAGCCCCCA
 CC (SEQ ID NO: 5)

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к полипептидам-ловушкам GDF, которые представляют собой варианты формы растворимых полипептидов ActRIIB. Как описано в настоящем документе, термин "растворимый полипептид ActRIIB",

как правило, относится к полипептидам, содержащим внеклеточный домен белка ActRIIB. Применяемый в настоящем документе термин "растворимый полипептид ActRIIB" включает любой природный внеклеточный домен белка ActRIIB, а также любые его варианты (в том числе мутанты, фрагменты и пептидомиметические формы), которые сохраняют полезную активность. Например, внеклеточный домен белка ActRIIB связывается с лигандом и, как правило, является растворимым. Примеры растворимых полипептидов ActRIIB включают растворимые полипептиды ActRIIB (например, SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 и 41). Другие примеры растворимых полипептидов ActRIIB содержат сигнальную последовательность в дополнение к внеклеточному домену белка ActRIIB, см. Пример 1. Сигнальная последовательность может представлять собой нативную сигнальную последовательность ActRIIB или сигнальную последовательность из другого белка, такую как сигнальная последовательность тканевого активатора плазминогена (ТРА) или сигнальная последовательность мелиттина медоносной пчелы (НВМ).

Изобретение рассматривает функционально активные части и варианты ActRIIB. Авторы заявки установили, что Fc-слитый белок с последовательностью, описанной Hilden et al. (Blood. 1994 Apr 15;83(8):2163-70), у которой аланин находится в в положении, соответствующем аминокислоте 64 из SEQ ID NO: 1 (A64), имеет относительно низкую аффинность к активину и GDF-11. В отличие от этого, тот же самый Fc-слитый белок с аргинином в положении 64 (R64) имеет аффинность к активину и GDF-11 в диапазоне от малого наномолярного количества до высокого пикомолярного. Таким образом, последовательность с R64 в этом изобретении используют в виде референсной последовательности дикого типа для ActRIIB человека.

Attisano et al. (Cell. 1992 Jan 10;68(1):97-108) показали, что делеция пролинового узла на С-конце внеклеточного домена ActRIIB уменьшает аффинность рецептора к активину. ActRIIB-Fc слитый белок, содержащий аминокислоты 20-119 из SEQ ID NO: 1, "ActRIIB(20-119)-Fc", обладает пониженным связыванием с GDF-11 и активином по сравнению с ActRIIB(20-134)-Fc, который содержит

область пролинового узла и полный околосмембранный домен. Однако, белок ActRIIB(20-129)-Fc сохраняет сходную, но несколько сниженную активность по сравнению с диким типом, даже несмотря на разрушение области пролинового узла. Таким образом, ожидается, что внеклеточные домены ActRIIB, которые заканчиваются на аминокислоте 134, 133, 132, 131, 130 и 129, будут активными, а конструкции, которые заканчиваются на 134 или 133, могут быть наиболее активными. Аналогично, ожидается, что мутации по любому из остатков 129-134 не изменят аффинность к лиганду в большом интервале. В поддержку этого, мутации P129 и P130 по существу не снижают связывание лиганда. Таким образом, полипептид-ловушка GDF, который представляет собой ActRIIB-Fc-слитый белок, может заканчиваться уже на аминокислоте 109 (последний цистеин), однако, ожидается, что формы, которые заканчиваются на 109 и 119 или между ними, будут иметь пониженное связывание лиганда. Аминокислота 119 является слабо консервативной и поэтому может быть легко изменена или удалена. Формы, которые заканчиваются на 128 или дальше, сохраняют активность связывания лиганда. Формы, которые заканчиваются на 119 и 127 или между ними, будут иметь промежуточную активность связывания. Любые из этих форм могут быть подходящими для использования, в зависимости от клинических или экспериментальных условий.

На N-конце ActRIIB, ожидается, что белок, который начинается с аминокислоты 29 или раньше, будет сохранять активность связывания лиганда. Аминокислота 29 представляет собой начальный цистеин. Мутация аланина на аспарагин в положении 24 вводит последовательность с N-связанным гликозилированием по существу без изменения связывания лиганда. Это подтверждает, что мутации в области между отщеплением сигнального пептида и областью поперечно-связанных цистеинов, соответствующей аминокислотам 20-29, хорошо переносятся. В частности, конструкции, которые начинаются с положений 20, 21, 22, 23 и 24, будут сохранять активность, и ожидается, что конструкции, которые начинаются с положений 25, 26, 27, 28 и 29, также будут сохранять активность. Данные, показанные в

Примерах, демонстрируют, что, неожиданно, конструкция, которая начинается с 22, 23, 24 или 25, будет иметь наибольшую активность.

В совокупности, активная часть ActRIIB содержит аминокислоты 29-109 SEQ ID NO: 1, и конструкции ловушки GDF могут, например, содержать часть ActRIIB, которая начинается с остатка, соответствующего аминокислотам 20-29 SEQ ID NO: 1 или 39 и заканчивается в положении, соответствующем аминокислотам 109-134 SEQ ID NO: 1 или 39. Другие примеры включают конструкции, которые начинаются в положении от 20-29 или 21-29 и заканчиваются в положении от 119-134, 119-133, 129-134 или 129-133 SEQ ID NO: 1 или 39. Другие примеры включают конструкции, которые начинаются в положении от 20-24 (или 21-24 или 22-25) и заканчиваются в положении от 109-134 (или 109-133), 119-134 (или 119-133) или 129-134 (или 129-133) SEQ ID NO: 1 или 39. Варианты в пределах этих диапазонов также рассматриваются изобретением, в частности, те, которые имеют по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности с соответствующей частью SEQ ID NO: 1 или 39. В определенных вариантах осуществления полипептид-ловушка GDF включает, содержит по существу или содержит полипептид с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотным остаткам 25-131 SEQ ID NO: 1 или 39. В определенных вариантах осуществления полипептид-ловушка GDF включает, содержит по существу или содержит полипептид с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 7, 26, 28, 29, 32, 37 или 38. В предпочтительных вариантах осуществления полипептид-ловушка GDF включает или содержит по существу аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, 26, 28, 29, 32, 37 или 38.

Изобретение включает результаты композитного анализа структур ActRIIB, показанных на фиг.1, демонстрируя, что лиганд-связывающий карман определяется остатками Y31, N33, N35, от L38 до T41, E47, E50, от Q53 до K55, L57, H58, Y60, S62,

K74, от W78 до N83, Y85, R87, A92 и от E94 до F101. Ожидается, что в этих положениях будут допустимы консервативные мутации, хотя мутация K74A хорошо переносится, также как R40A, K55A, F82A и мутации в положении L79. R40 является K у шпорцевой лягушки (*Xenopus*), указывая на то, что основные аминокислоты допустимы в этом положении. Q53 является R в бычьем ActRIIB и K у *Xenopus* ActRIIB, и, таким образом, аминокислоты, включающие R, K, Q, N и H, будут допустимы в этом положении. Таким образом, общей формулой для белка-ловушки GDF является та, которая содержит аминокислоты 29-109 SEQ ID NO: 1 или 39, но необязательно начинается с положения в диапазоне от 20-24 или 22-25 и заканчивается в положении в диапазоне от 129-134, и включает не более чем 1, 2, 5, 10 или 15 консервативных аминокислотных замен в лиганд-связывающем кармане, и ни одного, одно или несколько неконсервативных изменений в положениях 40, 53, 55, 74, 79 и/или 82 в лиганд-связывающем кармане. Такой белок может сохранять более чем 80%, 90%, 95% или 99% идентичности последовательности с последовательностью аминокислот 29-109 SEQ ID NO: 1 или 39. Участки вне лиганд-связывающего кармана, в которых вариабельность может особенно хорошо переноситься, включают амино- и карбоксиконцы внеклеточного домена (как указано выше), и положения 42-46 и 65-73. Замена аспарагина на аланин в положении 65 (N65A) действительно улучшает связывание лиганда на фоне A64, и, таким образом, ожидается, что не будет разрушительного эффекта на связывание лиганда на фоне R64. Эта замена, возможно, удаляет гликозилирование в N65 на фоне A64, таким образом, демонстрируя, что значительное изменение в этой области, по-видимому, допустимо. Хотя замена R64A плохо переносится, R64K переносится хорошо, и, таким образом, другой основной остаток, такой как H, может быть допустим в положении 64.

ActRIIB является высоко консервативным почти у всех позвоночных, с большими отрезками внеклеточного домена, которые полностью консервативны. Многие из лигандов, которые связываются с ActRIIB, также являются высоко консервативными. Таким образом, сравнения последовательностей ActRIIB из

различных организмов позвоночных дают понимание того, какие остатки могут быть изменены. Таким образом, активный вариантный полипептид ActRIIB человека, подходящий в качестве ловушки GDF, может включать одну или несколько аминокислот в соответствующих положениях из последовательности ActRIIB другого позвоночного, или может включать остаток, который аналогичен остатку в последовательности человека или другого позвоночного. Следующие примеры иллюстрируют этот подход для определения активного варианта ActRIIB. L46 является валином в ActRIIB *Xenopus*, и, таким образом, это положение может быть изменено, и необязательно может быть изменено на другой гидрофобный остаток, такой как V, I или F, или на неполярный остаток, такой как A. E52 является K у *Xenopus*, указывая на то, что в этом участке допустим широкий ряд изменений, включая полярные остатки, такие как E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y и, вероятно, A. T93 является K у *Xenopus*, указывая на то, что обширное структурное изменение допустимо в этом положении, с предпочтительными полярными остатками, такими как S, K, R, E, D, H, G, P, G и Y. F108 является Y у *Xenopus*, и, таким образом, Y или другая гидрофобная группа, такая как I, V или L, должна быть допустима. E111 является K у *Xenopus*, указывая на то, что заряженные остатки будут допустимы в этом положении, включая D, R, K и H, а также Q и N. R112 является K у *Xenopus*, указывая на то, что основные остатки будут допустимы в этом положении, включая R и H. А в положении 119 относительно слабо консервативен, и является P у грызунов и V у *Xenopus*, таким образом, по существу любая аминокислота будет допустима в этом положении.

Изобретение демонстрирует, что добавление дополнительного N-связанного участка гликозилирования (N-X-S/T) увеличивает время полувыведения из сыворотки слитого белка ActRIIB-Fc по сравнению с формой ActRIIB(R64)-Fc. За счет введения аспарагина в положение 24 (конструкция A24N), создается последовательность NXT, которая может обладать более длинным полувыведением. Другие последовательности NX(T/S) обнаружены в положениях 42-44 (NQS) и 65-67 (NSS), хотя последняя может не быть эффективно

гликозилирована с R в положении 64. Последовательности N-X-S/T могут быть, в основном, введены в положениях вне лиганд-связывающего кармана, определенного на фиг.1. Особенно подходящие участки для введения не-эндогенных последовательностей N-X-S/T включают аминокислоты 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 или 129-134. Последовательности N-X-S/T можно также вводить в линкер между последовательностью ActRIIB и Fc или другим слитым компонентом. Такой участок может быть введен с минимальными усилиями путем введения N в правильное положение в отношении ранее существующих S или T, или путем введения S или T в положение, соответствующее ранее существующему N. Таким образом, желательные изменения, которые могут создавать N-связанный участок гликозилирования, представляют собой: A24N, R64N, S67N (возможно в сочетании с заменой N65A), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S и R112T. Любой S, для которого предсказано гликозилирование, может быть изменен на T без создания иммунногенного сайта, из-за защиты, предоставляемой гликозилированием. Аналогично, любой T, для которого предсказано гликозилирование, может быть изменен на S. Таким образом, рассматриваются изменения S67T и S44T. Аналогично, в варианте A24N можно использовать замену S26T. Таким образом, ловушка GDF может представлять собой вариант ActRIIB с одной или несколькими дополнительными, не-эндогенными консенсусными последовательностями с N-связанным гликозилированием.

Положение L79 ActRIIB может быть изменено для приобретения измененных свойств связывания активина-миостатина (GDF-11). L79P уменьшает связывание GDF-11 в большей степени, чем связывание активина. L79E или L79D сохраняет связывание GDF-11. Примечательно, что варианты L79E и L79D имеют значительно сниженное связывание активина. Эксперименты *in vivo* указывают на то, что эти не-активиновые рецепторы сохраняют значительную способность повышать эритроциты, но показывают сниженное воздействие на другие ткани. Эти данные демонстрируют желательность и целесообразность получения полипептидов со сниженным действием на активин. В иллюстративных вариантах

осуществления, способы, описываемые в настоящем документе, используют полипептид-ловушку GDF, которая представляет собой вариантный полипептид ActRIIB, содержащий кислую аминокислоту (например, D или E) в положении, соответствующем положению 79 SEQ ID NO: 1 или 39, необязательно в комбинации с одной или несколькими дополнительными заменами аминокислот, добавлениями или делециями.

Описанные вариации можно комбинировать различными способами. Дополнительно, результаты программ по мутагенезу, описываемые в настоящем документе, указывают, что существуют аминокислотные положения в ActRIIB, которые зачастую выгодно сохранить. Эти положения включают положение 64 (основная аминокислота), положение 80 (кислая или гидрофобная аминокислота), положение 78 (гидрофобная, и конкретно триптофан), положение 37 (кислая, и конкретно аспарагиновая или глутаминовая кислота), положение 56 (основная аминокислота), положение 60 (гидрофобн аминокислота, конкретно фенилаланин или тирозин). Таким образом, в каждом из вариантов, описываемых в настоящем документе, изобретение относится к каркасу аминокислот, который может быть сохранен. Другие положения, которые может быть желательно сохранить, являются следующими: положение 52 (кислая аминокислота), положение 55 (основная аминокислота), положение 81 (кислая), 98 (полярная или заряженная, конкретно E, D, R или K).

В определенных вариантах осуществления выделенные фрагменты полипептидов ActRIIB могут быть получены скринингом полипептидов, полученных рекомбинантными способами из соответствующего фрагмента нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид ActRIIB (например, SEQ ID NO: 4 и 5). Кроме того, фрагменты могут быть синтезированы химическим путем с применением известных в данной области способов, таких как общепринятый твердофазный пептидный синтез по Меррифилду f-Мос или t-Вос. Фрагменты могут быть получены (рекомбинантными способами или химическим синтезом) и протестированы для идентификации тех пептидильных фрагментов, которые могут действовать, например, в качестве антагонистов (ингибиторов)

или агонистов (активаторов) белка ActRIIB или лиганда ActRIIB.

В определенных вариантах осуществления полипептид-ловушка GDF представляет собой вариантный полипептид ActRIIB с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере 75% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 или 41. В определенных случаях, ловушка GDF имеет аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 или 41. В определенных вариантах осуществления ловушка GDF включает, содержит по существу или содержит аминокислотная последовательность, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 11, 26, 28, 29, 32, 37, 38, 40 или 41, где положение, соответствующее L79 SEQ ID NO: 1, представляет собой кислую аминокислоту (например, аминокислотный остаток D или E).

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к получению функциональных вариантов путем модификации структуры полипептида-ловушки GDF для таких целей, как повышение терапевтической эффективности или стабильности (например, хранение *ex vivo* и устойчивость к протеолитической деградаци *in vivo*). Полипептиды-ловушки GDF также можно получать путем замены, делеции или добавления аминокислоты. Например, логично ожидать, что отдельное замещение лейцина изолейцином или валином, аспартата глутаминатом, треонина серином, или аналогичное замещение аминокислоты структурно родственной аминокислотой (например, консервативные мутации) не будет иметь большого влияния на биологическую активность полученной в результате молекулы. Консервативные замены представляют собой замены, которые имеют место в пределах семейства аминокислот, родственных по их боковым цепям. Которая из замен в аминокислотной последовательности полипептида-ловушки GDF приводит к функциональному варианту, можно легко определить по оценке

способности полипептида-ловушки GDF вызывать ответ в клетках по сравнению с немодифицированным полипептидом-ловушкой GDF или полипептидом ActRIIB дикого типа, или по связыванию с одним или несколькими лигандами, такими как активин, GDF-11 или миостатин по сравнению с немодифицированным полипептидом-ловушкой GDF или полипептидом ActRIIB дикого типа.

В определенных конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к созданию мутаций во внеклеточном домене (также обозначаемом как лиганд-связывающий домен) полипептида ActRIIB, таким образом, что полипептид ActRIIB имеет измененную активность связывания лиганда (например, аффинность связывания или специфичность связывания). В определенных случаях, такие полипептиды-ловушки GDF имеют измененную (повышенную или сниженную) аффинность связывания для конкретного лиганда. В остальных случаях полипептиды-ловушки GDF имеют измененную специфичность связывания для лигандов ActRIIB.

Например, изобретение предлагает полипептиды-ловушки GDF, которые предпочтительно связываются с GDF8/GDF11 по отношению к активинам. Изобретение дополнительно устанавливает желательность таких полипептидов для уменьшения нецелевых воздействий, хотя такие селективные варианты могут быть менее желательны для лечения тяжелых заболеваний, где для терапевтического эффекта необходимы значительные улучшения в уровне эритроцитов и где приемлем некоторый уровень нецелевого воздействия. Например, аминокислотные остатки белка ActRIIB, такие как E39, K55, Y60, K74, W78, D80 и F101 находятся в лиганд-связывающем кармане и медируют связывание с лигандами, такими как активин и GDF8. Таким образом, настоящее изобретение относится к ловушке GDF, содержащей измененный лиганд-связывающий домен (например, GDF8-связывающий домен) рецептора ActRIIB, который содержит одну или несколько мутаций в этих аминокислотных остатках. Необязательно, измененный лиганд-связывающий домен может иметь повышенную селективность к лиганду, такому как GDF8, по сравнению с лиганд-связывающим доменом рецептора ActRIIB дикого типа. Для иллюстрации, эти

мутации повышают селективность измененного лиганд-связывающего домена к GDF8 по сравнению с активином. Необязательно, измененный лиганд-связывающий домен имеет соотношение K_d для связывания активина к K_d для связывания GDF8, которое в по меньшей мере 2, 5, 10, или даже в 100 раз больше относительно соотношения для лиганд-связывающего домена дикого типа. Необязательно, измененный лиганд-связывающий домен имеет соотношение IC_{50} для ингибирования активина к IC_{50} для ингибирования GDF8, которое в по меньшей мере 2, 5, 10 или даже в 100 раз больше относительно лиганд-связывающего домена дикого типа. Необязательно, измененный лиганд-связывающий домен ингибирует GDF8 с IC_{50} , в по меньшей мере 2, 5, 10, или даже в 100 меньше, чем IC_{50} для ингибирования активина.

В качестве конкретного примера, положительно заряженный аминокислотный остаток Asp (D80) из лиганд-связывающего домена ActRIIB может быть мутирован в другой аминокислотный остаток для получения полипептида-ловушки GDF, который предпочтительно связывается с GDF8, а не с активином. Предпочтительно, остаток D80 меняют на аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из: незаряженного аминокислотного остатка, отрицательно заряженного аминокислотного остатка и гидрофобного аминокислотного остатка. В качестве дополнительного конкретного примера, гидрофобный остаток, L79, может быть изменен на кислые аминокислоты – аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту, для того чтобы значительно снизить связывание активина с одновременным сохранением связывания GDF11. Специалисту в данной области будет понятно, что большинство описанных мутаций, вариантов или модификаций может быть произведено на уровне нуклеиновой кислоты или, в некоторых случаях, путем посттрансляционной модификации или химического синтеза. Такие способы хорошо известны в данной области.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полипептидам-ловушкам GDF, которые имеют специфические мутации в ActRIIB для изменения гликозилирования полипептида ActRIIB. Примеры сайтов гликозилирования в полипептидах-ловушках GDF показаны на фиг.1

(например, подчеркнутые сайты NX(S/T)). Такие мутации могут быть выбраны для введения или удаления одного или нескольких сайтов гликозилирования, таких как O-связанные или N-связанные сайты гликозилирования. Сайты распознавания аспарагин-связанного гликозилирования в основном содержат трипептидную последовательность, аспарагин-X-треонин (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 ActRIIB 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 аминокислотная делеция во втором положении) не приводит к гликозилированию в модифицированной трипептидой последовательности. Другим способом повышения количества углеводных частей на полипептиде-ловушке GDF является химическое или ферментативное соединение гликозидов с полипептидом-ловушкой GDF. В зависимости от используемого способа соединения сахар(-а) может быть присоединен к (а) аргинину и гистидину; (b) свободным карбоксильным группам; (с) свободным сульфгидрильным группам, таким как группы цистеина; (d) свободным гидроксильным группам, таким как группы серина, треонина или гидроксипролина; (e) ароматическим остаткам, таким как остатки фенилаланина, тирозина или триптофана; или (f) амидной группе глутамина. Эти способы описаны в WO 87/05330 и у Aplin и Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306, включенным посредством ссылки в настоящий документ. Удаление одной или нескольких углеводных частей, присутствующих на полипептиде-ловушке GDF, может осуществляться химически и/или ферментативно. Химическое дегликозилирование включает, например, воздействие на полипептид-ловушку GDF соединением трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентным соединением. Эта обработка в результате приводит к расщеплению большинства или всех сахаров, за исключением связывающего сахара (N-

ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), оставляя аминокислотную последовательность интактной. Химическое дегликозилирование дополнительно описано Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 и Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118: 131. Ферментативное расщепление углеводных частей на полипептидах-ловушках GDF может достигаться благодаря использованию целого ряда эндо- и экzogликозидаз, описанных Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. Последовательность полипептида-ловушки GDF может быть скорректирована соответствующим образом, в зависимости от типа используемой системы экспрессии, поскольку клетки млекопитающих, дрожжей, насекомых и растений могут вводить различные профили гликозилирования, на которые может влиять аминокислотная последовательность пептида. В основном полипептиды-ловушки GDF 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 дополнительно предлагается способ создания вариантов, в частности, наборов комбинаторных вариантов полипептида-ловушки GDF, включая, необязательно, укороченные варианты; пулы комбинаторных мутантов особенно подходят для идентификации последовательностей ловушек GDF. Целью скрининга таких комбинаторных библиотек может быть получение, например, вариантов полипептида-ловушки GDF, которые имеют измененные свойства, такие как измененная фармакокинетика или измененное связывание с лигандом. Целый ряд скрининговых исследований представлен ниже, и такие исследования могут быть использованы для оценки вариантов. Например, вариант полипептида-ловушки GDF может подвергаться скринингу на способность связываться с полипептидом ActRIIB, для предотвращения связывания лиганда ActRIIB с полипептидом ActRIIB или для нарушения передачи сигнала, вызываемого лигандом ActRIIB.

Активность полипептида-ловушки GDF или его вариантов также может быть протестирована в исследовании на основе клеток или

in vivo. Например, можно оценить воздействие варианта полипептида-ловушки GDF на экспрессию генов, вовлеченных в гематопоез. При необходимости это можно выполнить в присутствии одного или нескольких рекомбинантных белков-лигандов ActRIIB (например, активина), и клетки могут быть трансфицированы таким образом, чтобы вырабатывать полипептид-ловушку GDF и/или его варианты и, необязательно, лиганд ActRIIB. Подобным образом полипептид-ловушку GDF можно ввести мышам или другому животному и можно оценить при помощи общеизвестных в данной области способов один или несколько показателей крови, таких как количество эритроцитов, уровень гемоглобина, накопление железа или количество ретикулоцитов.

Можно создать варианты комбинаторного происхождения, которые имеют селективную эффективность по сравнению с референсным полипептидом-ловушкой GDF. Такие варианты белки, когда они экспрессируются с конструкций рекомбинантной ДНК, могут быть использованы в протоколах генной терапии. Аналогичным образом мутагенез может давать начало вариантам, которые имеют внутриклеточные периоды полужизни, резко отличающиеся от соответствующего немодифицированного полипептида-ловушки GDF. 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 немодифицированного полипептида-ловушки GDF. Такие варианты и гены, которые их кодируют, могут быть использованы для изменения уровней полипептида-ловушки GDF посредством модулирования периода полужизни полипептидов-ловушек GDF. Например, короткий период полужизни может приводить к более неустойчивым биологическим эффектам и, в части индуцибельной системы экспрессии, может дать возможность осуществлять более жесткий контроль над уровнями рекомбинантного полипептида-ловушки GDF в клетке. В Fc-слитом белке мутации могут быть сделаны в линкере (при наличии) и/или в Fc части для изменения периода полужизни белка.

В определенных вариантах осуществления полипептиды-ловушки

GDF по изобретению могут дополнительно содержать посттрансляционные модификации помимо любых, природным образом присутствующих в полипептидах ActRIIB. Такие модификации включают, но ими не ограничиваются, ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, липидирование и ацилирование. В результате полипептиды-ловушки GDF могут содержать неаминокислотные элементы, такие как полиэтиленгликоли, липиды, поли- или моносахариды и фосфаты. Действие таких неаминокислотных элементов на функциональную активность полипептида-ловушки GDF может быть протестировано, как описано в настоящем документе для других вариантов полипептида-ловушки GDF. В тех случаях, когда полипептид-ловушка GDF продуцируется в клетках путем расщепления насцентной формы полипептида-ловушки GDF, 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 особую клеточную машинерию и характерные механизмы для таких посттрансляционных активностей и могут быть выбраны для обеспечения правильной модификации и процессинга полипептидов-ловушек GDF.

В определенных аспектах полипептиды-ловушки GDF включают слитые белки, имеющие по меньшей мере часть полипептида ActRIIB и один или несколько слитых доменов. Хорошо известные примеры таких слитых доменов включают, 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-ловушек GDF. Примеры таких детекционных доменов включают различные флуоресцентные 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 легкодоступны, включают FLAG, гемагглютинин вируса гриппа (HA) и метки 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 определенных предпочтительных вариантах осуществления полипептид-ловушка GDF слит с доменом, который стабилизирует полипептид-ловушку GDF *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. Известны слияния с частью Fc иммуноглобулина 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 домены мультимеризации (например, димеризации, тетрамеризации) и функциональные домены (которые придают дополнительную биологическую функцию, такую как дополнительное увеличение уровней красных клеток крови).

В качестве конкретного примера, настоящее изобретение относится к ловушке GDF, которая представляет собой слитый белок ActRIIB-Fc, включающий внеклеточный (например, лиганд-связывающий) домен полипептида ActRIIB, слитый с Fc-доменом. Последовательность примера Fc-домена показана ниже (SEQ ID NO: 6).

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVPIEKTISKAK
 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
 PFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK*

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

Понятно, что различные элементы слитых белков могут быть расположены любым образом, который совместим с желаемой функциональной активностью. Например, полипептид-ловушка GDF может быть расположен С-концом к гетерологичному домену, или, альтернативно, гетерологичный домен может быть расположен С-концом к полипептиду-ловушке GDF. Домен полипептида-ловушки GDF 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 определенных вариантах осуществления слитый белок-ловушка GDF содержит аминокислотную последовательность, представленную формулой А-В-С. Часть В представляет собой полипептид ActRIIB, укороченный с N- и С-концов, который включает аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотам 26-132 SEQ ID NO: 26. Части А и С могут независимо быть нулем, одной или более чем одной аминокислотой, и обе части А и С, при их наличии, являются гетерологичными части В. Части А и/или С могут быть присоединены к части В посредством линкерной последовательности. Примеры линкеров включают короткие полипептидные линкеры, такие как 2-10, 2-5,

2-4, 2-3 остатков глицина, таких как, например, линкер Gly-Gly-Gly. Другие подходящие линкеры описаны в настоящем документе выше. В определенных вариантах осуществления слитый белок-ловушка GDF содержит аминокислотную последовательность, представленную формулой A-B-C, где A представляет собой лидерную последовательность, B состоит из аминокислот 26-132 SEQ ID NO: 26, и C представляет собой полипептидную часть, которая улучшает один или несколько параметров из следующих: стабильность *in vivo*, период полужизни *in vivo*, захват/введение, локализация или распределение в ткани, образование белковых комплексов и/или очистка. В определенных вариантах осуществления слитый белок-ловушка GDF содержит аминокислотную последовательность, представленную формулой A-B-C, где A представляет собой лидерную последовательность ТРА, B состоит из аминокислот 26-132 SEQ ID NO: 26, и C представляет собой Fc-домен иммуноглобулина. Предпочтительный слитый белок-ловушка GDF содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 26.

В определенных вариантах осуществления полипептиды-ловушки GDF по настоящему изобретению содержат одну или несколько модификаций, которые способны стабилизировать полипептиды-ловушки GDF. Например, такие модификации увеличивают период полужизни *in vitro* полипептидов-ловушек GDF, увеличивают период полужизни полипептидов-ловушек GDF в кровообращении или уменьшают протеолитическое расщепление полипептидов-ловушек GDF. Такие стабилизирующие модификации включают, но ими не ограничиваются, слитые белки (в том числе, например, слитые белки, содержащие полипептид-ловушку GDF и стабилизирующий домен), модификации сайта гликозилирования (в том числе, например, добавление сайта гликозилирования к полипептиду-ловушке GDF) и модификации углеводной части (в том числе, например, удаление углеводных частей из полипептида-ловушки GDF). В случае слитых белков, полипептид-ловушка GDF слит со стабилизирующим доменом, таким как молекула IgG молекула (например, Fc-доменом). Используемый в настоящем описании термин "стабилизирующий домен" относится не только к слитому

домену (например, Fc), как в случае слитых белков, но также включает небелковые модификации, например, углеводную часть или небелковый полимер, например, полиэтиленгликоль.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение делает возможным получение изолированных и/или очищенных форм полипептидов-ловушек GDF, которые изолированы от других белков, или по существу свободны от них.

В определенных вариантах осуществления полипептиды-ловушки GDF по изобретению (немодифицированные или модифицированные) можно получать при помощи ряда известных способов. Например, такие полипептиды-ловушки GDF можно синтезировать с использованием стандартных способов белковой химии, таких как способы, описанные у Bodansky, M. *Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Berlin (1993) и Grant G. A. (ed.), *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W. H. Freeman и Company, New York (1992). Кроме того, коммерчески доступны автоматизированные пептидные синтезаторы (например, Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Bioscience 9600). Альтернативно, полипептиды-ловушки GDF, их фрагменты или варианты могут быть получены рекомбинантным способом с использованием различных экспрессирующих систем (например, *E. coli*, клетки китайского хомячка (CHO), клетки COS, бакуловирус), которые хорошо известны в данной области. В дополнительном варианте осуществления модифицированные или немодифицированные полипептиды-ловушки GDF можно получать путем расщепления рекомбинантных полноразмерных полипептидов-ловушек GDF с использованием, например, протеазы, например, трипсина, термолизина, химотрипсина, пепсина или фермента, расщепляющего белок в месте спаренных основных аминокислот (PACE). Для выявления сайтов протеолитического расщепления можно использовать компьютерный анализ (с использованием коммерчески доступного программного обеспечения, например, MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.). Альтернативно, такие полипептиды-ловушки GDF можно получать из рекомбинантных полноразмерных полипептидов-ловушек GDF с использованием стандартных способов, известных в данной области, таких как

химическое расщепление (например, бромистым цианогеном, гидроксиламином) .

3. Нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды-ловушки GDF

В определенных аспектах изобретение относится к выделенным и/или рекомбинантным нуклеиновым кислотам, кодирующим любые из полипептидов-ловушек GDF, описываемых в настоящем документе. SEQ ID NO: 4 кодирует природный полипептид-предшественник ActRIIB, в то время как SEQ ID NO: 5 кодирует растворимый полипептид ActRIIB, и SEQ ID NO: 25, 27, 30 и 31 кодируют растворимые ловушки GDF. Указанные нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными. Такие нуклеиновые кислоты могут быть ДНК или молекулами РНК. Эти нуклеиновые кислоты можно использовать, например, в способах для получения полипептидов-ловушек GDF или в качестве прямых терапевтических средств (например, при генотерапии) .

В определенных аспектах указанные нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды-ловушки GDF следует дополнительно понимать, как включающие нуклеиновые кислоты, которые являются вариантами SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 и 31. Вариантные нуклеотидные последовательности включают последовательности, которые отличаются одной или несколькими нуклеотидными заменами, добавлениями или делециями, такие как аллельные варианты; и будут, таким образом, включать кодирующие последовательности, которые отличаются от нуклеотидной последовательности из кодирующей последовательности, обозначенной в SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 и 31.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к выделенным или рекомбинантным последовательностям нуклеиновых кислот, которые на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 или 31. Специалисту в данной области будет понятно, что последовательности нуклеиновой кислоты, комплементарные SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 или 31, и варианты SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 или 31 также входят в объем настоящего изобретения. В дополнительных вариантах осуществления последовательности нуклеиновой кислоты по изобретению могут быть выделенными,

рекомбинантными и/или слитыми с гетерологичной нуклеотидной последовательностью, или могут находиться в ДНК-библиотеке.

В других вариантах осуществления нуклеиновые кислоты по изобретению также включают нуклеотидные последовательности, которые гибридизуются при очень жестких условиях с нуклеотидной последовательностью, обозначенной в SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 или 31, комплементарной последовательностью SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 или 31, или их фрагментами. Как указано выше, специалист в данной области легко поймет, что соответствующие жесткие условия, которые способствуют гибридизации ДНК, можно менять. Например, можно проводить гибридизацию при 6,0× хлорид натрия/цитрат натрия (SSC) при приблизительно 45°C, с последующей отмывкой 2,0× SSC при 50°C. Например, концентрацию соли на стадии отмывки можно выбирать от низкой жесткости приблизительно 2,0× SSC при 50°C до высокой жесткости приблизительно 0,2× SSC при 50°C. Кроме того, температура на стадии отмывки может быть повышена от условий с низкой жесткостью при комнатной температуре, приблизительно 22°C, до условий с высокой жесткостью при приблизительно 65°C. И температура, и соль могут изменяться, или температура или концентрация соли могут сохраняться постоянными, в то время как меняются другие переменные. В одном из вариантов осуществления изобретение относится к нуклеиновым кислотам, которые гибридизуются при условиях с низкой жесткостью 6× SSC при комнатной температуре с последующей отмывкой 2× SSC при комнатной температуре.

Выделенные нуклеиновые кислоты, которые отличаются от нуклеиновых кислот, указанных в SEQ ID NO: 5, 25, 27, 30 или 31 из-за вырожденности генетического кода, также находятся в пределах объема изобретения. Например, ряд аминокислот определяются более чем одним триплетом. Кодоны, которые обозначают одну и ту же аминокислоту, или синонимы (например, CAU и CAC являются синонимами для гистидина) могут приводить к "молчащим" мутациям, которые не влияют на аминокислотную

последовательность белка. В определенных вариантах осуществления полипептид-ловушка GDF кодируется альтернативной нуклеотидной последовательностью. Альтернативные нуклеотидные последовательности являются вырожденными по отношению к нативной последовательности нуклеиновой кислоты ловушки GDF, но все еще кодируют тот же самый слитый белок. В определенных вариантах осуществления ловушка GDF из SEQ ID NO: 26 кодируется альтернативной последовательностью нуклеиновой кислоты, включающей SEQ ID NO: 30. Однако полагают, что полиморфизмы последовательности ДНК, которые все же приводят к заменам в аминокислотных последовательностях указанных белков, будут встречаться в клетках млекопитающих. Специалисту в данной области понятно, что эти вариации в одном или нескольких нуклеотидах (вплоть до приблизительно 3-5% нуклеотидов) нуклеиновых кислот, кодирующих конкретный белок, могут встречаться у индивидуумов данных видов в связи с природной аллельной вариабельностью. Любая из таких нуклеотидных вариаций и все из них, и полученные в результате аминокислотные полиморфизмы находятся в объеме настоящего изобретения.

В определенных вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть функционально связаны с одной или несколькими регуляторными нуклеотидными последовательностями в экспрессирующей конструкции. Регуляторные нуклеотидные последовательности, как правило, будут соответствовать клетке-хозяину, которая применяется для экспрессии. В данной области известно множество типов подходящих экспрессирующих векторов и подходящих регуляторных последовательностей для ряда клеток-хозяев. Как правило, указанные одна или несколько регуляторных нуклеотидных последовательностей в качестве неограничивающих примеров могут включать промоторные последовательности, лидерные или сигнальные последовательности, участки связывания рибосомы, последовательности начала и терминации транскрипции, последовательности начала и терминации трансляции и энхансерные или активаторные последовательности. Конститутивные или индуцибельные промоторы, известные в данной области,

рассматриваются данным изобретением. Промоторы могут быть или природными промоторами, или гибридными промоторами, которые сочетают в себе элементы более чем одного промотора. Экспрессирующая конструкция может присутствовать в клетке в эписоме, такой как плаزمид, или экспрессирующая конструкция может быть вставлена в хромосому. В предпочтительном варианте осуществления экспрессирующий вектор содержит ген селективного маркера для возможности селекции трансформированных клеток-хозяев. Гены селективных маркеров хорошо известны в данной области и варьируют в зависимости от используемой клетки-хозяина.

В определенных аспектах по изобретению, указанная нуклеиновая кислота предлагается в экспрессирующем векторе, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид-ловушку GDF, и функционально связана, с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью. Регуляторные последовательности являются общепринятыми в данной области и выбраны для прямой экспрессии полипептида-ловушки GDF. Таким образом, термин регуляторная последовательность включает промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии. Примеры регуляторных последовательностей описаны у Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990). Например, для экспрессии в этих векторах последовательностей ДНК, кодирующих полипептид-ловушку GDF, можно использовать любую из широкого разнообразия последовательностей для контроля экспрессии, которые управляют экспрессией последовательности ДНК, когда они функционально связаны с ней. Такие подходящие последовательности для контроля экспрессии, включают, например, ранние и поздние промоторы SV40, tet промотор, предранний промотор аденовируса или цитомегаловируса, промоторы RSV, систему lac, систему trp, систему TAC или TRC, промотор T7, экспрессия которого управляется РНК-полимеразой T7, основной оператор и промотор областей фага лямбда, контрольные области для белка оболочки fd, промотор 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, промоторы кислой фосфатазы, например, Pho5,

промоторы α -спаривающего фактора дрожжей, полигедронный промотор бакуловирусной системы и другие последовательности, известные для контроля экспрессии генов прокариотических или эукариотических клеток или их вирусов, и их различные сочетания. Следует понимать, что конструкция экспрессирующего вектора может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина для трансформации и/или типа белка, который желательно экспрессировать. Кроме того, также следует учитывать число копий вектора, возможность контролировать это число копий и экспрессию любого другого белка, кодируемого этим вектором, такого как маркеры антибиотиков.

Рекомбинантную нуклеиновую кислоту по изобретению можно получать путем лигирования клонированного гена или его части в вектор, подходящий для экспрессии или в прокариотических клетках, или в эукариотических клетках (дрожжей, птиц, насекомых или млекопитающих), или и в тех, и в других. Экспрессионные носители для получения рекомбинантного полипептида-ловушки GDF включают плазмиды и другие векторы. Например, подходящие векторы включают плазмиды типов: pBR322-производные плазмиды, pEMBL-производные плазмиды, pEX-производные плазмиды, pBTac-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, pko-neo и pHyg, являются примерами экспрессирующих векторов млекопитающих, подходящих для трансфекции эукариотических клеток. Некоторые из этих векторов модифицированы последовательностями бактериальных плазмид, таких как 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 Эпштейн-Барра (pHEVo, 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 в данной области. Для других подходящих экспрессионных систем, как для прокариотических, так и для эукариотических клеток, а также для общих рекомбинантных способов см. *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 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 pBlueBac-производные векторы (такие как pBlueBac III, содержащий β -gal).

В предпочтительном варианте осуществления вектор конструируют для продукции рассматриваемых полипептидов-ловушек GDF в клетках CHO, например, вектор Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), векторы pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) и векторы pCI-neo (Promega, Madison, Wise). Как будет понятно, рассматриваемые генные конструкции могут быть использованы для стимуляции экспрессии рассматриваемых полипептидов-ловушек GDF 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, которые трансфицированы рекомбинантным геном, содержащим кодирующую последовательность (например, SEQ ID NO: 4, 5, 25, 27, 30 или 31) для одного или нескольких рассматриваемых полипептидов-ловушек GDF. Клетка-хозяин может быть любой прокариотической или эукариотической клеткой. Например,

полипептид-ловушка GDF по изобретению может экспрессироваться в бактериальных клетках, таких как *E. coli*, клетках насекомых (например, с помощью бакуловирусной экспрессионной системы), дрожжей или клетках млекопитающих. Другие подходящие клетки-хозяева известны специалистам в данной области.

Таким образом, настоящее изобретение дополнительно относится к способам получения рассматриваемых полипептидов-ловушек GDF. Например, клетка-хозяин, которая трансфицирована экспрессирующим вектором, кодирующим полипептид-ловушку GDF, может быть культивирована в соответствующих условиях, при которых возможна экспрессия полипептида-ловушки GDF. Полипептид-ловушка GDF может быть секретирован и выделен из смеси клеток и из среды, содержащей полипептид-ловушку GDF. Альтернативно, полипептид-ловушка GDF может сохраняться в цитоплазматической или в мембранной фракции, и клетки собирают, лизируют и выделяют белок. Клеточная культура содержит клетки-хозяева, среду и другие промежуточные продукты. Подходящие среды для клеточной культуры известны в данной области. Рассматриваемые полипептиды-ловушки GDF могут быть выделены из клеточной культуральной среды, клеток-хозяев или из того и другого способами, известными в данной области для очистки белков, в том числе с помощью ионообменной хроматографии, гель-фильтрации, ультрафильтрации, электрофореза, иммуноаффинной очистки с помощью антител, специфичных к конкретным эпитопам полипептидов-ловушек GDF. В предпочтительном варианте осуществления полипептид-ловушка GDF представляет собой слитый белок, содержащий домен, который облегчает его очистку.

В другом варианте осуществления слитый ген, кодирующий лидерную последовательность для очистки, например, последовательность сайта расщепления поли-(His)/энтерокиназой на N-конце требуемой части рекомбинантного полипептида-ловушки GDF, может дать возможность очистить экспрессированный слитый белок с помощью аффинной хроматографии, используя Ni^{2+} -металлическую смолу. Лидерную последовательность для очистки затем можно удалить посредством обработки энтерокиназой с получением очищенного полипептида-ловушки GDF (например, см.

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, амплификация генных фрагментов путем ПЦР 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. Скрининговые анализы

В определенных аспектах настоящее изобретение относится к применению указанных полипептидов-ловушек GDF (например, растворимых вариантных полипептидов ActRIIB) для выявления соединений (веществ), которые являются агонистами или антагонистами полипептидов ActRIIB. Соединения, выявленные 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 ActRIIB. В некоторых вариантах осуществления высокопроизводительный скрининг соединений может проводиться для идентификации средств, которые специфически ингибируют или уменьшают

связывание полипептида ActRIIB с его связывающим партнером, таким как лиганд ActRIIB. Альтернативно, анализ может быть использован для идентификации соединений, которые усиливают связывание полипептида ActRIIB с его связывающим партнером, таким как лиганд ActRIIB. В дополнительном варианте осуществления соединения могут быть идентифицированы по их способности взаимодействовать с полипептидом ActRIIB.

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 (вещества) по изобретению могут быть получены любым комбинаторным химическим способом. Альтернативно, рассматриваемые соединения могут быть природными биомолекулами, синтезированными *in vivo* или *in vitro*. Соединения (вещества), 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 рекомбинантным путем. Тестируемые соединения, рассматриваемые в настоящем изобретении, включают непептидные органические молекулы, пептиды, полипептиды, пептидомиметики, сахара, гормоны и молекулы нуклеиновых кислот. В конкретном варианте осуществления тестируемое вещество 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, полученных с помощью комбинаторной химии. Эти библиотеки могут содержать, например, спирты, алкилгалогениды, амины, амиды, сложные эфиры, альдегиды, простые эфиры и другие классы органических соединений. Введение тестируемых соединений в тест-систему может быть либо в изолированной 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-сшивающие вещества или их сочетания.

Во многих программах скрининга лекарственных средств, которые тестируют библиотеки соединений и природных экстрактов, желательны исследования с высокой пропускной способностью, для того чтобы максимально увеличить число соединений, проанализированных в заданный период времени. Анализы, которые проводят в бесклеточных системах, тех, которые могут быть получены с очищенными или полуочищенными белками, зачастую являются предпочтительными в качестве "первичных" скринингов, в которых они могут быть созданы 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 системе *in vitro*, анализ вместо этого сфокусирован, главным образом, на действии лекарственного средства на молекулярную мишень, которое может проявляться в изменении аффинности связывания между полипептидом ActRIIB и его связывающим партнером (например, лигандом ActRIIB).

Просто для иллюстрации, в примерном скрининговом анализе по настоящему изобретению соединение, представляющее интерес, контактирует с выделенным и очищенным полипептидом ActRIIB, который, как правило, способен связываться с лигандом ActRIIB, подходящим для цели анализа. К смеси соединения и полипептида ActRIIB затем добавляют композицию, содержащую лиганд ActRIIB. Выявление и количественный анализ комплексов ActRIIB/лиганд ActRIIB обеспечивает способы для определения эффективности соединения в отношении ингибирования (или потенцирования) образования комплекса между полипептидом ActRIIB и его

связывающим белком. Эффективность соединения можно оценить с помощью построения кривых доза-ответ на основании полученных данных, используя различные концентрации тестируемого соединения. Более того, также можно проводить контрольное исследование для получения фонового значения для сравнения. Например, в контрольном анализе выделенный и очищенный лиганд ActRIIB добавляют в композицию, содержащую полипептид ActRIIB, количественно оценивают образование комплекса ActRIIB/лиганд ActRIIB в отсутствие тестируемого соединения. Следует понимать, что, в основном, порядок, в котором реактивы могут смешиваться, может быть разным, и их можно смешивать одновременно. Более того, вместо очищенных белков можно использовать клеточные экстракты и лизаты для воспроизведения подходящей бесклеточной системы анализа.

Образование комплекса между полипептидом ActRIIB и его связывающим белком можно выявить с помощью целого ряда способов. Например, модуляция образования комплексов может быть проанализирована количественно, например, с помощью детектируемых меченных белков, например радиоактивно меченных (например, ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C или ^3H), флуоресцентно меченных (например, FITC) или ферментативно меченных полипептидов ActRIIB или его связывающего белка, с помощью иммуноанализа или с помощью хроматографического определения.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению анализов на основе флуоресцентной поляризации и анализов на основе резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) при измерении либо напрямую, либо опосредованно степени взаимодействия между полипептидом ActRIIB и его связывающим белком. Кроме того, другие способы выявления, например способы на основе оптических волноводов (публикация PCT WO 96/26432 и патент США No 5677196), поверхностного плазмонного резонанса (SPR), детекторов поверхностного заряда и детекторов силы поверхностного натяжения, совместимы со многими вариантами осуществления изобретения.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению

анализа улавливания взаимодействия, также известного как "двугибридный анализ" для идентификации соединений, которые нарушают или потенцируют взаимодействие между полипептидом ActRIIB и его связывающим партнером; см., например, патент США No 5283317; Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232; Madura et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) Biotechniques 14:920-924 и Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696). В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению обратных двугибридных систем для идентификации соединений (например, низкомолекулярных соединений или пептидов), которые разобщают взаимодействия между полипептидом ActRIIB 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 определенных вариантах осуществления рассматриваемые соединения идентифицируют по их способности взаимодействовать с полипептидом ActRIIB. Взаимодействие соединения и полипептида ActRIIB 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 меченным лигандом и аффинной хроматографией (Jakoby W.B. et al., 1974, Methods in Enzymology 46:1). В определенных случаях соединения могут подвергаться скринингу в анализе, основанном на конкретном механизме, например, в анализе для выявления соединений, которые связываются с полипептидом ActRIIB. Это исследование может включать твердофазное связывание или связывание в жидкой фазе. Альтернативно, ген, кодирующий полипептид ActRIIB, может быть трансфицирован вместе с репортерной системой (например, β -галактозидазой, люциферазой или зеленым флуоресцентным белком) в клетку и подвергнут скринингу в сравнении с библиотекой, предпочтительно 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 иммобилизированным антителом, или разделенной с помощью капиллярного электрофореза. Связанные соединения могут быть выявлены обычно с помощью колориметрического, флуоресцентного или поверхностного плазмонного резонанса.

5. Примеры терапевтических применений

В определенных вариантах осуществления полипептиды-ловушки GDF по настоящему изобретению можно использовать для повышения уровней эритроцитов у млекопитающих, таких как грызуны и приматы, и конкретно у пациентов-людей. Полипептиды-ловушки GDF, необязательно в сочетании с активатором рецептора EPO, могут быть полезными для лечения неэффективного эритропоэза. Исходно отличающийся от апластической анемии, кровотечения или периферического гемолиза на основании феррокинетических исследований (Ricketts et al, 1978, Clin Nucl Med 3: 159-164), неэффективный эритропоэз описывает разнородную группу анемий, при которых выработка зрелых RBC составляет меньше, чем можно было ожидать с учетом числа эритроидных предшественников (эритробластов), присутствующих в костном мозге (Tanno et al, 2010, Adv Hematol 2010:358283). При таких анемиях сохраняется тканевая гипоксия несмотря на повышенные уровни эритропоэтина из-за неэффективной выработки зрелых RBC. В конечном итоге развивается порочный круг, в котором повышенные уровни эритропоэтина управляют массивным увеличением числа эритробластов, потенциально приводя к спленомегалии (увеличению селезенки) из-за экстрамедуллярного эритропоэза (Aizawa et al, 2003, Am J Hematol 74:68-72), патологии костей, индуцированной эритробластами (Di Matteo et al, 2008, J Biol Regul Homeost Agents 22:211-216), и тканевой перегрузке железом, даже в отсутствие терапевтических переливаний RBC (Pippard et al, 1979, Lancet 2:819-821). Таким образом, за счет повышения эффективности эритропоэза полипептид-ловушка GDF может разорвать указанный выше круг и может облегчить не только

лежащую в его основе анемию, но также осложнения, связанные с повышенными уровнями эритропоэтина, спленомегалию, патологию костей и тканевую перегрузку железом. Полипептиды-ловушки GDF могут лечить неэффективный эритропоэз, в том числе, анемию и повышенные уровни ЕРО, а также осложнения, такие как спленомегалия, патология костей, индуцированная эритроблестами, и перегрузка железом, и сопутствующие им патологии. Со спленомегалией такие патологии включают боль в груди или в животе и ретикулоэндотелиальную гиперплазия. Экстрamedулярный гемопоэз может происходить не только в селезенке, но потенциально в других тканях в форме экстрamedулярных гематопозитических псевдоопухолей (Musallam et al, 2012, Cold Spring Harb Perspect Med 2:a013482). С патологией костей, индуцированной эритроблестами, сопутствующие патологии включают низкую минеральную плотность кости, остеопороз и боль в костях (Haidar et al, 2011, Bone 48:425-432). С перегрузкой железом, сопутствующие патологии включают супрессию гепсидина и гиперабсорбцию пищевого железа (Musallam et al, 2012, Blood Rev 26(Suppl 1):S16-S19), множественные эндокринопатии и фиброз/цирроз печени (Galanello et al., 2010, Orphanet J Rare Dis 5: 11), и кардиомиопатию, вызванную перегрузкой железом (Lekawanvijit et al., 2009, Can J Cardiol 25:213-218).

Наиболее частыми причинами неэффективного эритропоэза являются талассемические синдромы, наследственные гемоглобинопатии, при которых нарушение баланса выработки интактных альфа- и бета-цепей гемоглобина приводит к увеличению апоптоза во время созревания эритробластов (Schrier, 2002, Curr Opin Hematol 9:123-126). Талассемии в совокупности находятся среди наиболее частых генетических нарушений в мире, с изменяющимися эпидемиологическими паттернами, по прогнозам, вносящими вклад в растущую проблему для здравоохранения, как в США, так и во всем мире (Vichinsky, 2005, Ann NY Acad Sci 1054: 18-24). Талассемические синдромы называются согласно их тяжести. Таким образом, α -талассемии включают α -талассемию минор (также известную, как малая α -талассемия; два пораженных гена α -глобина), заболевание гемоглобина Н (три пораженных гена

α -глобина) и большую α -талассемию (также известную, как водянка плода; четыре пораженных гена α -глобина), β -талассемии включают β -талассемию минор (также известную, как малая β -талассемия; один пораженный ген β -глобина), промежуточную β -талассемию (два пораженных гена β -глобина), талассемию с гемоглобином Е (два пораженных гена β -глобина) и большую β -талассемию (также известную, как анемия Кули; два пораженных гена β -глобина, приводящие в результате к полному отсутствию белка β -глобина). β -талассемия поражает многие органы, ассоциирована со значительным уровнем заболеваемости и смертности, и в настоящее время требует пожизненного лечения. Хотя средняя продолжительность жизни у пациентов с β -талассемией в последние годы увеличилась за счет применения регулярных переливаний крови в комбинации с терапией хелаторами железа, перегрузка железом в результате переливаний и за счет избыточного желудочно-кишечного всасывания железа может вызывать серьезные осложнения, такие как заболевание сердца, тромбоз, гипогонадизм, гипотиреоз, диабет, остеопороз и остеопению (Rund et al, 2005, N Engl J Med 353: 1135-1146). Как показано в настоящем документе на мышинной модели β -талассемии, полипептид-ловушка GDF, необязательно в сочетании с активатором рецептора EPO, можно использовать для лечения талассемических синдромов. Полипептиды-ловушки GDF, необязательно в сочетании с активатором рецептора EPO, можно использовать для лечения нарушений с неэффективным эритропоэзом, помимо талассемических синдромов. Такие нарушения включают сидеробластную анемию (наследственную или приобретенную); дизэритропоэтическую анемию (Типы I и II); серповидно-клеточную анемию; наследственный сфероцитоз; дефицит пируваткиназы; мегалобластные анемии, потенциально вызванные условиями, такими как дефицит фолата (из-за врожденных заболеваний, сниженного потребления или повышенных потребностей), дефицит кобаламина (из-за врожденных заболеваний, пернициозная анемия, нарушенное всасывание, недостаточность поджелудочной железы или сниженное потребление), определенные лекарственные средства, или необъяснимые причины (наследственная дизэритропоэтическая

анемия, рефрактерная мегалобластная анемия или эритролейкоз); миелофтизные анемии, в том числе миелофиброз (миелоидная метаплазия) и миелофтиз; наследственную эритропоэтическую порфирию; и отравление свинцом.

Как применяют в настоящем документе, терапевтическое средство, которое "предупреждает" нарушение или состояние, относится к соединению, которое, на статистическом образце, уменьшает частоту возникновения нарушения или состояния у обработанного образца по сравнению с необработанным контрольным образцом, или замедляет манифестацию или уменьшает тяжесть одного или нескольких симптомов нарушения или состояния по сравнению с необработанным контрольным образцом. Применяемый в настоящем документе термин "лечение" включает улучшение или устранение состояния, как только оно было установлено. В любом случае, предупреждение или лечение можно различить по диагнозу, представленному врачом или другим медицинским работником, и ожидаемому результату введения терапевтического средства.

Как показано в настоящем документе, полипептиды-ловушки GDF, необязательно в сочетании с активатором рецептора EPO, можно использовать для повышения уровней эритроцитов, гемоглобина или ретикулоцитов у здоровых индивидуумов, и такие полипептиды-ловушки GDF можно использовать в выбранной популяции пациентов. Примеры подходящих популяций пациентов включают популяции с нежелательно низкими уровнями эритроцитов или гемоглобина, такие как пациенты с анемией, и популяции, которые имеют риск развития нежелательно низких уровней эритроцитов или гемоглобина, такие как пациенты, которым предстоит серьезная операция или другие процедуры, которые могут привести к существенной кровопотере. В одном из вариантов осуществления пациента с адекватными уровнями эритроцитов лечат полипептидом-ловушкой GDF для повышения уровней эритроцитов, а затем забирают кровь и хранят для дальнейшего использования в переливаниях.

Полипептиды-ловушки GDF, необязательно в сочетании с активатором рецептора EPO, описываемые в настоящем документе, можно использовать для повышения уровней эритроцитов у

пациентов с анемией. При наблюдении уровней гемоглобина у людей, уровень меньше нормы для соответствующей возрастной и гендерной категории может указывать на анемию, хотя учитываются индивидуальные вариации. Например, уровень гемоглобина 12 г/дл, как правило, считают нижней границей нормы в общей взрослой популяции. Возможные причины включают кровопотерю, дефицит питания, медикаментозную реакцию, различные проблемы с костным мозгом и множество заболеваний. Более конкретно, анемия ассоциирована с рядом нарушений, которые включают, например, хроническую почечную недостаточность, миелодиспластический синдром, ревматоидный артрит, пересадку костного мозга. Анемия может также быть ассоциирована со следующими состояниями: солидные опухоли (например, рак молочной железы, рак легких, рак толстого кишечника); опухоли лимфатической системы (например, хронический лимфолейкоз, неходжкинские лимфомы и лимфома Ходжкина); опухоли системы кроветворения (например, лейкоз, миелодиспластический синдром, множественная миелома); лучевая терапия; химиотерапия (например, схемы лечения, включающие препараты платины); воспалительные и аутоиммунные заболевания, включая в качестве неограничивающих примеров, ревматоидный артрит, другие воспалительные артриты, системная красная волчанка (SLE), острые или хронические заболевания кожи (например, псориаз), воспалительное заболевание кишечника (например, болезнь Крона и язвенный колит); острое или хроническое заболевание почек или недостаточность, включая идиопатические или врожденные состояния; острое или хроническое заболевание печени; острое или хроническое кровотечение; ситуации, когда невозможно переливание эритроцитов из-за алло- или аутоантител пациента и/или по религиозным причинам (например, у некоторых Свидетелей Иеговы); инфекции (например, малярия, остеомиелит); гемоглобинопатии, включая, например, серповидно-клеточное заболевание, талассемии; применение или злоупотребление лекарственными средствами, например, злоупотребление алкоголем; педиатрические пациенты с анемией, вызванной любой причиной, для того чтобы избежать переливания; и пожилые пациенты или пациенты с основным сердечно-легочным

заболеванием с анемией, которые не могут получать переливания из-за опасений относительно перегрузки кровообращения.

Миелодиспластический синдром (MDS) представляет собой разнородный набор гематологических состояний, которые характеризуются неэффективной выработкой миелоидных клеток крови и риском трансформации в острый миелогенный лейкоз. У пациентов с MDS, стволовые клетки крови не созревают в здоровые эритроциты, лейкоциты или тромбоциты. Миелодиспластические нарушения включают, например, рефрактерную анемию, рефрактерную анемию с кольцевыми сидеробластами, рефрактерную анемию с избытком бластов, рефрактерную анемию с избытком бластов в трансформации, рефрактерную цитопению с мультилинейной дисплазией и миелодиспластический синдром, ассоциированный с изолированной аномалией хромосомы 5q. Поскольку эти нарушения манифестируют как необратимые дефекты, как количества, так и качества гематopoэтических клеток, большинство пациентов с MDS страдают хронической анемией. Таким образом, пациентам с MDS в конечном итоге требуются переливания крови и/или лечение факторами роста (например, эритропоэтином или G-CSF) для повышения уровней эритроцитов. Однако, у многих пациентов с MDS развиваются побочные эффекты из-за частоты такого лечения. Например, пациенты, которые получали частые переливания эритроцитов, могут иметь повреждения органов и тканей из-за накопления дополнительного железа. Как показано в Примерах ниже, полипептиды-ловушки GDF применяли для лечения анемии у мышинной модели MDS. Таким образом, полипептиды-ловушки GDF, описываемые в настоящем документе, можно использовать для лечения пациентов с MDS. В определенных вариантах осуществления пациентов, страдающих от MDS, можно лечить с использованием комбинации полипептида-ловушки GDF в сочетании с активатором рецептора EPO. В других вариантах осуществления пациента, страдающего от MDS, можно лечить с использованием комбинации полипептида-ловушки GDF и одного или нескольких дополнительных терапевтических средств для лечения MDS, включающих, например, талидомид, леналидомид, азацитадин, децитабин, эритропоэтины, дефероксамин, антитимоцитарный глобулин, филграстим (G-CSF) и

агонист сигнального пути эритропоэтина.

Полипептиды-ловушки GDF, необязательно в сочетании с активатором рецептора EPO, целесообразны для лечения анемий при гипопролиферативном костном мозге, которые, как правило, ассоциированы с незначительными изменениями в морфологии эритроцитов (RBC). Гипопролиферативные анемии включают: 1) анемию при хроническом заболевании, 2) анемию при заболевании почек, и 3) анемию, ассоциированную с гипометаболическими состояниями. При каждом из этих типов уровни эндогенного эритропоэтина являются *чрезмерно низкими* для наблюдаемой степени анемии. Другие гипопролиферативные анемии включают: 4) раннюю стадию железодефицитной анемии, и 5) анемию, вызванную повреждением костного мозга. При этих типах уровни эндогенного эритропоэтина *повышены соответственно* наблюдаемой степени анемии.

Наиболее распространенным типом является анемия при хроническом заболевании, которое включает воспаление, инфекцию, повреждение тканей, и состояния, такие как злокачественная опухоль, и она отличается как низкими уровнями эритропоэтина, так и неадекватным ответом костного мозга на эритропоэтин (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th ed.; McGraw Hill, New York, pp 628-634). Многие факторы могут способствовать анемии, связанной со злокачественной опухолью. Некоторые из них сами по себе ассоциированы с патологическим процессом и выработкой провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-1, интерферон-гамма и фактор некроза опухоли (Bron et al., 2001, Semin Oncol 28(Suppl 8):1-6). Среди своих эффектов воспаление индуцирует ключевой пептид регуляции железа, гепсидин, таким образом, ингибируя экспорт железа из макрофагов и, как правило, ограничивая доступность железа для эритропоэза (Ganz, 2007, J Am Soc Nephrol 18:394-400). Кровопотеря посредством различных путей может также способствовать анемии, связанной со злокачественной опухолью. Частота возникновения анемии, связанной с прогрессированием злокачественной опухоли, варьирует в зависимости от типа злокачественной опухоли, в диапазоне от 5% при раке

предстательной железы вплоть до 90% при множественной миеломе. Анемия, связанная со злокачественной опухолью, имеет глубокие последствия для пациентов, включая утомляемость и сниженное качество жизни, сниженную эффективность лечения и повышенную смертность.

Хроническое заболевание почек ассоциировано с гипопролиферативной анемией, тяжесть которой меняется вместе со степенью почечной недостаточности. Такая анемия преимущественно связана с неадекватной выработкой эритропоэтина и сниженной выживаемостью эритроцитов. Хроническое заболевание почек, как правило, переходит постепенно в течение нескольких лет или десятилетий к терминальной стадии заболевания (Стадия-5), на которой для выживания пациента необходимы диализ или пересадка почки. Анемия часто развивается рано при этом процессе и ухудшается с прогрессированием заболевания. Клинические последствия анемии при заболевании почек документально зафиксированы и включают развитие гипертрофии левого желудочка, ухудшение когнитивной функции, сниженное качество жизни и изменение иммунной функции (Levin et al., 1999, Am J Kidney Dis 27:347-354; Nissenson, 1992, Am J Kidney Dis 20(Suppl 1):21-24; Revicki et al., 1995, Am J Kidney Dis 25:548-554; Gafter et al., 1994, Kidney Int 45:224-231). Как показано авторами заявки на мышинной модели хронического заболевания почек (см. Пример ниже), полипептид-ловушку GDF, необязательно в сочетании с активатором рецептора EPO, можно использовать для лечения анемии при заболевании почек.

Множество состояний, приводящих к низкому уровню метаболизма, могут вызывать гипопролиферативную анемию от легкой до умеренной степени. Среди таких состояний находятся состояния эндокринной недостаточности. Например, анемия может возникать при болезни Аддисона, гипотиреозе, гиперпаратиреозе, или у мужчин, кастрированных или принимающих эстроген. Анемия от легкой до умеренной степени может также возникать при пониженном потреблении белка с пищей, состояние, особенно распространенное у пожилых людей. Наконец, анемия может развиваться у пациентов с острым заболеванием печени,

возникающим практически по любой причине (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th ed.; McGraw Hill, New York, pp 628-634).

Анемия, возникающая в результате острой потери крови достаточного объема, такая как при травме или при послеродовом кровотечении, известна как острая постгеморрагическая анемия. Острая кровопотеря сначала вызывает гиповолемию без анемии, поскольку происходит пропорциональное истощение эритроцитов наряду с другими компонентами крови. Однако, гиповolemия быстро запускает физиологические механизмы, которые перемещают жидкость из экстраваскулярного в сосудистое пространство, что в результате приводит к разведению крови и анемии. При хроническом процессе, кровопотеря постепенно истощает запасы железа в организме и со временем приводит к дефициту железа. Как показали авторы заявки на мышиной модели (см. Пример ниже), полипептид-ловушку GDF, необязательно в сочетании с активатором рецептора EPO, можно использовать для быстрого восстановления от анемии при острой кровопотере.

Железодефицитная анемия представляет собой финальную стадию в постепенном прогрессировании увеличивающегося дефицита железа, которая включает отрицательный баланс железа и железодефицитный эритропоэз в виде промежуточных стадий. Недостаточность железа может быть результатом повышенной потребности в железе, сниженного потребления железа с пищей или повышенной потери железа, например, при состояниях, таких как беременность, неадекватная диета, нарушение всасывания в тонком кишечнике, острое или хроническое воспаление и острая или хроническая потеря крови. При анемии этого типа легкой или умеренной тяжести, костный мозг остается гипопролиферативным, и морфология эритроцитов остается, в основном, нормальной; однако, даже легкая анемия может приводить к некоторому количеству микроцитарных гипохромных RBC, и переход к тяжелой железодефицитной анемии сопровождается гиперпролиферацией в костном мозге и большим распространением микроцитарных и гипохромных RBC (Adamson, 2008, Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th ed.; McGraw Hill, New York, pp 628-

634). Подходящая терапия для железодефицитной анемии зависит от ее причины и тяжести, с пероральными препаратами железа, парентеральными составами железа и переливанием эритроцитов в качестве основных общепринятых вариантов. Полипептид-ловушка GDF, необязательно в сочетании с активатором рецептора EPO, может быть использован для лечения хронических железодефицитных анемий по отдельности или в комбинации с общепринятыми терапевтическими подходами, в частности, для лечения анемий мультифакторного происхождения.

Гипопролиферативные анемии могут быть результатом первичного нарушения функции или недостаточности костного мозга, а не нарушения функции, вторичной по отношению к воспалению, инфекции или прогрессированию злокачественной опухоли. Известным примером могла бы быть миелосупрессия, вызванная химиотерапией злокачественной опухоли или лучевой терапией злокачественной опухоли. Широкий обзор клинических испытаний выявил, что легкая анемия может встречаться у 100% пациентов после химиотерапии, в то время как более тяжелая анемия может встречаться вплоть до 80% из таких пациентов (Groopman et al, 1999, J Natl Cancer Inst 91: 1616-1634). Миелосупрессивные лекарственные средства включают: 1) алкилирующие средства, такие как азотистые иприты (например, мелфалан) и нитрозомочевины (например, стрептозоцин); 2) антиметаболиты, такие как антагонисты фолиевой кислоты (например, метотрексат), аналоги пуринов (например, тиогуанин), и аналоги пиримидинов (например, гемцитабин); 3) цитотоксические антибиотики, такие как антрациклины (например, доксорубин); 4) ингибиторы киназ (например, gefitinib); 5) ингибиторы митоза, такие как таксаны (например, паклитаксел) и алкалоиды барвинка (например, винорелбин); 6) моноклональные антитела (например, rituximab); и 7) ингибиторы топоизомеразы (например, топотекан и этопозид). Как показано на мышинной модели анемии, индуцированной химиотерапией (см. Пример ниже), полипептид-ловушку GDF, необязательно в сочетании с активатором рецептора EPO, можно использовать для лечения анемии, вызванной химиотерапевтическими средствами и/или лучевой терапией.

Полипептиды-ловушки GDF, необязательно в сочетании с активатором рецептора EPO, могут также подходить для лечения анемий при нарушенном созревании RBC, которое характеризуется частично меньшим размером (микроциты), большим размером (макроциты), деформацией или ненормальной окраской (гипохромия) RBC.

В определенных вариантах осуществления полипептиды-ловушки GDF можно использовать в сочетании (например, вводить в то же самое время или в другое время, но, как правило, таким образом, чтобы достичь перекрывающихся фармакологических воздействий) с поддерживающей терапией для неэффективного эритропоэза. Такая терапия включает переливание или эритроцитов, или цельной крови для лечения анемии. При хронических или наследственных анемиях, нормальные механизмы для гомеостаза железа перегружены частыми переливаниями, что, в конце концов, приводит к токсичному и потенциально летальному накоплению железа в жизненно важных тканях, таких как сердце, печень и эндокринные железы. Таким образом, поддерживающая терапия для пациентов, хронически страдающих от неэффективного эритропоэза, также включает лечение одной или несколькими молекулами, хелатирующими железо, для того чтобы содействовать выделению железа в моче и/или кале и, следовательно, превращать или инвертировать перегрузку тканей железом (Hershko, 2006, Haematologica 91: 1307-1312; Cao et al, 2011, Pediatr Rep 3(2):e17). Эффективные средства-хелаторы железа должны быть способны селективно связывать и нейтрализовать трехвалентное железо, окисленную форму железа, связанного не с трансферрином, которой, вероятно, объясняется большая часть токсичности железа из-за каталитической выработки гидроксильных радикалов и продуктов окисления (Esposito et al, 2003, Кровь 102:2670-2677). Эти средства могут быть структурно разными, но все они обладают донорными атомами кислорода или азота, способными образовывать нейтрализующие октаэдрические координационные комплексы с отдельными атомами железа в стехиометрическом соотношении 1:1 (гексадентатные вещества), 2:1 (тридентатные), или 3:1 (бидентатные) (Kalinowski et al, 2005, Pharmacol Rev 57:547-583). Эффективные средства-хелаторы

железа также имеют относительно низкую молекулярную массу (менее чем 700 Дальтон) с растворимостью в воде и липидах для возможности доступа в пораженные ткани. Конкретными примерами молекул-хелаторов железа являются дефероксамин, гексидентатное вещество бактериального происхождения, для которого необходимо ежедневное парентеральное введение, и перорально активные синтетические вещества деферипрон (бидентатное) и деферасирокс (тридентатное). Комбинированное лечение, включающее введение двух средств-хелаторов железа в один и тот же день, выглядит многообещающим у пациентов, не отвечающих на монотерапию хелаторами, и для преодоления проблем с плохим соблюдением пациентом схем лечения одним дефероксамином (Cao et al, 2011, *Pediatr Rep* 3(2):e17; Galanello et al, 2010, *Ann NY Acad Sci* 1202:79-86).

В определенных вариантах осуществления полипептиды-ловушки GDF можно использовать в комбинации с агонистами гепсидина для неэффективного эритропоэза. Циркулирующий полипептид, который в основном, вырабатывается в печени, гепсидин считается главным регулятором метаболизма железа в силу его способности индуцировать деградацию ферропортина, белка для экспорта железа, локализованного на всасывающих энтероцитах, гепатоцитах и макрофагах. В общих чертах, гепсидин, снижает доступность внеклеточного железа, поэтому агонисты гепсидина могут быть полезны для лечения неэффективного эритропоэза (Nemeth, 2010, *Adv Hematol* 2010:750643). Эта точка зрения поддерживается положительным воздействием повышенной экспрессии гепсидина на мышинной модели β -талассемии (Gardenghi et al, 2010, *J Clin Invest* 120:4466-4477).

Дополнительно, как показано в настоящем документе, полипептиды-ловушки GDF можно использовать в комбинации с активаторами рецептора EPO для достижения увеличения эритроцитов с диапазоном более низких доз. Это может быть выгодно для уменьшения известных нецелевых воздействий и рисков, ассоциированных с высокими дозами активаторов рецептора EPO. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения или предупреждения

анемии у индивидуума, которому это необходимо, посредством введения индивидууму терапевтически эффективного количества полипептида-ловушки GDF или комбинации (или сопутствующей терапии) полипептида-ловушки GDF и активатора рецептора EPO. Эти способы можно использовать для терапевтического и профилактического лечения млекопитающих, и в частности, людей.

Полипептиды-ловушки GDF можно использовать в комбинации с активаторами рецептора EPO для снижения необходимой дозы этих активаторов у пациентов, которые восприимчивы к неблагоприятным воздействиям EPO. Первичные неблагоприятные воздействия EPO представляют собой чрезмерное увеличение гематокрита или уровня гемоглобина и полицитемию. Повышенные уровни гематокрита могут привести к гипертензии (более конкретно, к ухудшению гипертензии) и сосудистому тромбозу. Другие неблагоприятные воздействия EPO, о которых сообщалось, некоторые из которых связаны с гипертензией, представляют собой головные боли, гриппоподобный синдром, закупорку шунтов, инфаркты миокарда и мозговые судороги из-за тромбоза, гипертензивную энцефалопатию и аплазию красных клеток крови (Singibarti, (1994) J. Clin Invest 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).

Быстрое воздействие полипептидов-ловушек GDF, описываемых в настоящем документе, на уровни эритроцитов, указывает на то, что эти вещества действуют по другому механизму, чем EPO. Таким образом, эти антагонисты могут быть полезны для повышения уровней эритроцитов и гемоглобина у пациентов, которые не реагируют на EPO. Например, полипептид-ловушка GDF может быть благоприятен для пациента, у которого введение дозы EPO от нормальной до повышенной (>300 IU/кг/неделя) не приводит к повышению уровня гемоглобина до целевого уровня. Пациенты с неадекватным ответом на EPO встречаются при всех типах анемии, но наибольшее число пациентов, не отвечающих на лечение, наблюдали особенно часто среди пациентов со злокачественными опухолями и пациентов с терминальной стадией почечной недостаточности. Неадекватный ответ на EPO может быть или

конститутивным (т.е. наблюдается после первого лечения ЕРО), или приобретенным (например, наблюдается после повторного лечения ЕРО).

Пациентов можно лечить с режимом дозирования, предназначенным для восстановления у пациента целевого уровня гемоглобина, как правило, приблизительно от 10 г/дл и приблизительно 12,5 г/дл, и, как правило, приблизительно 11,0 г/дл (см. также Jacobs et al. (2000) *Nephrol Dial Transplant* 15, 15-19), хотя более низкие целевые уровни могут вызывать меньше сердечно-сосудистых побочных эффектов. Альтернативно, в качестве параметра состояния эритроцитов можно использовать уровни гематокрита (процент от объема образца крови, занятый клетками). Уровни гематокрита для здоровых индивидуумов находятся в диапазоне от 41 до 51% для взрослых мужчин и от 35 до 45% для взрослых женщин. Целевые уровни гематокрита составляют, как правило, приблизительно 30-33%. Кроме того, уровни гемоглобина/гематокрита варьируют от человека к человеку. Таким образом, оптимально, если целевые уровни гемоглобина/гематокрита могут быть установлены индивидуально для каждого пациента.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам для ведения пациента, которого лечат полипептидом-ловушкой GDF или который является кандидатом на лечение полипептидом-ловушкой GDF, путем измерения одного или нескольких гематологических параметров у пациента. Гематологическ параметры можно использовать для оценки подходящего дозирования для пациента, который является кандидатом на лечение полипептидом-ловушкой GDF, для контроля гематологических параметров во время лечения полипептидом-ловушкой GDF, для оценки, не нужно ли скорректировать дозу во время лечения полипептидом-ловушкой GDF, и/или для оценки подходящей поддерживающей дозы полипептида-ловушки GDF. Если один или несколько гематологических параметров находятся за пределами уровня нормы, дозирование полипептида-ловушки GDF может быть уменьшено, отложено или прервано.

Гематологические параметры, которые можно измерять в

соответствии со способами, предлагаемыми в настоящем документе, включают, например, уровни эритроцитов, артериальное давление, накопление железа и другие вещества, которые обнаруживаются в жидкостях организма и которые коррелируют с повышенными уровнями эритроцитов, с использованием способов, известных в данной области. Такие параметры можно определять с использованием образца крови от пациента. Повышение уровней эритроцитов, гемоглобина и/или уровней гематокрита может вызвать повышение артериального давления.

В одном из вариантов осуществления, если один или несколько гематологических параметров находятся за пределами уровня нормы, или на верхней границе нормы у пациента, который является кандидатом на лечение полипептидом-ловушкой GDF, то начало введения полипептида-ловушки GDF может быть отложено до тех пор, пока гематологические параметры не вернуться к норме или приемлемому уровню, либо естественным путем, либо при помощи терапевтического вмешательства. Например, если пациент-кандидат имеет повышенное или близкое к повышенному давление, то пациента можно лечить при помощи средства, понижающего артериальное давление, для того чтобы уменьшить артериальное давление пациента. Можно использовать любое средство, понижающее артериальное давление, которое подходит для состояния конкретного пациента, в том числе, например, диуретики, ингибиторы адренергических рецепторов (включая альфа-блокаторы и бета-блокаторы), сосудорасширяющие средства, блокаторы кальциевых каналов, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (ACE) или блокаторы рецептора ангиотензина II. Артериальное давление альтернативно можно лечить с использованием диеты и системы упражнений. Аналогично, если пациент-кандидат имеет запасы железа ниже нормы или на нижней границе нормы, то пациента можно лечить при помощи подходящего режима диеты и/или препаратов железа, до тех пор пока запасы железа у пациента не вернуться к нормальному или приемлемому уровню. Для пациентов, имеющих уровни эритроцитов и/или гемоглобина выше нормы, введение полипептида-ловушки GDF может быть отложено до тех пор пока уровни не вернуться к

нормальному или приемлемому уровню.

В определенных вариантах осуществления, если один или несколько гематологических параметров находятся за пределами уровня нормы, или на верхней границе нормы у пациента, который является кандидатом на лечение полипептидом-ловушкой GDF, то начало введения может быть отложено. Однако величина дозы или частота дозирования полипептида-ловушки GDF могут быть установлены в количестве, которое снижало бы риск неприемлемого повышения гематологических параметров, возникающий после введения полипептида-ловушки GDF. Альтернативно, для пациента может быть разработана схема лечения, которая сочетает полипептид-ловушку GDF с терапевтическим средством, направленным на нежелательный уровень гематологического параметра. Например, если у пациента повышенное артериальное давление, то может быть разработана схема лечения, включающая введение полипептида-ловушки GDF и средства, понижающего артериальное давление. Для пациента, имеющего запасы железа ниже желаемых, может быть разработана схема лечения полипептидом-ловушкой GDF и препаратом железа.

В одном из вариантов осуществления может быть установлен исходный параметр(-ы) для одного или нескольких гематологических параметров для пациента, который является кандидатом на лечение полипептидом-ловушкой GDF, и установлена подходящая схема дозирования для этого пациента на основании исходного значения(-ий). Альтернативно, установленные исходные параметры на основании истории болезни пациента (анамнеза) можно было бы использовать для подходящей схемы дозирования полипептида-ловушки GDF для пациента. Например, если здоровый пациент имеет установленное исходное значение артериального давления, которое выше определенного диапазона нормы, может и нет необходимости приводить артериальное давление пациента в пределы интервала, который считается нормальным для общей популяции, перед лечением полипептидом-ловушкой GDF. Исходные величины одного или нескольких гематологических параметров пациента перед лечением полипептидом-ловушкой GDF также можно использовать в качестве соответствующих сравнительных значений

для мониторинга любых изменений в гематологических параметрах перед лечением полипептидом-ловушкой GDF.

В определенных вариантах осуществления один или несколько гематологических параметров измеряют у пациентов, которых будут лечить полипептидом-ловушкой GDF. Гематологические параметры можно использовать для мониторинга пациента во время лечения и для обеспечения корректировки или прекращения дозирования полипептида-ловушки GDF или дополнительного дозирования другого терапевтического средства. Например, если введение полипептида-ловушки GDF приводит к повышению артериального давления, уровня эритроцитов или уровня гемоглобина, или к уменьшению запасов железа, то дозирование полипептида-ловушки GDF может быть уменьшено по количеству или частоте, для того чтобы уменьшить воздействие полипептида-ловушки GDF на один или несколько гематологических параметров. Если введение полипептида-ловушки GDF приводит к изменению одного или нескольких гематологических параметров, что является неблагоприятным для пациента, то дозирование полипептида-ловушки GDF может быть прекращено или временно, то тех пор пока гематологический параметр(-ы) не вернется к приемлемому уровню, или постоянно. Аналогично, если один или несколько гематологических параметров не возвращаются в приемлемый интервал после уменьшения дозы или частоты введения полипептида-ловушки GDF, то дозирование может быть прекращено. В качестве альтернативы или в дополнение к уменьшению или прекращению дозирования полипептида-ловушки GDF, пациент может получать дозы дополнительного терапевтического средства, которое направлено на нежелательный уровень гематологического параметра(-ов), такое как, например, средство, понижающее артериальное давление или препарат железа. Например, если у пациента, которого лечат полипептидом-ловушкой GDF, повышенное артериальное давление, то дозирование полипептида-ловушки GDF может продолжаться на том же уровне, и к схеме лечения добавляют средство, понижающее артериальное давление, дозирование полипептида-ловушки GDF может быть уменьшено (например, по количеству и/или частоте), и к схеме лечения добавляют средство, понижающее артериальное давление,

или дозирование полипептида-ловушки GDF может быть прекращено, и пациента могут лечить средством, понижающим артериальное давление.

6. Фармацевтические композиции

В определенных вариантах осуществления соединения (например, полипептиды-ловушки GDF) по настоящему изобретению включают в состав композиции с фармацевтически приемлемым носителем. Например, полипептид-ловушку GDF 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 определенных 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 полипептида-ловушки GDF, которые также необязательно могут быть введены в композицию, описанную выше, могут быть введены одновременно или последовательно с рассматриваемыми соединениями (например, полипептидами-ловушками GDF) в способах по изобретению.

Обычно соединения вводятся парентерально. Фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, могут содержать один или несколько полипептидов-ловушек GDF в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями либо 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 инъектирована 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-ловушки GDF) 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-ловушек GDF. 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 свойств 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 охарактеризованными, такими как синтезированный 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 определенных вариантах осуществления способы по изобретению могут предусматривать пероральное введение, например, в форме капсул, саше, пилюль, таблеток, леденцов (используя вкусо-ароматическую основу, обычно сахарозу и аравийскую камедь 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 аравийская камедь) 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 болюса, 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 аравийская камедь; (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 пилуль 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, метатгидроксид 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 включение изотонических агентов, таких как сахара, хлорид натрия и подобные, в композиции. Кроме того, длительная абсорбция инъектируемой 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-ловушек GDF). 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.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к генной терапии для продукции полипептидов-ловушек GDF *in vivo*. Терапевтический эффект такого лечения может достигаться путем введения полинуклеотидных последовательностей ловушки GDF в клетки или ткани, имеющие перечисленные выше нарушения. Доставка полинуклеотидных последовательностей полипептидов-ловушек GDF может достигаться с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, такого как химерный вирус или коллоидная дисперсионная система. Предпочтительным для терапевтической доставки полинуклеотидных последовательностей полипептидов-ловушек GDF 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 может заключать в себе множественные гены. Все эти векторы могут переносить или заключать в себе ген для селектируемого 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 ловушки GDF.

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

Другая система направленной доставки полинуклеотидов ловушки GDF 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, Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988. Состав липосом обычно представляет собой сочетание фосфолипидов, обычно в комбинации со стероидами, особенно холестерином. Также могут быть использованы другие фосфолипиды или другие липиды. 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, фосфатидилэтаноламин, сфинголипиды, цереброзиды и ганглиозиды. Иллюстративные фосфолипиды включают яичный фосфатидилхолин, дипальмитоилфосфатидилхолин 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 изобретения.

Пример 1. Создание ловушки GDF

Авторы заявки сконструировали ловушку GDF, как изложено ниже. Полипептид с модифицированным внеклеточным доменом ActRIIB со значительно сниженным связыванием активина А по сравнению с GDF11 и/или миостатином (вследствие замены лейцина на аспарат в положении 79 SEQ ID NO: 1) был слит с человеческим или мышинным Fc-доменом с минимальным линкером (три аминокислоты глицин) между ними. Конструкции обозначают как ActRIIB(L79D 20-134)-hFc и ActRIIB(L79D 20-134)-mFc, соответственно. Альтернативные формы с глутаминатом вместо

аспартата в положении 79 создавали аналогично (L79E). Альтернативные формы с аланином вместо валина в положении 226 SEQ ID NO: 7, ниже, также были созданы и произведены эквивалентно во всех протестированных отношениях. Аспартат в положении 79 (относительно SEQ ID NO: 1, или положении 60 относительно SEQ ID NO: 7) выделен серым ниже. Валин в положении 226 относительно SEQ ID NO: 7 также выделен серым ниже.

Ловушка GDF ActRIIB(L79D 20-134)-hFc показана ниже, очищенная из клеточных линий CHO (SEQ ID NO: 7).

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
GCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPT
APTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PVPPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

ActRIIB-производная часть ловушки GDF имеет аминокислотную последовательность, представленную ниже (SEQ ID NO: 32), и эта часть может быть использована в виде мономера или в виде не слитого с Fc белка в виде мономера, димера или комплекса более высокого порядка.

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIE
LVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 32)

Белок-ловушку GDF экспрессировали в клеточных линиях CHO. Рассматривались три различные лидерные последовательности:

(i) меллитина медоносной пчелы (HBML):
MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 8)

(ii) тканевого активатора плазминогена (TPA):
MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 9)

(iii) нативная: MTAPWVALALLWGSLCAGS (SEQ ID NO: 10).

Выбранная форма использовала лидерную последовательность TPA и имела следующую непротессированную аминокислотную последовательность:

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCE
GEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE
GNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11)

Этот полипептид кодируется следующей последовательностью нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 12):

```

А TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA GTCTTCGTTT
CGCCCGGCGC CTCTGGGCGT GGGGAGGCTG AGACACGGGA GTGCATCTAC TACAACGCCA
ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACCAGAGCG GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA
AGCGGCTGCA CTGCTACGCC TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA
AGGGTGCTG GGACGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG
AGAACCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG CGCTTCACTC
ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC ACCCCCGACA CCCCCACCG
GTGGTGGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG
TCTTCCTCTT CCCCCAAAA CCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG
ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT
ACCGTGTTGG CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG TCCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA
AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA
AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG
AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT
CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TATAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA
GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

```

Очистка может быть достигнута при помощи серий хроматографических стадий на колонках, включающих, например, три или более из следующих в любом порядке: хроматография на основе белка А, хроматография на основе сефарозы Q, хроматография с фенилсефарозой, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистка может завершаться вирусной фильтрацией и заменой буфера. В примере схемы очистки, среду для культивирования клеток пропускают через колонку с белком А, промывают 150 мМ Tris/NaCl (pH 8,0), затем промывают 50 мМ Tris/NaCl (pH 8,0) и элюируют 0,1 М глицином, pH 3,0. Элюат с низким pH хранят при комнатной температуре в течение 30 минут в качестве стадии вирусной очистки. Элюат затем нейтрализуют и пропускают через ионообменную колонку с сефарозой Q и промывают 50 мМ Tris pH 8,0, 50 мМ NaCl, и элюируют в 50 мМ Tris pH 8,0, с концентрацией NaCl в пределах

между 150 мМ и 300 мМ. Элюат затем помещают в 50 мМ Tris pH 8,0, 1,1 М сульфат аммония и пропускают через колонку с фенилсефарозой, промывают, и элюируют в 50 мМ Tris pH 8,0 с концентрацией сульфата аммония в пределах между 150 и 300 мМ. Элюат подвергают диализу и фильтруют для использования.

Дополнительные ловушки GDF (слитые белки ActRIIB-Fc, модифицированные таким образом, чтобы уменьшить соотношение связывания активина А относительно миостатина или GDF11) описаны в PCT/US2008/001506 и WO 2006/012627, включенных в виде ссылок в настоящий документ.

Пример 2. Биотест для оценки передачи сигнала, опосредованного GDF-11 и активин

Для оценки воздействия белков ActRIIB-Fc и ловушек GDF на передачу сигнала посредством GDF-11 и активин А использовали анализ репортерного гена А-204. Клеточная линия: Рабдомиосаркома человека (получена из мышечной ткани). Репортерный вектор: pGL3(CAGA)12 (Описан у Dennler et al, 1998, EMBO 17: 3091-3100). Мотив CAGA12 присутствует у генов, отвечающих на TGF- β (PAI-1 ген), таким образом, этот вектор широко используется для факторов, передающих сигнал через Smad2 и 3.

День 1: Рассадить клетки А-204 в 48-луночный планшет.

День 2: Клетки А-204 трансфицировали 10 мкг pGL3(CAGA)12 или pGL3(CAGA) 12(10 мкг)+ pRLCMV (1 мкг) и Eugene.

День 3: Добавить факторы (разведенные в среде+ 0,1% BSA). Ингибиторы необходимо предварительно инкубировать с факторами в течение 1 часа перед добавлением к клеткам. Через шесть часов клетки промывали PBS и лизировали клетки.

Затем проводили люциферазный анализ. В отсутствие каких-либо ингибиторов, активин А показывал 10-кратную стимуляцию экспрессии репортерного гена и ED50 ~2 нг/мл. GDF-11: 16-кратную стимуляцию, ED50: ~1,5 нг/мл.

ActRIIB(20-134) является мощным ингибитором действия активина, GDF-8 и GDF-11 в этом анализе. Варианты также тестировали в этом анализе.

Пример 3. Ингибирование GDF-11 посредством N-концевых и C-концевых усечений

Получали варианты ActRIIB(20-134)-hFc с усечениями на N-конце и/или C-конце и тестировали их активность в качестве ингибиторов GDF-11 и активина. Активности показаны ниже (измерены в кондиционированных средах):

C-концевые усечения ActRIIB-hFc:

	IC50 (нг/мл)	
	GDF-11	Активин
ActRIIB(20-134)-hFc	45	22
ActRIIB(20-132)-hFc	87	32
ActRIIB(20-131)-hFc	120	44
ActRIIB(20-128)-hFc	130	158

Как можно видеть, усечения трех (заканчиваются на ...PPT), шести (заканчиваются на ...YEP) или более аминокислот с C-конца вызывает снижение активности молекулы в три раза или больше. Усечение последних пятнадцати аминокислот части ActRIIB вызывает значительную потерю активности (см. WO2006/012627).

Аминоконцевые усечения были произведены на основе белка ActRIIB(20-131)-hFc. Активности показаны ниже (измерены в кондиционированных средах):

N-концевые усечения ActRIIB-hFc:

	IC50 (нг/мл)	
	GDF-11	Активин
ActRIIB(20-131)-hFc (GRG...)	183	201
ActRIIB(21-131)-hFc (RGE...)	121	325
ActRIIB(22-131)-hFc (GEA...)	71	100
ActRIIB(23-131)-hFc (EAE...)	60	43

ActRIIB(24-131)-hFc (AET...)	69	105
---------------------------------	----	-----

Таким образом, усечения двух, трех или четырех аминокислот с N-конца приводят к выработке более активного белка, чем версии с полноразмерным внеклеточным доменом. Дополнительные эксперименты показывают, что усечение пяти аминокислот, ActRIIB(25-131)-hFc имеет активность, эквивалентную неусеченной форме, и дополнительные делеции на N-конце продолжают ухудшать активность белка. Таким образом, оптимальные конструкции будут иметь С-конец, заканчивающийся между аминокислотами 133-134 SEQ ID NO: 1, и N-конец, который начинается с аминокислот 22-24 SEQ ID NO: 1. N-конец, соответствующий аминокислотам 21 или 25 будет давать активность, аналогичную активности конструкции ActRIIB(20-134)-hFc. Эти усечения также можно использовать в отношении ловушек GDF, таких как вариант L79D или L79E.

Пример 4. Варианты ActRIIB-Fc, клеточная активность

Активность белков ActRIIB-Fc и ловушек GDF тестировали в анализе на клетках, как описано выше. Результаты обобщены в таблице ниже. Некоторые варианты тестировали на различных конструкциях, усеченных с С-конца. Как указано выше, усечения пяти или пятнадцати аминокислот приводит к уменьшению активности. Ловушки GDF (варианты L79D и L79E) показали существенное уменьшение связывания активина с одновременным сохранением ингибирования GDF11 дикого типа почти на уровне дикого типа.

Связывание растворимого ActRIIB-Fc с GDF 11 и активинном А:

Вариации ActRIIB-Fc	Часть ActRIIB-Fc (соответствует аминокислотам SEQ ID NO: 1)	Активность ингибирования GDF11	Активность ингибирования активина
R64	20-134	+++ (примерно 10^{-8} М K _T)	+++ (примерно 10^{-8} М K _T)
A64	20-134	+ (примерно 10^{-6} М K _T)	+ (примерно 10^{-6} М K _T)
R64	20-129	+++	+++

R64 K74A	20-134	++++	++++
R64 A24N	20-134	+++	+++
R64 A24N	20-119	++	++
R64 A24N K74A	20-119	+	+
R64 L79P	20-134	+	+
R64 L79P K74A	20-134	+	+
R64 L79D	20-134	+++	+
R64 L79E	20-134	+++	+
R64K	20-134	+++	+++
R64K	20-129	+++	+++
R64 P129S P130A	20-134	+++	+++
R64N	20-134	+	+

+ Слабая активность (примерно $1 \times 10^{-6} \text{M K}_I$)

++ Умеренная активность (примерно $1 \times 10^{-7} \text{M K}_I$)

+++ Хорошая активность (дикого типа) (примерно $1 \times 10^{-8} \text{M K}_I$)

++++ Выше, чем активность дикого типа

Для некоторых вариантов оценивали время полувыведения из сыворотки крыс. ActRIIB(20-134)-Fc имел время полувыведения из сыворотки приблизительно 70 часов. ActRIIB(A24N 20-134)-Fc имел время полувыведения из сыворотки приблизительно 100-150 часов. Вариант A24N вариант в анализе на клетках (выше) и в анализах *in vivo* (ниже) имел активность, эквивалентную молекуле дикого типа. В сочетании с более долгим полувыведением, это означает, что с течением времени вариант A24N будет давать больший эффект на единицу белка, чем молекула дикого типа. Вариант A24N, и любые другие варианты, исследованные выше, можно комбинировать с молекулами ловушек GDF, такими как варианты L79D или L79E.

Пример 5. Связывание GDF-11 и активина A

Связывание конкретных белков ActRIIB-Fc и ловушек GDF с лигандами тестировали в анализе BiaCore™.

Варианты ActRIIB-Fc или белок дикого типа белок захватывались системой с использованием антитела к hFc. Инжектировали лиганды, и они протекали через захваченные

рецепторные белки. Результаты обобщены в таблицах ниже.

Специфичность связывания лиганда для вариантов IIB

	GDF11		
Белок	K_{on} (1/мс)	K_{off} (1/с)	KD (М)
ActRIIB(20-134)-hFc	1,34e-6	1,13e-4	8,42e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	1,21e-6	6,35e-5	5,19e-11
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	6,7e-5	4,39e-4	6,55e-10
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3,8e-5	2,74e-4	7,16e-10
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6,77e-5	2,41e-5	3,56e-11
	GDF8		
Белок	K_{on} (1/мс)	K_{off} (1/с)	KD (М)
ActRIIB(20-134)-hFc	3,69e-5	3,45e-5	9,35e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc			
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	3,85e-5	8,3e-4	2,15e-9
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc	3,74e-5	9e-4	2,41e-9
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	2,25e-5	4,71e-5	2,1e-10
ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	9,74e-4	2,09e-4	2,15e-9
ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	1,08e-5	1,8e-4	1,67e-9
ActRIIB(K74A 20-134)-hFc	2,8e-5	2,03e-5	7,18e-11
	Активин А		
Белок	K_{on} (1/мс)	K_{off} (1/с)	KD (М)
ActRIIB(20-134)-hFc	5,94e6	1,59e-4	2,68e-11
ActRIIB(A24N 20-134)-hFc	3,34e6	3,46e-4	1,04e-10
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc			Слабая связь
ActRIIB(L79E 20-134)-hFc			Слабая связь
ActRIIB(R64K 20-134)-hFc	6,82e6	3,25e-4	4,76e-11
ActRIIB(R64K 20-129)-hFc	7,46e6	6,28e-4	8,41e-11
ActRIIB(P129S, P130R 20-134)-hFc	5,02e6	4,17e-4	8,31e-11

Эти данные подтверждают данные анализа на клетках, демонстрируя, что вариант A24N сохраняет активность связывания лиганда, которая аналогична активности связывания молекулы ActRIIB(20-134)-hFc, и что молекулы L79D или L79E сохраняют связывание миостатина GDF11, но демонстрируют заметное снижение (не поддающееся количественному измерению) связывания с активинем А.

Были созданы и протестированы другие варианты, описанные в WO2006/012627 (включена в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме) см. например, стр. 59-60, с использованием лигандов, присоединенных к устройству и протекания рецептора через присоединенные лиганды. Примечательно, что K74Y, K74F, K74I (и предположительно другие гидрофобные замены в положении K74, такие как K74L), и D80I, вызывают снижение соотношения связывания активина А к связыванию GDF11, по сравнению с молекулой дикого типа K74. Таблица с данными, относящимися к этим вариантам, представлена ниже:

Связывание растворимых вариантов ActRIIB-Fc с GDF11 и активинем А (анализ BiaCore)

ActRIIB	ActA	GDF11
WT (64A)	KD=1,8e-7M (+)	KD=2,6e-7M (+)
WT (64R)	na	KD=8,6e-8M (+++)
+15 хвост	KD ~2,6e-8M (+++)	KD=1.9e-8M (++++)
E37A	*	*
R40A	-	-
D54A	-	*
K55A	++	*
R56A	*	*
K74A	KD=4,35e-9M +++++	KD=5,3e-9M +++++
K74Y	*	--
K74F	*	--
K74I	*	--

W78A	*	*
L79A	+	*
D80K	*	*
D80R	*	*
D80A	*	*
D80F	*	*
D80G	*	*
D80M	*	*
D80N	*	*
D80I	*	--
F82A	++	-

* Не наблюдали связывания

- <1/5 от связывания дикого типа

- ~1/2 от связывания дикого типа

+ дикий тип

++ <2× увеличение связывания

+++ ~5× увеличение связывания

++++ ~10× увеличение связывания

+++++ ~ 40× увеличение связывания

Пример 6. ActRIIB-hFc стимулирует эритропоэз у приматов, не являющихся человеком

ActRIIB(20-134)-hFc (IgG1) вводили раз в неделю в течение 1 месяца самцам и самкам яванских макак путем подкожной инъекции. Сорок восемь яванских макак (24/на пол) распределяли в одну из четырех групп лечения (6 животных/на пол/на группу) и вводили подкожные инъекции или растворителя, или ActRIIB-hFc в концентрации 3, 10 или 30 мг/кг раз в неделю в течение четырех недель (всего 5 доз). Оценивали параметры, включая общую клиническую патологию (гематология, клиническая химия, свертывание и анализ мочи). ActRIIB-hFc вызвал статистически значимое увеличение средних абсолютных значений ретикулоцитов к 15 дню у обработанных животных. Ко дню 36, ActRIIB-hFc вызвал серьезные гематологические изменения, включая увеличение средних абсолютных значений ретикулоцитов и величин распределения эритроцитов по объему и снижение средней корпускулярной концентрации гемоглобина. Были затронуты оба пола и все обработанные группы. Эти эффекты соответствуют

положительному воздействию ActRIIB-hFc на высвобождение незрелых ретикулоцитов из костного мозга. Этот эффект был обратим после вымывания лекарственного средства у обработанных животных (ко дню исследования 56). Таким образом, делается вывод, что ActRIIB-hFc стимулирует эритропоэз.

Пример 7. ActRIIB-mFc способствует аспектам эритропоэза у мышей путем стимуляции эритропоэтической активности селезенки

В этом исследовании анализировали эффекты введения ActRIIB(20-134)-mFc *in vivo* на частоту гематopoэтических предшественников в костном мозге и селезенке. Одну группу мышей C57BL/6 инъецировали PBS в качестве контроля, а второй группе мышей вводили две дозы ActRIIB-mFc в концентрации 10 мг/кг, и умерщвляли обе группы через 8 суток. Для проведения полного анализа крови использовали периферическую кровь, а бедренные кости и селезенки использовали для проведения клоногенных анализов *in vitro* для оценки содержания лимфоидных, эритроидных и миелоидных клеток-предшественников в каждом органе. За краткий период этого исследования не наблюдали никаких значительных изменений в уровнях эритроцитов, гемоглобина или лейкоцитов у обработанных мышей. В бедренной кости не было различий между числом ядросодержащих клеток или содержанием предшественников между контрольной и обработанной группами. В селезенках, группа, обработанная соединением, показала статистически значимое увеличение числа колоний зрелых эритроидных предшественников (CFU-E) на чашку, частоты и общего числа предшественников на селезенку. Кроме того, было показано увеличение числа миелоидных (CFU-GM), незрелых эритроидных (BFU-E) предшественников и общего числа предшественников на селезенку.

Животные:

В исследовании использовали шестнадцать самок мышей C57BL/6 в возрасте 6-8 недель. Восемь мышей инъецировали подкожно тестируемым соединением ActRIIB-mFc в дни 1 и 3 в дозе 10 мг/кг, и восемь мышей инъецировали подкожно контрольным растворителем, фосфатно-солевым буфером (PBS), в объеме 100 на мышь. Всех мышей умерщвляли через 8 суток после первой инъекции

согласно соответствующему Руководству по обращению с животными. Собирали образцы периферической крови (РВ) от индивидуальных животных путем сердечной пункции и использовали для полного анализа крови и лейкоцитарной формулы (CBC/Diff). От каждой мыши собирали бедренные кости и селезенки.

Проведенные анализы:

Анализы CBC/Diff

Собирали РВ от каждой мыши путем сердечной пункции и помещали в соответствующие пробирки Microtainer. Образцы отправляли в CLV для анализа на счетчике CellDyn 3500.

Клоногенные анализы

Клоногенных предшественников миелоидной, эритроидной и лимфоидной линий дифференцировки оценивали *in vitro* с использованием систем сред на основе метилцеллюлозы, описанных ниже.

Зрелые эритроидные предшественники:

Клоногенные предшественники зрелых эритроидных (CFU-E) линий культивировали в MethoCult™ 3334, среде на основе метилцеллюлозы, содержащей рекомбинантный человеческий (rh) эритропоэтин (3 Ед/мл).

Лимфоидные предшественники:

Клоногенные предшественники лимфоидной (CFU-pre-B) линии культивировали в MethoCult® 3630, среде на основе метилцеллюлозы, содержащей rh Интерлейкин 7 (10 нг/мл).

Миелоидные и незрелые эритроидные предшественники:

Клоногенные предшественники гранулоцитарно-моноцитарной (CFU-GM), эритроидной (BFU-E) и мультипотентной (CFU-GEMM) линий культивировали в MethoCult™ 3434, среде на основе метилцеллюлозы, содержащей рекомбинантный мышинный (rm) Фактор стволовых клеток (50 нг/мл), rh Интерлейкин 6 (10 нг/мл), rm Интерлейкин 3 (10 нг/мл) и rh Эритропоэтин (3 Ед/мл).

Способы:

Бедренные кости и селезенки мышей обрабатывали по стандартным протоколам. В кратком изложении, костный мозг получали промывкой полости бедренной кости средой Дульбекко, модифицированной по способу Исков, содержащей 2% эмбриональную

телячью сыворотку (IMDM 2% FBS), с использованием иглы калибра 21 и шприца 1 см³. Клетки селезенки получали путем дробления селезенки через 70 мкм фильтр и промывания фильтра IMDM 2% FBS. Подсчет ядродержащих клеток в 3% ледяной уксусной кислоте затем выполняли на суспензиях одиночных клеток с использованием счетной камеры Нейбауэра таким образом, что можно было посчитать общее число клеток на орган. Для удаления загрязняющих эритроцитов все клетки селезенки затем разводили трехкратным объемом лизирующего буфера с хлоридом аммония и инкубировали на льду 10 минут. Клетки затем отмывали и ресуспендировали в IMDM 2% FBS, и проводили второй подсчет клеток для определения концентрации клеток после лизиса.

Были приготовлены стоки клеток, и к каждому добавлен состав среды на основе метилцеллюлозы для получения оптимальных концентраций для засева для каждой ткани в каждом составе среды. Клетки костного мозга высевали в концентрации 1×10^5 клеток на чашку в MethoCultTM 3334 для оценки зрелых эритроидных предшественников, 2×10^5 клеток на чашку в MethoCultTM 3630 для оценки лимфоидных предшественников и 3×10^4 клеток на чашку в MethoCultTM 3434 для оценки незрелых эритроидных и миелоидных предшественников. Клетки селезенки высевали в концентрации 4×10^5 клеток на чашку в MethoCultTM 3334 для оценки зрелых эритроидных предшественников, 4×10^5 клеток на чашку в MethoCultTM 3630 для оценки лимфоидных предшественников и 2×10^5 клеток на чашку в MethoCultTM 3434 для оценки незрелых эритроидных и миелоидных предшественников. Культуры высевали на чашки в трех дублях и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ до учета и оценки колоний, которые проводил обученный персонал. Зрелые эритроидные предшественники культивировали в течение 2 суток, лимфоидные предшественники культивировали в течение 7 суток, и незрелые эритроидные и миелоидные предшественники культивировали в течение 12 суток.

Анализ:

Среднее $\pm$ 1 стандартное отклонение рассчитывали для трех повторов культур из клоногенных анализов и для контроля и групп

лечения для всех наборов данных.

Частоту колониеобразующих клеток (CFC) в каждой ткани рассчитывали следующим образом:

Клетки, засеянные на чашку

Средняя CFC, подсчитанная на чашке

Общую CFC на бедренную кость или селезенку рассчитывали следующим образом:

Общая подсчитанная CFC × количество ядросодержащих клеток на бедренную кость или селезенку (после лизиса эритроцитов)

Количество культивированных ядросодержащих клеток

Стандартные t-тесты проводили для оценки того, есть ли различия в среднем количестве клеток или гематopoэтических предшественников между мышами с контрольным PBS и мышами, обработанными соединением. В связи с потенциальной субъективностью учета колоний, значимой считали величину p, меньшую, чем 0,01. Средние значения ($\pm$ SD) для каждой группы показаны в таблицах ниже.

Таблица: Гематологические параметры

Группа лечения	Белые клетки крови ($\times 10^9$ /л)	Красные клетки крови ($\times 10^9$ /л)	Гемоглобин (г/л)	Гематокрит (л/л)
PBS (n=8)	9,53 $\pm$ 1,44	10,5 $\pm$ 1,1	160,9 $\pm$ 13,3	0,552 $\pm$ 0,057
ActRIIB-mFc (n=8)	9,77 $\pm$ 1,19	10,8 $\pm$ 0,3	162,1 $\pm$ 4,1	0,567 $\pm$ 0,019

Таблица: CFC из бедренной кости и селезенки

Группа лечения	Общая CFC на бедренную кость	Общая CFC на селезенку	Общая CFU-E на бедренную кость	Общая CFU-E на селезенку
PBS (n=8)	88 $\pm$ 10	54 $\pm$ 14	156 $\pm$ 27	131 $\pm$ 71
ActRIIB-mFc (n=8)	85 $\pm$ 9	79 $\pm$ 6*	164 $\pm$ 23	436 $\pm$ 86*

* предварительный анализ показывает $p < 0,05$

Обработка мышей ActRIIB(20-134)-mFc за краткий период

данного исследования не привела к значительному повышению содержания эритроцитов или гемоглобина. Однако воздействие на содержание клеток-предшественников было заметным. В бедренных костях не было различий в количестве ядродержащих клеток или содержании предшественников между контрольной и обработанной группами. В селезенках, группа, обработанная соединением, показала статистически значимое увеличение количества ядродержащих клеток до лизиса эритроцитов и числа колоний зрелых эритроидных предшественников (CFU-E) на чашку, частоты и общего числа предшественников на селезенку. Кроме того, наблюдали увеличение количества миелоидных (CFU-GM), незрелых эритроидных (BFU-E) предшественников и общего количества предшественников на селезенку. Таким образом, ожидается, что после более долгого периода времени, обработка ActRIIB(20-134)-mFc может привести к повышенному содержанию эритроцитов и гемоглобина.

Пример 8: Ловушка GDF повышает уровни эритроцитов *in vivo*

Самцов мыши C57BL/6NTac в возрасте двенадцати недель распределяли в одну из двух групп лечения (N=10). Мышей дозировали или растворителем или вариантным полипептидом ActRIIB ("Ловушка GDF") [ActRIIB(L79D 20-134)-hFc] путем подкожной инъекции (п/к) в концентрации 10 мг/кг дважды в неделю в течение четырех недель. В конце исследования собирали цельную кровь посредством сердечной пункции в пробирки, содержащие EDTA, и анализировали распределение клеток с использованием гематологического анализатора HM2 (Abaxis, Inc).

Обозначения групп

Группа	N	Мыши	Инъекция	Доза (мг/кг)	Путь введения	Частота
1	10	C57BL/6	PBS	0	п/к	Дважды в неделю
2	10	C57BL/6	Ловушка gdf [ActRIIB(L79D 20-134)-hFc]	10	п/к	Дважды в неделю

Лечение ловушкой GDF не оказало статистически достоверного

эффекта на количество лейкоцитов (WBC) по сравнению с контролями с растворителем. Количество эритроцитов (RBC) было повышено в группе лечения по сравнению с контролями (см. таблицу ниже). Как содержание гемоглобина (HGB), так и гематокрит (HCT) были также повышены из-за дополнительных эритроцитов. Средняя ширина эритроцитов (RDWc) была выше у обработанных животных, указывая на увеличение пула незрелых эритроцитов. Таким образом, лечение ловушкой GDF приводит к повышению эритроцитов, без каких-либо различимых эффектов на популяции лейкоцитов.

Гематологические результаты

	RBC ($10^{12}/л$)	HGB (г/дл)	HCT (%)	RDWc (%)
PBS	10,7 $\pm$ 0,1	14,8 $\pm$ 0,6	44,8 $\pm$ 0,4	17,0 $\pm$ 0,1
Ловушка GDF	12,4 $\pm$ 0,4**	17,0 $\pm$ 0,7*	48,8 $\pm$ 1,8*	18,4 $\pm$ 0,2**

*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$

Пример 9: Ловушка GDF превосходит ActRIIB-Fc по увеличению уровней эритроцитов *in vivo*

Самцов мыши C57BL/6NTac в возрасте девятнадцати недель случайным образом распределяли в одну из тех групп. Мышей дозировали растворителем (10 mM физиологический раствор, забуференный трисом, TBS), ActRIIB(20-134)-mFc дикого типа, или ловушкой GDF ActRIIB(L79D 20-134)-hFc путем подкожной инъекции дважды в неделю в течение трех недель. Кровь собирали из щеки в начале и через три недели дозирования и распределение клеток с использованием гематологического анализатора (HM2, Abaxis, Inc.).

Лечение ActRIIB-Fc или ловушкой GDF не имело достоверного действия на число лейкоцитов (WBC) по сравнению с контролями с растворителем. Количество эритроцитов (RBC), гематокрит (HCT) и уровни гемоглобина были повышены у мышей, обработанных ловушкой GDF, по сравнению или с контролями, или с конструкцией дикого типа (см. таблицу ниже). Таким образом, при прямом сравнении,

ловушка GDF способствует повышению эритроцитов в значительно большей степени, чем белок ActRIIB-Fc дикого типа. Фактически, в этом эксперименте, белок ActRIIB-Fc дикого типа не вызвал статистически значимого повышения эритроцитов, и предполагается, что для выявления этого эффекта необходимо более длительное дозирование или более высокие дозы.

Гематологические результаты после трех недель дозирования

	RBC ($10^{12}/\text{мл}$)	HCT (%)	HGB (г/дл)
TBS	$11,06 \pm 0,46$	$46,78 \pm 1,9$	$15,7 \pm 0,7$
ActRIIB-mFc	$11,64 \pm 0,09$	$49,03 \pm 0,3$	$16,5 \pm 1,5$
Ловушка GDF	$13,19 \pm 0,2^{**}$	$53,04 \pm 0,8^{**}$	$18,4 \pm 0,3^{**}$

$^{**}=p<0,01$

Пример 10. Создание ловушки GDF с усеченным внеклеточным доменом ActRIIB

Как описано в примере 1, ловушку GDF, обозначаемую как ActRIIB(L79D 20-134)-hFc получали посредством N-концевого слияния лидерной последовательности TPA с внеклеточным доменом ActRIIB (остатки 20-134 в SEQ ID NO: 1), содержащим замену лейцина на аспарат (в остатке 79 в SEQ ID NO: 1) и C-концевого слияния человеческого Fc-домена с минимальным линкером (три остатка глицина) (фиг.3). Нуклеотидная последовательность, соответствующая этому слитому белку, показана на фиг.4.

Ловушку GDF с усеченным внеклеточным доменом ActRIIB, обозначаемую как ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, посредством N-концевого слияния лидерной последовательности TPA с усеченным внеклеточным доменом (остатки 25-131 в SEQ ID NO: 1), содержащим замену лейцина на аспарат (в остатке 79 в SEQ ID NO: 1) и C-концевого слияния человеческого Fc-домена с минимальным линкером (три остатка глицина) (фиг.5). Нуклеотидная последовательность, соответствующая этому слитому белку, показана на фиг.6.

Пример 11. Селективное связывание лиганда ловушкой GDF с двойным усечением внеклеточного домена ActRIIB

Аффинность ловушек GDF и других белков ActRIIB-hFc к нескольким лигандам оценивали *in vitro* при помощи прибора Biacore™. Результаты обобщены в таблице ниже. Значения Kd получали путем подгонки равновесной аффинности из-за очень быстрой ассоциации и диссоциации комплекса, что мешает точному определению k_{on} и k_{off} .

Селективность к лигандам для вариантов ActRIIB-hFc:

Слитая конструкция	Активин А (Kd e-11)	Активин В (Kd e-11)	GDF 11 (Kd e-11)
ActRIIB(L79 20-134)-hFc	1,6	1,2	3,6
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	1350,0	78,8	12,3
ActRIIB(L79 25-131)-hFc	1,8	1,2	3,1
ActRIIB(L79D 25-131)-hFc	2290,0	62,1	7,4

Ловушка GDF с усеченным внеклеточным доменом, ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, имела равную или более высокую селективность к лиганду, показанную для более длинного варианта, ActRIIB(L79D 20-134)-hFc, с ярко выраженной потерей связывания активина А и активина В и практически полным сохранением связывания GDF11 по сравнению с партнерами ActRIIB-hFc без замены L79D. Обратите внимание, что усечение само по себе (без замены L79D) не изменяет селективности к лигандам, показанным здесь [сравните ActRIIB(L79 25-131)-hFc с ActRIIB(L79 20-134)-hFc].

Пример 12. Создание ActRIIB(L79D 25-131)-hFc с альтернативными нуклеотидными последовательностями

Для создания ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, внеклеточный домен ActRIIB человек с заменой аспартата в нативном положении положение 79 (SEQ ID NO: 1) и с N-концевыми и C-концевыми усечениями (остатки 25-131 в SEQ ID NO: 1) сливали с N-конца с лидерной последовательностью ТРА вместо нативной лидерной последовательности ActRIIB и с C-конца с человеческим Fc-доменом с минимальным линкером (три остатка глицина) (фиг.5). Одна нуклеотидная последовательность, кодирующая этот слитый

белок, показана на фиг.6 (SEQ ID NO: 27), и альтернативная нуклеотидная последовательность, кодирующая точно такой же слитый белок, показана на фиг.9 (SEQ ID NO: 30). Этот белок экспрессировали и очищали с использованием способов, описанных в примере 1.

Пример 13. Ловушка GDF с усеченным внеклеточным доменом ActRIIB повышает пролиферацию эритроидных предшественников у мышей

ActRIIB(L79D 25-131)-hFc оценивали для того, чтобы определить его воздействие на пролиферацию эритроидных предшественников. Самцов мышей C57BL/6 (в возрасте 8 недель) обрабатывали ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 мг/кг, п/к; n=6) или растворителем (TBS; n=6) в Дни 1 и 4, затем усыпляли в День 8 для сбора селезенки, большеберцовых костей, бедренных костей и крови. Выделяли клетки селезенки и костного мозга, разводили средой Дульбекко, модифицированной по способу Исков, содержащей 5% эмбриональную телячью сыворотку, суспендировали в специальной среде на основе метилцеллюлозы, и культивировали или 2 или 12 дней для оценки уровней клоногенных предшественников на стадии колониеобразующей единицы эритроидного ряда (CFU-E) и на стадии бурстообразующей единицы эритроидного ряда (BFU-E), соответственно.

Среда на основе метилцеллюлозы для определения BFU-E (MethoCult M3434, Stem Cell Technologies) включала мышинный рекомбинантный фактор стволовых клеток, интерлейкин-3 и интерлейкин-6, которые отсутствовали в среде с метилцеллюлозой для определения CFU-E (MethoCult M3334, Stem Cell Technologies), в то время как обе среды содержали среди прочих компонентов эритропоэтин. Для BFU-E и CFU-E, определяли количество колоний в чашках для культивирования в двух повторениях от каждого образца ткани, и статистический анализ результатов был основан на количестве мышей на группу обработки.

Культуры, полученные из селезенки мышей, обработанных ActRIIB(L79D 25-131)-hFc имели вдвое больше колоний CFU-E, чем соответствующие культуры от контрольных мышей ($P<0,05$), в то

время как число колоний BFU-E не отличалось значительно при обработке *in vivo*. Количество колоний CFU-E или BFU-E из культур костного мозга также не отличалось значительно при обработке. Как и ожидалось, повышенное число колоний CFU-E в культурах, полученных из селезенки, сопровождалось весьма значительными ($P < 0,001$) изменениями уровней эритроцитов (повышение на 11,6%), концентрации гемоглобина (повышение на 12%) и уровня гематокрита (повышение на 11,6%) при эвтаназии у мышей, обработанных ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, по сравнению с контрольными. Эти результаты указывают на то, что введение ловушки GDF с усеченным внеклеточным доменом ActRIIB *in vivo* может стимулировать пролиферацию эритроидных предшественников как часть своего общего воздействия для повышения уровней эритроцитов.

Пример 14. Ловушка GDF с усеченным внеклеточным доменом ActRIIB компенсирует анемию, индуцированную химиотерапией, у мышей

Авторы заявки исследовали действие ActRIIB(L79D 25-131)-hFc на параметры эритропоэза на мышинной модели анемии, индуцированной химиотерапией на основе паклитаксела, который ингибирует деление клеток, блокируя полимеризацию микротрубочек. Самцов мышей C57BL/6 (в возрасте 8 недель) распределяли в одну из четырех групп лечения:

- 1) паклитаксел (25 мг/кг, и./п.)
- 2) ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 мг/кг, и/п)
- 3) паклитаксел + ActRIIB(L79D 25-131)-hFc
- 4) растворитель (TBS).

Паклитаксел вводили в День 0, в то время как ActRIIB(L79D 25-131)-hFc или растворитель вводили в Дни 0 и 3. Собирали образцы крови для анализа CBC от отдельных групп в Дни 1, 3 и 5, и результаты для групп лечения 1-3 (выше) выражали как процент отличия от растворителя в данный момент времени. Стираемость зубов из-за токсичности паклитаксела было проблемой в группе, получавшей только паклитаксел, в День 3 (где $n=1$); в иных случаях, $n=3-5$ на группу лечения на момент времени. По сравнению с растворителем паклитаксел по отдельности снижал

концентрацию гемоглобина почти на 13% ко Дню 5, в то время как добавление ActRIIB(L79D 25-131)-hFc предотвращало это индуцированное паклитакселом снижение (фиг.11). Аналогичные эффекты наблюдали для уровней гематокрита и RBC. В отсутствие паклитаксела, ActRIIB(L79D 25-131)-hFc повысил концентрацию гемоглобина на 10% по сравнению с растворителем в Дни 3 и 5 (фиг.11). Таким образом, ловушка GDF с усеченным внеклеточным доменом ActRIIB может повышать уровни эритроцитов в достаточной степени, чтобы компенсировать анемию, индуцированную химиотерапией.

Пример 15. Ловушка GDF с усеченным внеклеточным доменом ActRIIB способствует регрессии анемии, индуцированной нефрэктомией, у мышей

Авторы заявки исследовали действие ActRIIB(L79D 25-131)-hFc на анемию у мышинной модели с нефрэктомией при хроническом заболевании почек. Самцы мышей C57BL/6 (в возрасте 11 недель) подвергались или ложной операции, или односторонней нефрэктомии для снижения способности вырабатывать эритропоэтин. Мышей оставляли на неделю для послеоперационного восстановления, а затем лечили дважды в неделю ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 мг/кг, и/п; n=15 на каждое состояние) или растворителем (TBS; n=15 на каждое состояние) всего в течение 4 недель. Образцы крови собирали перед началом дозирования и через 4 недели лечения. В то время как мыши с нефрэктомией, которых лечили растворителем, показали значительное снижение числа эритроцитов после 4-недельного периода лечения, лечение ActRIIB(L79D 25-131)-hFc не только предотвратило снижение, но *повысило* уровни эритроцитов на 17% ($P<0,001$) от исходных (фиг.12), несмотря на сниженную способность почек вырабатывать эритропоэтин. У мышей с нефрэктомией, ActRIIB(L79D 25-131)-hFc также вызвал значительное повышение исходных уровней гемоглобина и гематокрита, и в частности, стимулировал каждый из этих эритропоэтических параметров приблизительно в той же степени в условиях нефрэктомии, что и в условиях ложной операции (фиг.13). Таким образом, ловушка GDF с усеченным внеклеточным доменом ActRIIB может повышать уровни эритроцитов в достаточной

степени, чтобы обращать течение анемии на модели с хроническим заболеванием почек.

Пример 16. Ловушка GDF с усеченным внеклеточным доменом ActRIIB улучшает восстановление от анемии, вызванной потерей крови, у крыс

Авторы заявки исследовали действие ActRIIB(L79D 25-131)-hFc на параметры эритропоэза на крысиной модели анемии, вызванной острой кровопотерей (острая постгеморрагическая анемия). Самцам крыс линии Спраг-Дуули (весом приблизительно 300 г) у производителя регулярно вводили катетер в яремную вену (Harlan). В День -1 забирали 20% общего объема крови у каждой крысы в течение 5-минутного периода через катетер с анестезией изофлураном. Объем крови забирали на основании общего объема крови, рассчитанного согласно следующему соотношению, полученному Lee и коллегами (J Nucl Med 25:72-76, 1985) для крыс с массой тела, большей, чем 120 г:

$$\text{Общий объем крови (мл)} = 0,062 \times \text{масса тела (г)} + 0,0012$$

Возмещали объем равным объемом физиологического раствора, забуференного фосфатом, через катетер во время забора крови. Крыс лечили ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 мг/кг, п/к; n=5) или растворителем (TBS; n=5) в Дни 0 и 3. Образцы крови для анализа CBC забирали через катетер в Дни -1 (исходный), 0, 2, 4 и 6.

Контрольные крысы отвечали на потерю 20% крови падением уровня эритроцитов почти на 15% на День 0. Эти уровни оставались значительно ниже, чем исходные в Дни 2 и 4, и полностью не восстановились на День 6 (фиг.14). Хотя крысы, которых лечили ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, показали практически идентичное падение уровней эритроцитов после потери 20% крови, эти крысы затем продемонстрировали полное восстановление этих уровней на День 2, с последующим возрастанием на Дни 4 и 6, что представляет собой весьма значительное улучшение по сравнению с контрольными уровнями в соответствующие моменты времени (фиг.14). Аналогичные результаты получали для концентрации гемоглобина. Эти открытия демонстрируют, что ловушка GDF с усеченным внеклеточным доменом ActRIIB может создавать более

быстрое восстановление уровней эритроцитов при анемии, вызванной острым кровотечением.

Пример 17. Ловушка GDF с усеченным внеклеточным доменом ActRIIB повышает уровни эритроцитов у приматов, не являющихся человеком

Две ловушки GDF, ActRIIB(L79D 20-134)-hFc и ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, оценивали на их способность стимулировать выработку эритроцитов у яванской макаки. Обезьян обрабатывали подкожно ловушкой GDF (10 мг/кг; n=4 самца/4 самки), или растворителем (n=2 самца/2 самки) в Дни 1 и 8. Образцы крови собирали в День 1 (исходный перед обработкой), 3, 8, 15, 29 и 44, и анализировали уровни эритроцитов (фиг.15), гематокрит (фиг.16), уровни гемоглобина (фиг.17), и уровни ретикулоцитов (фиг.18). Обезьяны, получавшие растворитель, демонстрировали сниженные уровни эритроцитов, гематокрита и гемоглобина во все моменты времени после обработки, ожидаемый эффект неоднократных заборов крови. Напротив, обработка ActRIIB(L79D 20-134)-hFc или ActRIIB(L79D 25-131)-hFc повысила эти параметры к первому моменту времени после обработки (День 3) и поддерживала их на существенно повышенных уровнях в течение исследования (фигуры 15-17). Важно, что уровни ретикулоцитов у обезьян, обработанных ActRIIB(L79D 20-134)-hFc или ActRIIB(L79D 25-131)-hFc были существенно повышены в Дни 8, 15 и 29 по сравнению с растворителем (фиг.18). Этот результат демонстрирует, что лечение ловушкой GDF повышает выработку предшественников эритроцитов, приводя к повышенным уровням эритроцитов.

В совокупности, эти данные демонстрируют, что усеченные ловушки GDF, а также полноразмерные варианты, можно использовать в качестве селективных антагонистов GDF11 и потенциально родственных лигандов для повышения образования эритроцитов *in vivo*.

Пример 18. Ловушка GDF, полученная из ActRIIB5

Другие сообщают об альтернативной растворимой форме ActRIIB (которая обозначается ActRIIB5), в которой экзон 4, включающий трансмембранный домен ActRIIB, замещен другой C-концевой последовательностью (WO2007/053775).

Последовательность нативного ActRIIB5 человека без лидерной последовательности представлена ниже:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWLD⁷⁹DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCLEGPAHE

(SEQ ID NO: 36)

Замену лейцина на аспартат или другую замену кислым остатком можно проводить в нативном положении 79 (подчеркнуто и выделено цветом), как описано для создания варианта ActRIIB5(L79D), который имеет следующую последовательность:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWLD⁷⁹DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCLEGPAHE

(SEQ ID NO: 37)

Этот вариант может быть присоединен к человеческому Fc при помощи линкера TGGG для создания слитого белка человека ActRIIB5(L79D)-hFc со следующей последовательностью:

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWLD⁷⁹DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGSGALWLCLEGPAHETGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNV⁷⁹FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 38)

Эта конструкция может экспрессироваться в клетках CHO.

Пример 19. Эффекты у мышей с комбинированным лечением EPO и ловушкой GDF с усеченным внеклеточным доменом ActRIIB

EPO индуцирует образование эритроцитов за счет увеличения пролиферации эритроидных предшественников, в то время как ловушки GDF могли бы потенциально влиять на образование эритроцитов, таким образом, чтобы дополнять или усиливать эффекты EPO. Таким образом, авторы заявки исследовали воздействие комбинированного лечения EPO и ActRIIB(L79D 25-131)-hFc на параметры эритропоэза. Самцы мышей C57BL/6 (в возрасте 9 недель) получали одну и/п инъекцию рекомбинантного

человеческого ЕРО отдельно (эпоэтин альфа, 1800 единиц/кг), ActRIIB(L79D 25-131)-hFc отдельно (10 мг/кг), ЕРО и ActRIIB(L79D 25-131)-hFc вместе, или растворитель (физиологический раствор, забуференный трисом). Мышей подвергали эвтаназии через 72 часа после дозирования и собирали кровь, селезенки и бедренные кости.

Селезенки и бедренные кости обрабатывали для получения эритроидных клеток-предшественников для проточного цитометрического анализа. После удаления селезенку измельчали в среде Дульбекко, модифицированной по способу Исков, содержащей 5% эмбриональную телячью сыворотку, и механически разделяли проталкиванием через 70-мкм клеточный фильтр с поршнем от стерильного шприца на 1 мл. Бедренные кости очищали от всех остатков мышечной или соединительной ткани и отрезали концы, чтобы обеспечить сбор мозга путем промывки оставшегося тела кости средой Дульбекко, модифицированной по способу Исков, содержащей 5% эмбриональную телячью сыворотку, при помощи иглы калибра 21, соединенной со шприцем на 3 мл. Клеточные суспензии центрифугировали (2000 об/мин в течение 10 мин), и клеточные осадки ресуспендировали в PBS, содержащем 5% эмбриональную телячью сыворотку. Клетки (10^6) из каждой ткани инкубировали с антимышиным IgG, чтобы заблокировать неспецифическое связывание, затем инкубировали с флуоресцентно мечеными антителами против мышечных маркеров клеточной поверхности CD71 (рецептор трансферрина) и Ter119 (антиген, ассоциированный с гликофорином А клеточной поверхности), отмывали и анализировали путем проточной цитометрии. Мертвые клетки в образцах были исключены из анализа путем контрастного окрашивания йодидом пропидия. Эритроидную дифференцировку в селезенке или костном мозге оценивали по степени мечения CD71, который уменьшается с течением дифференцировки, и мечения Ter119, который повышается в процессе конечной эритроидной дифференцировки, начиная со стадии проэритробластов (Socolovsky et al, 2001, Blood 98:3261-3273; Ying et al, 2006, Blood 108: 123-133). Таким образом, использовали проточную цитометрию для определения числа проэритробластов ($CD71^{high}Ter119^{low}$), базофильных эритробластов

(CD71^{high}Ter119^{high}), полихроматофильных + ортохроматофильных эритробластов (CD71^{med}Ter119^{high}), и поздних ортохроматофильных эритробластов и ретикулоцитов (CD71^{low}Ter119^{high}), как описано.

Комбинированное лечение EPO и ActRIIB(L79D 25-131)-hFc привело к удивительно энергичному росту эритроцитов. В 72-часовом временном периоде этого эксперимента, ни EPO, ни ActRIIB(L79D 25-131)-hFc по отдельности не повысили гематокрит значительно по сравнению с растворителем, в то время как комбинированное лечение двумя средствами привело к почти 25% повышению гематокрита, что было неожиданно синергетически, т.е., больше, чем сумма их эффектов по отдельности (фиг.19). Синергия этого типа, как правило, рассматривается в качестве доказательства, что отдельные средства действуют через разные клеточные механизмы. Аналогичные результаты также наблюдали для концентраций гемоглобина (фиг.20) и концентраций эритроцитов (фиг.21), каждая из которых также повышалась синергетически за счет комбинированного лечения.

Анализ уровней эритроидных предшественников выявил более сложный паттерн. У мыши селезенка считается первичным органом, который отвечает за индуцибельный ("стрессовый") эритропоэз. Проточный цитометрический анализ ткани селезенки через 72 часа выявил, что EPO заметно изменил профиль эритропоэтических предшественников по сравнению с растворителем, повысив количество базофильных эритробластов более чем на 170% за счет поздних предшественников (поздних ортохроматофильных эритробластов и ретикулоцитов), которые снизились более чем на треть (фиг.22). Важно отметить, что комбинированное лечение значительно повысило базофильные эритробласты по сравнению с растворителем, но в меньшей степени, чем EPO по отдельности, одновременно поддерживая неослабевающее созревание предшественников поздней стадии (фиг.22). Таким образом, комбинированное лечение EPO и ActRIIB(L79D 25-131)-hFc увеличило эритропоэз на основе сбалансированного повышения пролиферации предшественников и созревания. В отличие от селезенки, профиль клеток-предшественников в костном мозге после комбинированного лечения существенно не отличался от

профиля после ЕРО по отдельности. Авторы заявки предсказывают, исходя из профиля предшественников в селезенке, что комбинированное лечение могло бы привести к повышенным уровням ретикулоцитов и могло бы сопровождаться устойчивым повышением уровней зрелых эритроцитов, если бы эксперимент продолжался дольше 72 часов.

В совокупности эти результаты показывают, что ловушку GDF с усеченным внеклеточным доменом ActRIIB можно вводить в комбинации с ЕРО для синергетического повышения образования эритроцитов *in vivo*. Действуя через дополнительный, но неопределенный механизм, ловушка GDF может смягчать сильное пролиферативное действие активатора рецептора ЕРО в чистом виде и одновременно позволяет достигать целевых уровней эритроцитов с более низкими дозами активатора рецептора ЕРО, что позволяет избежать потенциальных неблагоприятных воздействий или других проблем, связанных с высокими уровнями активации рецептора ЕРО.

Пример 20. Ловушка GDF с усеченным внеклеточным доменом ActRIIB повышает уровни эритроцитов у мышинной модели миелодиспластического синдрома

Миелодиспластические синдромы (MDS) представляют собой разнородные заболевания, связанные с недостаточностью костного мозга, которые клинически характеризуются периферической цитопенией, рефрактерной анемией и риском прогрессирования в острый миелолейкоз. Переливание эритроцитов является ключевой поддерживающей терапией при MDS для облегчения усталости, улучшения качества жизни и продления выживаемости; однако, постоянные переливания, как правило, приводят к перегрузке железом у этих пациентов с неблагоприятными воздействиями на заболеваемость и смертность, что может приводить к использованию лекарственных средств, таких как терапия хелаторами железа (Dreyfus, 2008, Blood Rev 22 Suppl 2:S29-34; Jabbour et al, 2009, Oncologist 14:489-496). Хотя рекомбинантный эритропоэтин (ЕРО) и его производные являются альтернативным терапевтическим подходом для небольшого процента пациентов с MDS (Estey, 2003, Curr Opin Hematol 10:60-67), последние исследования позволяют предположить, что этот класс средств

ассоциирован с повышенным риском заболеваемости и смертности при некоторых дозах из-за тромбоэмболических событий и роста опухоли (Krapf et al., 2009, Clin J Am Soc Nephrol 4:470-480; Glaspy, 2009, Annu Rev Med 60: 181-192). Таким образом, существует потребность в альтернативной терапии MDS, которая повышала бы уровни эритроцитов без перегрузки железом, которая сопровождается постоянные переливания или рисков, присущих экзогенному EPO и его производным.

Таким образом, авторы заявки исследовали влияние ActRIIB(L79D 25-131)-hFc на уровни RBC у трансгенной мышшиной модели, которая повторяет основные признаки MDS, в том числе трансформацию в острый лейкоз (Lin et al., 2005, Blood 106:287-295; Beachy et al, 2010, Hematol Oncol Clin North Am 24:361-375). Начиная с трехмесячного возраста, самцов и самок мышей NUP98-HOXD13 лечили дважды в неделю ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (10 мг/кг, п/к) или растворителем (TBS). Помет дикого типа дозировали ActRIIB(L79D 25-131)-hFc или растворителем и использовали в качестве контроля. Образцы крови собирали перед началом дозирования и с интервалом раз в месяц после этого для проведения измерений CBC.

Некоторые различия были отмечены в начале исследования между мышами NUP98-HOXD13 и контролями дикого типа. Конкретно, самцы мышей NUP98-HOXD13 показали значительно сниженные концентрации RBC (-8,8%, $p < 0,05$) и гематокрита (-8,4%, $p < 0,05$) по сравнению с мышами дикого типа, и самки мышей NUP98-HOXD13 показали аналогичные тенденции. Результаты через три месяца дозирования (среднее $\pm$ SD) показаны в следующей таблице.

Мыши NUP98-HOXD13		Концентрация RBC (10^{12} клеток/л)	Концентрация гемоглобина (г/дл)	Гематокрит (%)
Самцы	Растворитель (n=6)	6,56 $\pm$ 0,51	10,68 $\pm$ 0,68	31,83 $\pm$ 2,13
	ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (n=8)	8,65 $\pm$ 0,54***	13,54 $\pm$ 0,91***	39,20 $\pm$ 2,82***

	Растворитель (n=5)	6,38±1,61	10,30±2,58	31,96±8,73
Самки	ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (n=6)	8,52±0,70*	13,52±0,56*	42,23±2,53†

***p<0,001 по сравнению с самцами + растворитель

*p<0,05 по сравнению с самками + растворитель

†p=0,056 по сравнению с самками + растворитель

По сравнению с растворителем, лечение ActRIIB(L79D 25-131)-hFc в течение трех месяцев значительно повысило концентрации RBC и гемоглобина (приблизительно на 30%) как у самцов, так и у самок мышей NUP98-HOXD13. Гематокрит также значительно повысился у этих самцов мышей и повысился с тенденцией к значимости у самок мышей. Таким образом, ловушка GDF с усеченным внеклеточным доменом ActRIIB может значительно повышать уровни эритроцитов у мышинной модели MDS. В то время как переливания по своей природе являются источником экзогенного железа, ловушка GDF повышает уровни RBC, способствуя использованию запасов эндогенного железа путем эритропоэза, тем самым избегая перегрузки железом и его негативных последствий. Кроме того, как отмечено в Примере 19, ловушка GDF действует через другой (хотя и дополняющий) клеточный механизм, чем тот, который используют активаторы рецептора EPO для стимуляции эритропоэза, и тем самым обходит потенциальные неблагоприятные воздействия, связанные с активацией рецептора EPO.

Пример 21. Воздействие ловушки GDF с усеченным внеклеточным доменом ActRIIB на уровни и морфологию RBC на мышинной модели β -талассемии

При талассемических синдромах, которые представляют собой наиболее распространенные причины неэффективного эритропоэза, нарушение баланса в экспрессии цепей α - и β -глобина приводит к анемии из-за повышенного апоптоза во время созревания эритробластов. Переливание эритроцитов в настоящее время является ключевой поддерживающей терапией при талассемии, но со временем вызывает потенциально смертельное накопление железа в определенных тканях (Tanno et al, 2010, Adv Hematol 2010:358283). Например, сердечное заболевание, связанное с

перегрузкой железом, может служить причиной 50% смертности у пациентов с большой талассемией (Borgna-Pignatti et al, 2005, Ann NY Acad Sci 1054:40-47). Важно отметить, что уровни эндогенного ЕРО, как правило, повышены и вносят вклад в этиологию заболевания при талассемических синдромах, а также других нарушениях с неэффективным эритропоэзом; таким образом, терапевтическое применение рекомбинантного ЕРО может быть неуместным. Таким образом, существует потребность в альтернативной терапии для талассемии и других нарушений с неэффективным эритропоэзом, которая повышала бы уровни эритроцитов без перегрузки железом, которая сопровождается постоянными переливаниями.

Авторы заявки исследовали воздействие ActRIIB(L79D 25-131)-mFc на образование RBC у мышинной модели промежуточной β -талассемии, у которой целиком удалена кодирующая область основного гена, кодирующего β -глобин. Мыши, гомозиготные по такому аллелю Hbb^{th-1} демонстрируют гипохромную микроцитарную анемию с тельцами включения у высокой доли циркулирующих RBC (Skow et al, 1983, Cell 1043: 1043-1052). В предварительном эксперименте, $Hbb^{-/-}$ β -талассемических мышей (C57BL/6J- Hbb^{d3th}/J) в возрасте 2-5 месяцев случайным образом распределяли для получения ActRIIB(L79D 25-131)-mFc (10 мг/кг) или растворителя (физиологический раствор, забуференный трисом) путем подкожной инъекции дважды в неделю. Помет дикого типа, который дозировали растворителем, служил в качестве дополнительного контроля. Образцы крови (100 мкл) собирали из щеки перед началом дозирования и через одинаковые интервалы после дозирования для анализа CBC. Характеристика гематологических параметров в начале исследования подтвердила, что эти $Hbb^{-/-}$ β -талассемические мыши имели тяжелую анемию (фиг.23), и лечение $Hbb^{-/-}$ мышей ActRIIB(L79D 25-131)-mFc в течение 4 недель заметно повысило количество эритроцитов по сравнению с $Hbb^{-/-}$ мышами, которых лечили растворителем, тем самым наполовину уменьшая анемию, наблюдаемую у этой модели (фиг.24). Также наблюдали повышения гематокрита и концентрации гемоглобина, ассоциированные с лечением. Важно заметить, что лечение $Hbb^{-/-}$

мышей ActRIIB(L79D 25-131)-mFc также привело к улучшению морфологии RBC и к уменьшению гемолиза и эритроцитарного детрита по сравнению с *Hbb^{-/-}* мышами, которых лечили растворителем (фиг.25), таким образом, указывая на коренное улучшение эритропоэза. Таким образом, полипептид-ловушка GDF с усеченным внеклеточным доменом ActRIIB может обеспечить терапевтическую пользу для анемии у мышинной модели β -талассемии за счет как повышения количества RBC, так и за счет морфологии. Способствуя созреванию эритробластов с одновременным уменьшением анемии, полипептиды-ловушки GDF могут лечить неэффективный эритропоэз. В отличие от переливаний, которые по своей природе являются источником экзогенного железа, полипептид-ловушка GDF может повышать уровни RBC, способствуя использованию запасов эндогенного железа путем эритропоэза, тем самым избегая перегрузки железом и его негативных последствий.

Пример 22. Действие ловушки GDF с усеченным внеклеточным доменом ActRIIB на уровни EPO, спленомегалию, плотность кости и перегрузку железом на мышинной модели β -талассемии

Гипоксия, связанная с неэффективным эритропоэзом, приводит к повышенным уровням EPO, которые могут управлять массивным размножением эритробластов внутри и снаружи костного мозга, приводя к спленомегалии (увеличению селезенки), патологии костей, индуцированной эритробластами, и тканевой перегрузке железом, даже в отсутствие терапевтических переливаний эритроцитов. Нелеченная перегрузка железом к накоплению железа в тканях, полиорганной дисфункции и преждевременной смерти (Borgna-Pignatti et al, 2005, Ann NY Acad Sci 1054:40-47; Borgna-Pignatti et al., 2011, Expert Rev Hematol 4:353-366), наиболее часто из-за кардиомиопатии при тяжелых формах талассемии (Lekawanvijit et al., 2009, Can J Cardiol 25:213-218). За счет повышения эффективности эритропоэза полипептид-ловушка GDF может не только облегчить первопричинную анемию и повышенные уровни EPO, но также и сопутствующие осложнения в виде спленомегалии, патологии костей и перегрузки железом.

Авторы заявки исследовали действие полипептида-ловушка GDF на эти параметры на той же самой мышинной модели промежуточной

β -талассемии, исследованной в Примере 21. *Hbb*^{-/-} β -талассемических мышей (C57BL/6J-*Hbb*^{d3th}/J) в возрасте трех месяцев случайным образом распределяли для получения ActRIIB(L79D 25-131)-mFc (1 мг/кг, n=7) или растворителя (физиологический раствор, забуференный трисом, n=7) путем подкожной инъекции дважды в неделю в течение 2 месяцев. Помет дикого типа (n=13), который дозировали растворителем, служил в качестве дополнительного контроля. Образцы крови (100 мкл) собирали в конце исследования для анализа CBC. В конце исследования, определяли минеральную плотность кости при помощи двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (DEXA), уровни сывороточного EPO определяли путем иммуноферментного анализа (ELISA), активные формы кислорода (ROS) количественно определяли при помощи 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата и проточной цитометрии (Suragani et al, 2012, Blood 119:5276-5284), и уровни мРНК гепсидина определяли при помощи количественной полимеразной цепной реакции.

Этот полипептид-ловушка GDF оказал множество гематологических воздействий, указывающих на облегчение неэффективного эритропоэза. Лечение *Hbb*^{-/-} мышей ActRIIB(L79D 25-131)-mFc в течение 2 месяцев повысило количество RBC на 25% по сравнению с *Hbb*^{-/-} мышами, которых лечили растворителем (фиг.26). У *Hbb*^{-/-} мышей лечение ActRIIB(L79D 25-131)-mFc также значительно повысило концентрацию гемоглобина и гематокрит через 2 месяца по сравнению с контролями с растворителем. Эти изменения сопровождалось снижением уровня циркулирующих ретикулоцитов (31,3±2,3% по сравнению с 44,8±5,0% для *Hbb*^{-/-} мышей, которых лечили ActRIIB(L79D 25-131)-mFc или растворителем, соответственно), что соответствует уменьшению анемии. Как и в Примере 21, лечение *Hbb*^{-/-} мышей ActRIIB(L79D 25-131)-mFc привело к улучшению морфологии RBC и уменьшению эритроцитарного детрита по сравнению с *Hbb*^{-/-} мышами, которых дозировали растворителем. По сравнению со здоровыми индивидуумами, пациенты с талассемией демонстрируют повышенную скорость разрушения эритроцитов и повышенные уровни билирубина в сыворотке, который является продуктом катаболизма гема и

маркером гемолиза (Orten, 1971, Ann Clin Lab Sci 1:113-124). У *Hbb^{-/-}* мышей, лечение ActRIIB(L79D 25-131)-mFc снизило уровни билирубина в сыворотке через 2 месяца почти наполовину по сравнению с растворителем (фиг.27), тем самым обеспечивая доказательства того, что ActRIIB(L79D 25-131)-mFc неожиданно может улучшать структурную/функциональную целостность зрелых эритроцитов, поскольку он способствует формированию эритроцитов. Важно отметить, что, лечение *Hbb^{-/-}* мышей ActRIIB(L79D 25-131)-mFc снизило уровни сывороточного ЕРО через 2 месяца более чем на 60% по сравнению с растворителем у той же модели (фиг.28). Поскольку повышенные уровни ЕРО являются отличительным признаком неэффективного эритропоэза при β -талассемии, снижение этих уровней является убедительным доказательством, что ActRIIB(L79D 25-131)-mFc уменьшает неэффективный эритропоэз сам по себе, а не только анемию, которую он вызывает, у этой мышинной модели талассемии.

Этот полипептид-ловушка GDF также производит положительные изменения в конечных точках, представляющих основные осложнения неэффективного эритропоэза. У пациентов с талассемией, как спленомегалия, так и повреждения костей вызваны эритроидной гиперплазией и экстрамедуллярным эритропоэзом, стимулированными ЕРО. У *Hbb^{-/-}* мышей, лечение ActRIIB(L79D 25-131)-mFc в течение 2 месяцев значительно уменьшило массу селезенки по сравнению с растворителем (фиг.29) и полностью восстановило минеральную плотности кости до значений у дикого типа (фиг.30). Гомеостаз железа также значительно улучшился при лечении этим полипептидом-ловушкой GDF. Сывороточное железо состоит из несвязанного (свободного) железа и железа, связанного с апотрансферином (образуя трансферин), специализированный белок для транспорта элементарного железа в циркуляции. Сывороточное железо представляет собой относительно небольшой и лабильный компонент общего железа в организме, тогда как сывороточные уровни ферритина, другой формы хранения железа, выявляемая, в основном, внутриклеточно, представляет собой больший и менее лабильный компонент. Третьим параметром нагрузки железом является насыщение трансферина, степень, с которой занята

железо-связывающая способность трансферина. У *Hbb*^{-/-} мышей, лечение ActRIIB(L79D 25-131)-mFc в течение 2 месяцев значительно уменьшило каждый из этих индикаторов перегрузки железом по сравнению с растворителем (фиг.31). В дополнение к его влиянию на эти разнообразные параметры гомеостаза железа ActRIIB(L79D 25-131)-mFc нормализует тканевую перегрузку железом у *Hbb*^{-/-} мышей, как было выявлено путем гистохимического анализа селезенки, печени и почки (фиг.32). Кроме того, этот полипептид-ловушка GDF оказал положительное воздействие на экспрессию гепсидина, белка печени, который считается основным регулятором гомеостаза железа (Gantz, 2011, Blood 117:4425-4433), и чьи уровни изменяются обратно пропорционально захвату пищевого железа. Лечение ActRIIB(L79D 25-131)-mFc восстановило аномально низкую экспрессию гепсидина в печени у *Hbb*^{-/-} мышей (фиг.33). Наконец, проводили другое исследование с аналогичным дизайном для определения воздействия этой ловушки GDF на активные формы кислорода (ROS), которые, как полагают, опосредуют многие токсические эффекты перегрузки железом (Rund et al, 2005, N Engl J Med 353: 1135-1146). У трехмесячных *Hbb*^{-/-} мышей лечение ActRIIB(L79D 25-131)-mFc в дозе 1 мг/кг дважды в неделю в течение 2 месяцев практически нормализовало уровни ROS (фиг.34), и можно было бы предсказать, таким образом, что оно значительно уменьшит повреждения тканей, опосредованное ROS, при талассемии и других заболеваниях, характеризующихся неэффективным эритропоэзом.

В совокупности, вышеизложенные результаты демонстрируют, что полипептиды-ловушки GDF могут лечить неэффективный эритропоэз, включая анемию и повышенные уровни EPO, а также осложнения, такие как спленомегалия, патология костей, индуцированная эритроблестами, и перегрузка железом, и сопутствующие им патологии. При спленомегалии такие патологии включают боль в груди или в животе и ретикулоэндотелиальную гиперплазию. Экстрamedулярный гемопоэз может происходить не только в селезенке, но потенциально в других тканях в форме экстрamedулярных гематопоезических псевдоопухолей (Musallam et al, 2012, Cold Spring Harb Perspect Med 2:a013482). При

патологии костей, индуцированной эритробландами, сопутствующие патологии включают низкую минеральную плотность кости, остеопороз и боль в костях (Haidar et al., 2011, Bone 48:425-432). При перегрузке железом сопутствующие патологии включают супрессию гепсидина и повышенное всасывание пищевого железа (Musallam et al, 2012, Blood Rev 26(Suppl 1):S16-S19), множественные эндокринопатии и фиброз/цирроз печени (Galanello et al., 2010, Orphanet J Rare Dis 5:11), и кардиомиопатию, вызванную перегрузкой железом (Lekawanvijit et al., 2009, Can J Cardiol 25:213-218). В отличие от существующей терапии для неэффективного эритропоэза, полипептиды-ловушки GDF, такие как ActRIIB(L79D 25-131)-mFc, способны уменьшать перегрузку железом у мышинных моделей, с одновременным повышением уровней эритроцитов. Эта новая способность отличает полипептиды-ловушки GDF от переливаний крови, которые по своей сути нагружают организм экзогенным железом в процессе лечения анемии и делают это без облегчения состояния, лежащего в основе неэффективного эритропоэза.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

Все публикации и патенты, упомянутые в настоящем документе, включены, таким образом, посредством ссылки в полном объеме, как если бы было особо оговорено и отдельно указано, что каждая отдельная публикация или патент включены посредством 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 ее эквивалентов, и описанием, наряду с вариантами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для применения в лечении миелофиброза у пациента, содержащая полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности аминокислот 29-109 SEQ ID NO: 1, при этом полипептид содержит кислую аминокислоту в положении, соответствующем положению 79 SEQ ID NO: 1.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности аминокислот 29-109 SEQ ID NO: 1.

3. Фармацевтическая композиция по п.1, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 98% идентична последовательности аминокислот 29-109 SEQ ID NO: 1.

4. Фармацевтическая композиция по п.1, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая идентична последовательности аминокислот 29-109 SEQ ID NO: 1, но при этом полипептид содержит кислую аминокислоту в положении, соответствующем положению 79 SEQ ID NO: 1.

5. Фармацевтическая композиция по п.1, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности аминокислот 25-131 SEQ ID NO: 1.

6. Фармацевтическая композиция по п.1, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности аминокислот 25-131 SEQ ID NO: 1.

7. Фармацевтическая композиция по п.1, где полипептид содержит последовательность аминокислот 25-131 SEQ ID NO: 1, но при этом полипептид содержит кислую аминокислоту в положении, соответствующем положению 79 SEQ ID NO: 1.

8. Фармацевтическая композиция по п.1, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28.

9. Фармацевтическая композиция по п.1, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28.

10. Фармацевтическая композиция по п.1, где полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

11. Фармацевтическая композиция по п.1, где полипептид состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28.

12. Фармацевтическая композиция по любому из п.п.1-11, где полипептид связывается с GDF11.

13. Фармацевтическая композиция по любому из п.п.1-12, где полипептид связывается с GDF8.

14. Фармацевтическая композиция по любому из п.п.1-13, где полипептид связывается с GDF11 и GDF8.

15. Фармацевтическая композиция по любому из п.п.1-9, где кислая аминокислота представляет собой аспарагиновую кислоту (D).

16. Фармацевтическая композиция по любому из п.п.1-9, где кислая аминокислота представляет собой глутаминовую кислоту (E).

17. Фармацевтическая композиция по любому из п.п.1-16, где полипептид находится в составе для подкожного введения.

18. Фармацевтическая композиция по любому из п.п.1-17, где у пациента есть спленомегалия, и где фармацевтическая композиция лечит спленомегалию у пациента.

19. Фармацевтическая композиция по любому из п.п.1-18, где у пациента есть экстрамедуллярный эритропоэз, и где фармацевтическая композиция уменьшает экстрамедуллярный эритропоэз у пациента.

20. Фармацевтическая композиция по любому из п.п.1-19, где у пациента есть анемия, и где фармацевтическая композиция лечит анемию у пациента.

По доверенности

1/36

ActRIIa	ILGRSETQEC	LEFNANWEKD	RTNQTGVEPC	YGD KDKRR HC	FATWKNISGS
ActRIIb	GRGEAETREC	IYYNANWELE	RTNOSGLERC	EGEQDKRLHC	YASWRN <u>SS</u> GT
	IEIVKQGCWL	DDINCYDRTD	CVEKKDSPEV	YFCCCEGNMC	NEKFSYFP
	IELVKKGCWL	DDFN <u>CYDRQE</u>	CVATEENPQV	YFCCCEGNFC	NERFTHLPEA
	EVTQPTSNPV	TPKPPT			
	GGPEVTYEPP	PTAPT			

ФИГ.1

	10	20	30	40	50
Крысиный IIb	MTAPWAA	-LALLWGS	LCAGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLER	-CEGEQDKR	
Свиной IIb	MTAPWAA	-LALLWGS	LCVGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLER	-CEGEQDKR	
Мышиный IIb	MTAPWAA	-LALLWGS	LCAGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLER	-CEGEQDKR	
Человеческий IIb	MTAPWVA	-LALLWGS	LCAGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLER	-CEGEQDKR	
Бычий IIb	MTAPWAA	-LALLWGS	LCAGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLER	-CEGERDKR	
Шпорцевой лягушки IIb	MGASVALTF	LLLLLATFRAGSGHDEVETRECIYYNANWELEKTNQSGVERLVEGKKDKR			
Человеческий IIA	MGA	AAKLAF	AVFLISCSSGAILGRSETQEC	LFNANWEKDRTNQ	TGVEP-CYGDKDKR

Консенсусная последовательность M t A p w a a X l a l l w g s l c a G s g r g e a E T r E C i y y N A N W E l e r T N Q s G l E r L c e G e q D K R

	60	70	80	90	100	110
Крысиный IIb	LHCYASWPNS	SSGTIELVKKG	GCWLDDFN	CYDRQECVATEENPQVYFCC	CEGNFCNERFT	
Свиной IIb	LHCYASWRNS	SSGTIELVKKG	GCWLDDFN	CYDRQECVATEENPQVYFCC	CEGNFCNERFT	
Мышиный IIb	LHCYASWRNS	SSGTIELVKKG	GCWLDDFN	CYDRQECVATEENPQVYFCC	CEGNFCNERFT	
Человеческий IIb	LHCYASWRNS	SSGTIELVKKG	GCWLDDFN	CYDRQECVATEENPQVYFCC	CEGNFCNERFT	
Бычий IIb	LHCYASWRNS	SSGTIELVKKG	GCWLDDFN	CYDRQECVATEENPQVYFCC	CEGNFCNERFT	
Шпорцевой лягушки IIb	LHCYASWRNN	SGFIELVKKG	GCWLDDFN	CYDRQECIAKEENPQVF	FCCCEGNYCNKKFT	
Человеческий IIA	RHC	FATWKNISGS	IEIVKQGCWLDDIN	CYDRTD	CVEKKDSPEVYFCC	CEGNMCMNEKFS

Консенсусная последовательность I H C y A s W r N s S G t I E I V K k G C W L D D f N C Y D R q e C v a t e e n P q V y F C C C E G N f C N e r F t

	120										130										140										150									
Крысиный IIb	H	L	P	E	P	G	G	P	E	V	T	Y	E	P	-	P	P	T	A	P	T	L	L	T	V	L	A	Y	S	L	L	P	I	G	G	L	S	-		
Свиной IIb	H	L	P	E	A	G	G	P	E	V	T	Y	E	P	-	P	P	T	A	P	T	L	L	T	V	L	A	Y	S	L	L	P	I	G	G	L	S	-		
Мышиный IIb	H	L	P	E	P	G	G	P	E	V	T	Y	E	P	-	P	P	T	A	P	T	L	L	T	V	L	A	Y	S	L	L	P	I	G	G	L	S	-		
Человеческий IIb	H	L	P	E	A	G	G	P	E	V	T	Y	E	P	-	P	P	T	A	P	T	L	L	T	V	L	A	Y	S	L	L	P	I	G	G	L	S	-		
Бычий IIb	H	L	P	E	A	G	G	P	E	V	T	Y	E	P	-	P	P	T	A	P	T	L	L	T	V	L	A	Y	S	L	L	P	V	G	G	L	S	-		
Шпорцевой лягушки IIb	H	L	P	E	V	-	-	-	-	E	T	F	D	P	K	P	O	P	S	A	S	V	L	N	I	L	I	Y	S	L	L	P	I	V	G	L	S	M		
Человеческий IIA	Y	F	P	F	M	E	V	T	O	P	T	S	N	P	-	V	T	P	K	P	P	Y	N	I	I	I	Y	S	I	V	P	I	M	I	I	-	-	-		

Консенсусная последовательность h I P E X q q p e v T y e P K p p t a p t l l t v L a Y S L I P i g g l S M

ФИГ.2

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWDDDFNC YDRQECVATE
101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
301 EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351 EALHNHYTQK SLSLSPGK

ФИГ.3

```

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
  TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG
  TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGAGACCCGC ACCCCTCCGA CTCTGTGCCC

101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC
  TCACGTAGAT GATGTTGCGG TTGACCCTCG ACCTCGCGTG GTTGGTCTCG

151 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC
  CCGGACCTCG CGACGCTTCC GCTCGTCCTG TTCGCCGACG TGACGATGCG

201 CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT
  GAGGACCGCG TTGTCGAGAC CGTGGTAGCT CGAGCACTTC TTCCCGACGA

251 GGGATGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG
  CCCTACTACT GAAGTTGACG ATGCTATCCG TCCTCACACA CCGGTGACTC

301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA
  CTCTTGGGGG TCCACATGAA GACGACGACA CTTCCGTTGA AGACGTTGCT

351 GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC
  CGCGAAGTGA GTAAACGGTC TCCGACCCCC GGGCCTTCAG TGCATGCTCG

401 CACCCCCGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
  GTGGGGGCTG TCGGGGGTGG CCACCACCTT GAGTGTGTAC GGGTGGCAGC

451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAAA
  GGTCGTGGAC TTGAGGACCC CCCTGGCAGT CAGAAGGAGA AGGGGGGTTT

501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
  TGGGTTCCCTG TGGGAGTACT AGAGGGCCTG GGGACTCCAG TGTACGCACC

551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
  ACCACCTGCA CTCGGTGCTT CTGGGACTCC AGTTCAAGTT GACCATGCAC

601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
  CTGCCGCACC TCCACGTATT ACGGTTCTGT TTCGGCGCCC TCCTCGTCAT

651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT
  GTTGTCGTGC ATGGCACACC AGTCGCAGGA GTGGCAGGAC GTGGTCCTGA

```

701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
CCGACTTACC GTTCCTCATG TTCACGTTCC AGAGGTTGTT TCGGGAGGGT

751 GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
CGGGGGTAGC TCTTTTGGTA GAGGTTTCGG TTTCCCGTCG GGGCTCTTGG

801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
TGTCCACATG TGGGACGGGG GTAGGGCCCT CCTCTACTGG TTCTTGGTCC

851 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
AGTCGGACTG GACGGACCAG TTTCCGAAGA TAGGGTCGCT GTAGCGGCAC

901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
CTCACCCCTCT CGTTACCCGT CGGCCTCTTG TTGATGTTCT GGTGCGGAGG

951 CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
GCACGACCTG AGGCTGCCGA GGAAGAAGGA GATATCGTTC GAGTGGCACC

1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
TGTTCTCGTC CACCGTCGTC CCCTTGCAGA AGAGTACGAG GCACTACGTA

1051 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCCCCGGG
CTCCGAGACG TGTTGGTGAT GTGCGTCTTC TCGGAGAGGG ACAGGGGCCC

1101 TAAATGA (SEQ ID NO:25)
ATTACT (SEQ ID NO:33)

ФИГ.4(продолжение)

1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGAAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC
51 EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKGCWD DDFNCYDRQE CVATEENPQV
101 YFCCCEGNFC NERFTHLPEA GGPEVTYEPP PTGGGTHTCP PCPAPELLGG
151 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
201 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS
251 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP
301 ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT
351 QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 26)

ΦИГ.5

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA
TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGCGACTCTG TGCCCTCACG TAGATGATGT

 101 N A N W E L E R T N Q S G L E R C
ACGCCAACTG GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC
TGCGGTTGAC CCTCGACCTC GCGTGGTTGG TCTCGCCGGA CCTCGCGACG

 151 E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
GAAGGCGAGC AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGCGCAACAG
CTTCCGCTCG TCCTGTTTCG CGACGTGACG ATGCGGAGGA CCGCGTTGTC

 201 S G T I E L V K K G C W D D D F
CTCTGGCACC ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGGAC GATGACTTCA
GAGACCGTGG TAGCTCGAGC ACTTCTTCCC GACGACCCTG CTACTGAAGT

 251 N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
ACTGCTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG
TGACGATGCT ATCCGTCCTC ACACACCGGT GACTCCTCTT GGGGGTCCAC

 301 Y F C C C E G N F C N E R F T H L
TACTTCTGCT GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATTT
ATGAAGACGA CGACACTTCC GTTGAAGACG TTGCTCGCGA AGTGAGTAAA

 351 P E A G G P E V T Y E P P P T
GCCAGAGGCT GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGGTG
CGGTCTCCGA CCCCCGGGCC TTCAGTGCAT GCTCGGTGGG GGCTGTCCAC

 401 GTGGAAGTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA
 CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT

 451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
 GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

 501 CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
 GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG

 551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
 GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

```

601  AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
    TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

651  CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
    GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

701  GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
    CGTTCCAGAG GTTGTTTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751  AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
    TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

801  CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
    GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGA CTGGACG GACCAGTTTC

851  GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
    CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901  GAGAACA ACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
    CTCTTGTTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951  CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
    GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT

1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
    TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 27)
    GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 34)

```

ФИГ.6(продолжение)

1 ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
51 KGCWDDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
101 TYEPPPTGGG THTCP^{PC}PAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
151 VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
201 WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ
251 VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV
301 DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 28)

ФИГ.7

1 ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
51 KGCWDDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
101 TYEPPPT (SEQ ID NO: 29)

ФИГ.8

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCCGA^{E T}AAC CCGCGA^{R E C}ATGT ATTTA^{I Y Y}TTACA
 TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGGCTTTG GCGCTTACA TAAATAATGT
 101 N A N W E L E R T N Q S G L E R C
 ATGCTAA^NTTG GGA^EACTCGAA^L CCGACGA^RACC AATCCGGG^SCT CGAA^ECGGT^RGT
 TACGATTAAC CCTTGAGCTT GCCTGCTTGG TTAGGCCCGA GCTTGCCACA
 151 E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
 GAGGGGGA^EAC AGGATAA^QACG CCTCCAT^LTCG TATGCG^HTCGT GGAGGA^CACT^SC
 CTCCCCCTTG TCCTATTTGC GGAGGTAACG ATACGCAGCA CCTCCTTGAG
 201 S G T I E L V K K G C W D D D F
 CTC^SCGG^GGAC^TG AT^ITGA^EACT^LGG TCAAGAA^VAGG GTGCTGGG^KAC GACGA^KTTTCA
 GAGGCCCTGC TAACTTGACC AGTTCTTTCC CACGACCCTG CTGCTAAAGT
 251 N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
 ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGT^RCGCGA CCGAA^EGAGAA TCCGCAGG^ETC
 TAACAATACT GGCGGTCCTT ACACAGCGCT GGCTTCTCTT AGGCGTCCAG
 301 Y F C C C E G N F C N E R F T H L
 TATTTCTGTT GTTG^YCGAG^FGG GAATTTCTGT AATGA^NACGGT TTACC^ECACCT
 ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTTAAAGACA TTA^RCTTGCCA AATGGGTGGA
 351 P E A G G P E V T Y E P P P T
 CCCCGA^PAGCC GCGGGGCC^ECG AGGTGAC^VCTA TGA^TACC^ECCCG CCA^PACC^PGGTG
 GGGGCTTCGG CCGCCCGGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGG GGGTGGCCAC
 401 GTGGA^PACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA
 CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCCCT
 451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
 GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG
 501 CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
 GGCCTGGGGA CTCCAGTGTA CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG
 551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC
 GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

```

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
    TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

651 CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
    GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA

701 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
    CGTTCCAGAG GTTGTTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC
    TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTC CACATGTGGG ACGGGGGTAG

801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
    GGCCCTCCTC TACTGGTTCT TGGTCCAGTC GGA CTGGACG GACCAGTTTC

851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
    CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901 GAGAACA ACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
    CTCTTGTTGA TGTTCTGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA

951 CTCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
    GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT

1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
    TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

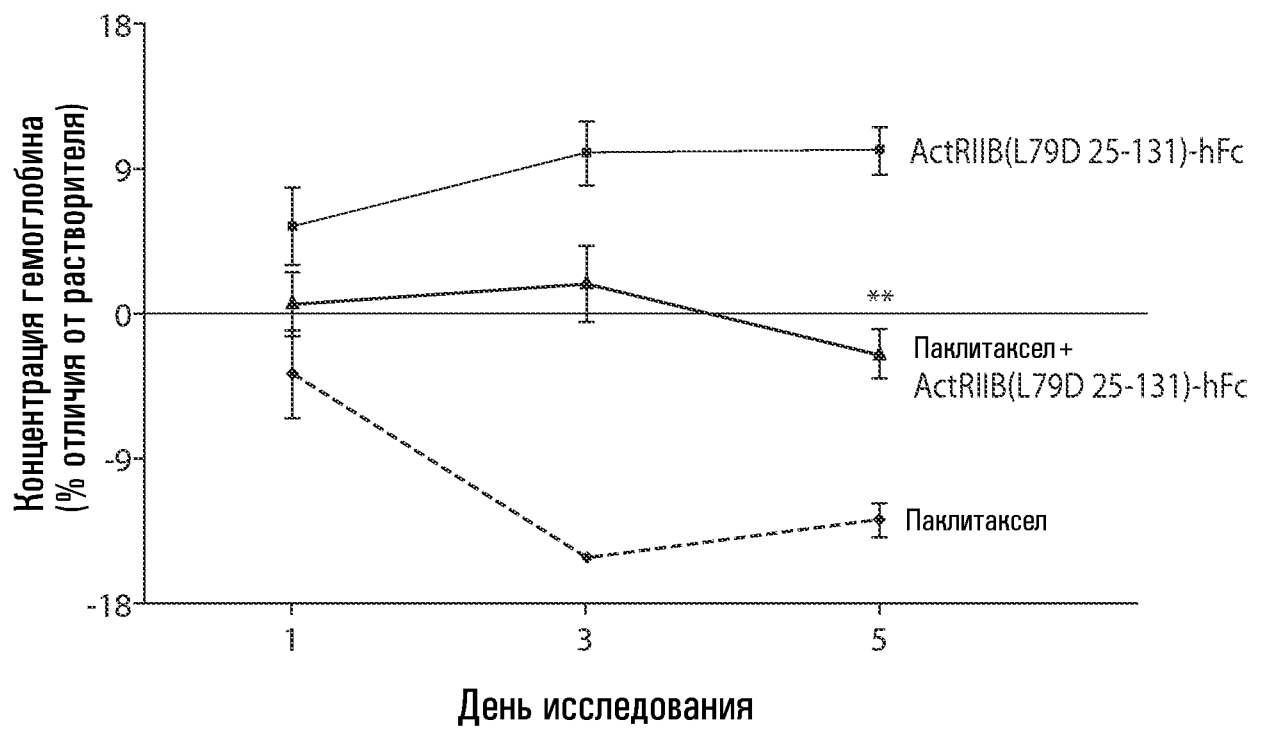
1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 30)
    GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 35)

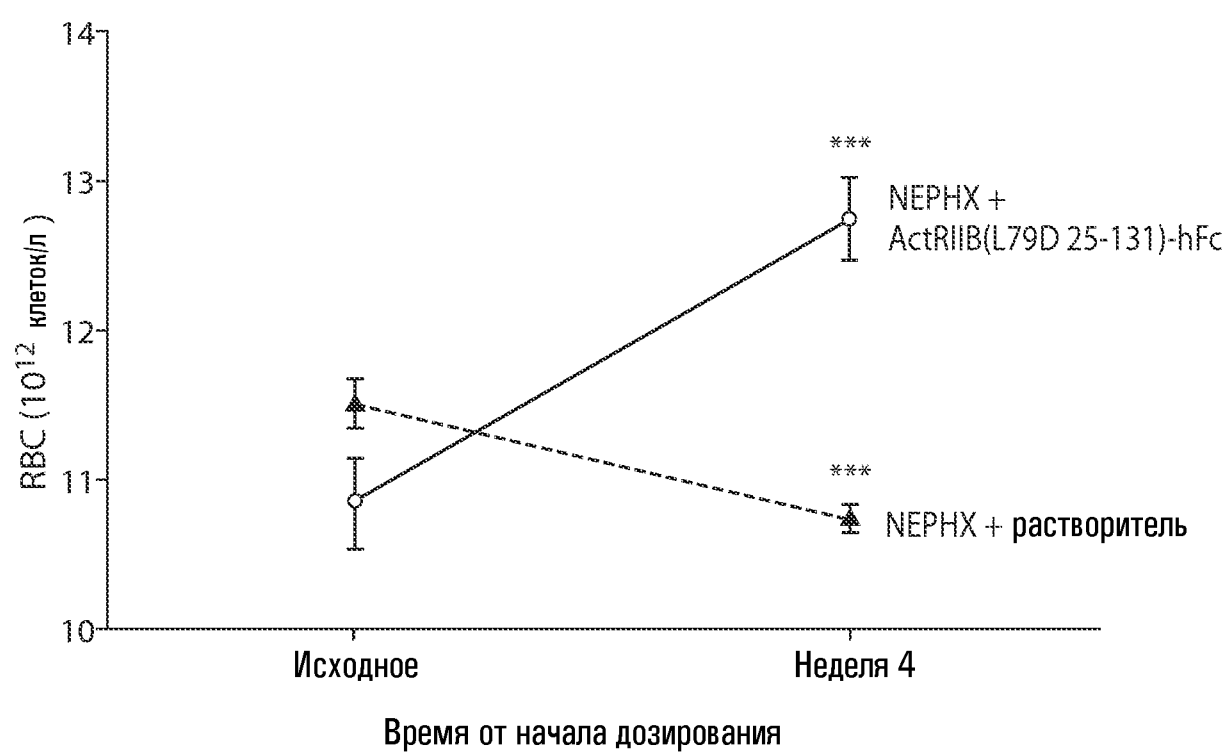
```

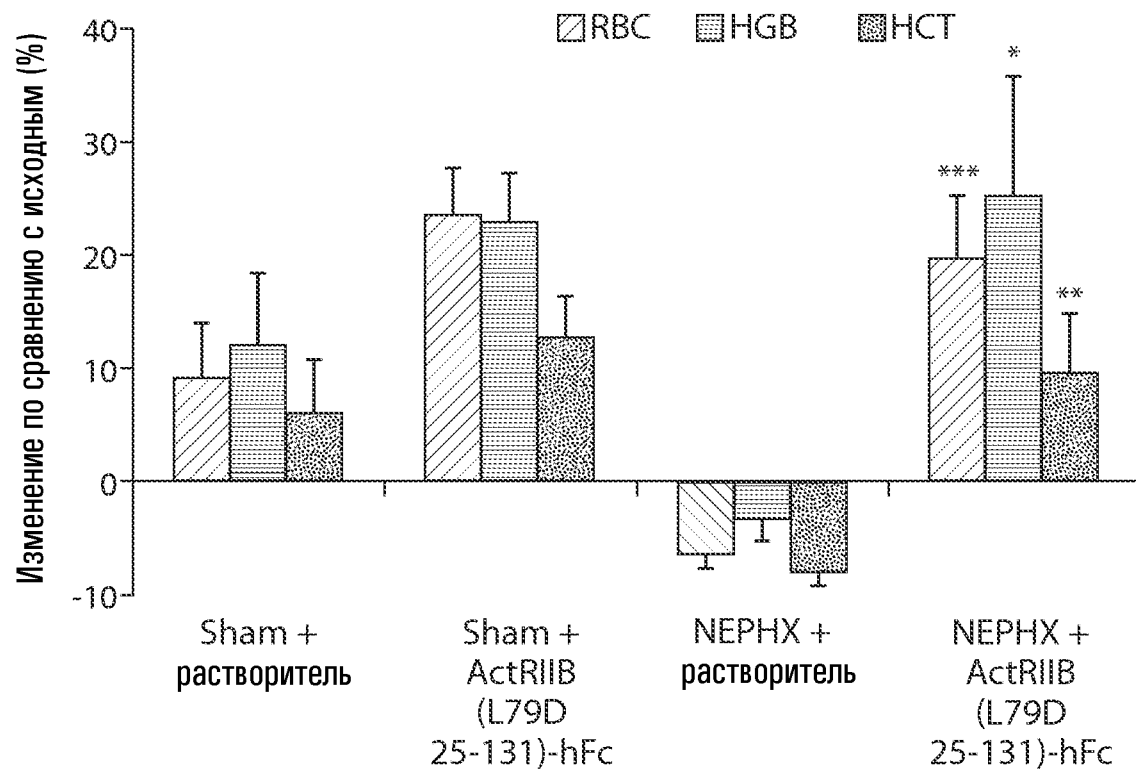
ФИГ.9(продолжение)

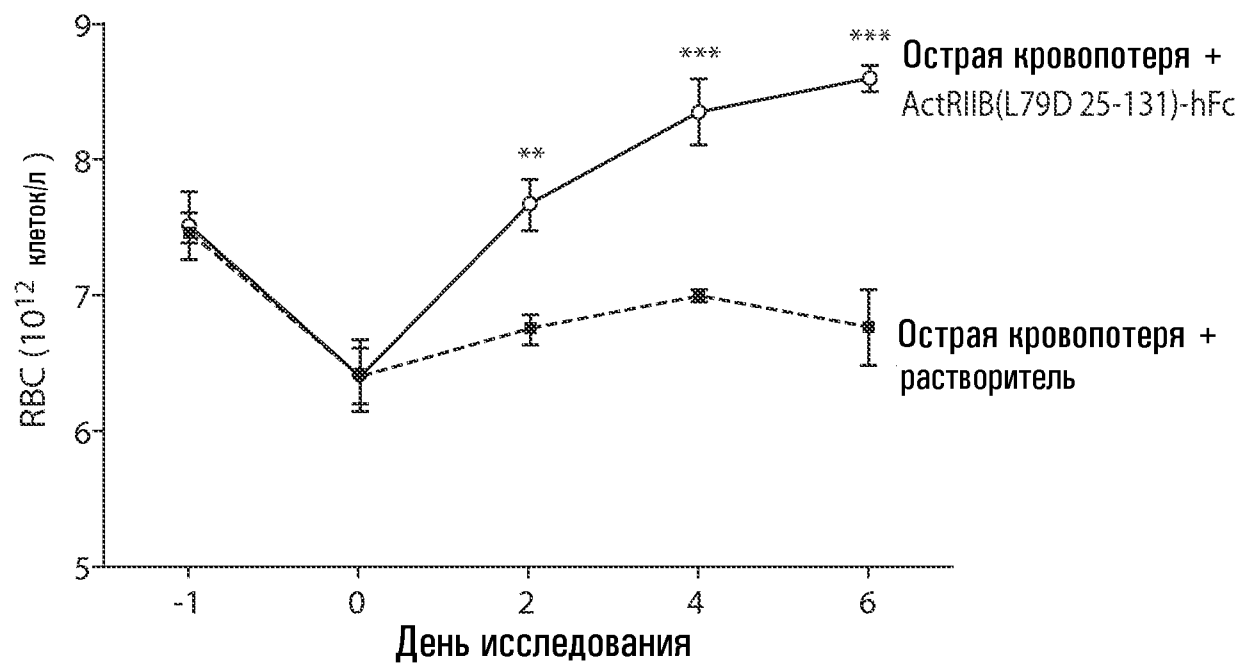
GAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA ATGCTAATTG GGA^{ACTCGAA}
 CGGACGAACC AATCCGGGCT CGAACGGTGT GAGGGCGAAC AGGATAAACG
 CCTCCATTGC TATGCGTCGT GGAGGAACTC CTCGGGGACG ATTGA^{ACTGG}
 TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTTCA ATTGTTATGA CCGCCAGGAA
 TGTGTCGCGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC TATTTCTGTT GTTGCGAGGG
 GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT CCCCGAAGCC GGC^{GGGCCCG}
 AGGTGACCTA TGAACCC^{CCCG} CCCACC (SEQ ID NO: 31)

ФИГ.10

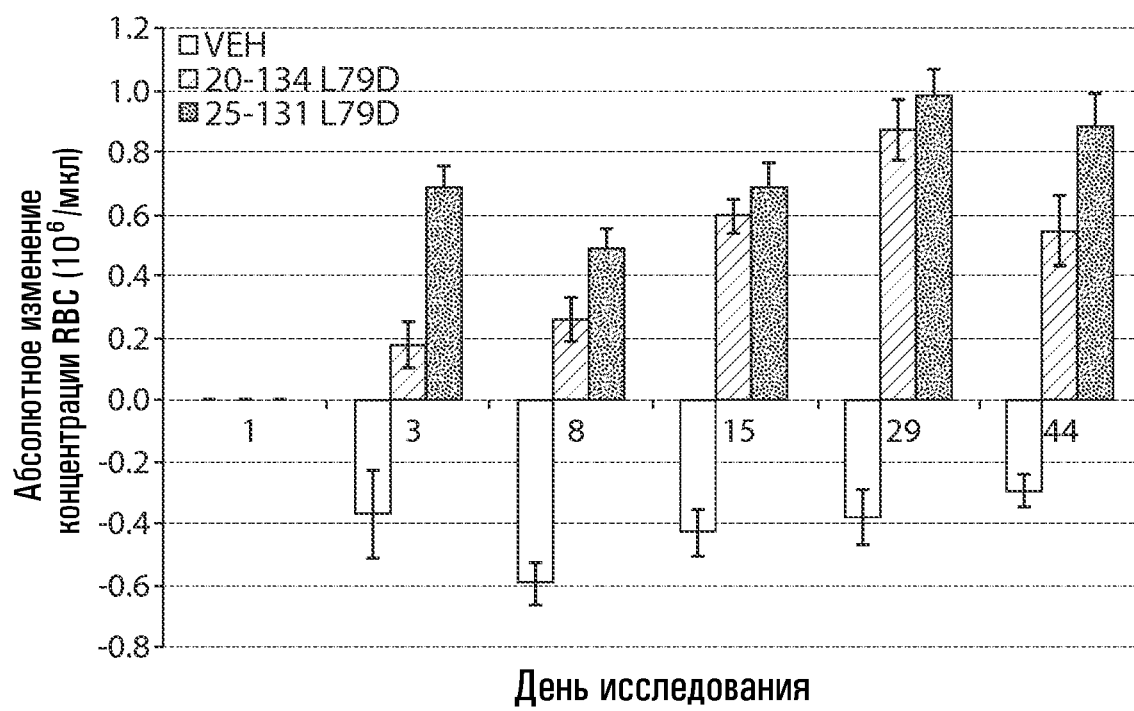
**ФИГ.11**

**ФИГ.12**

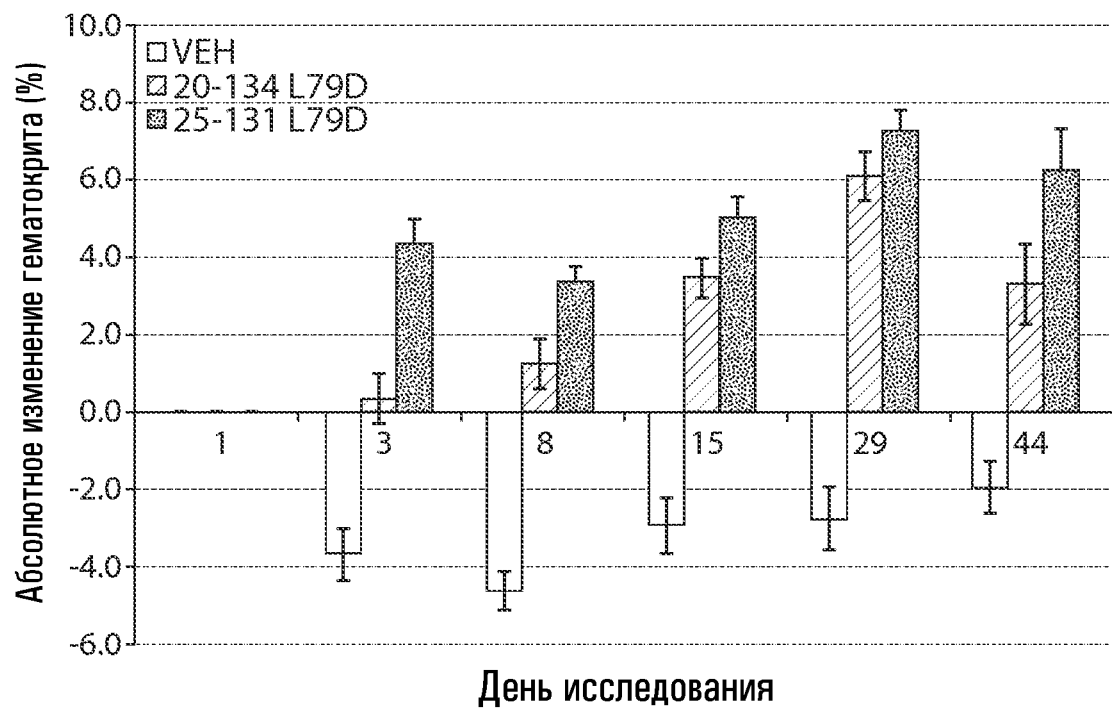
**ФИГ.13**

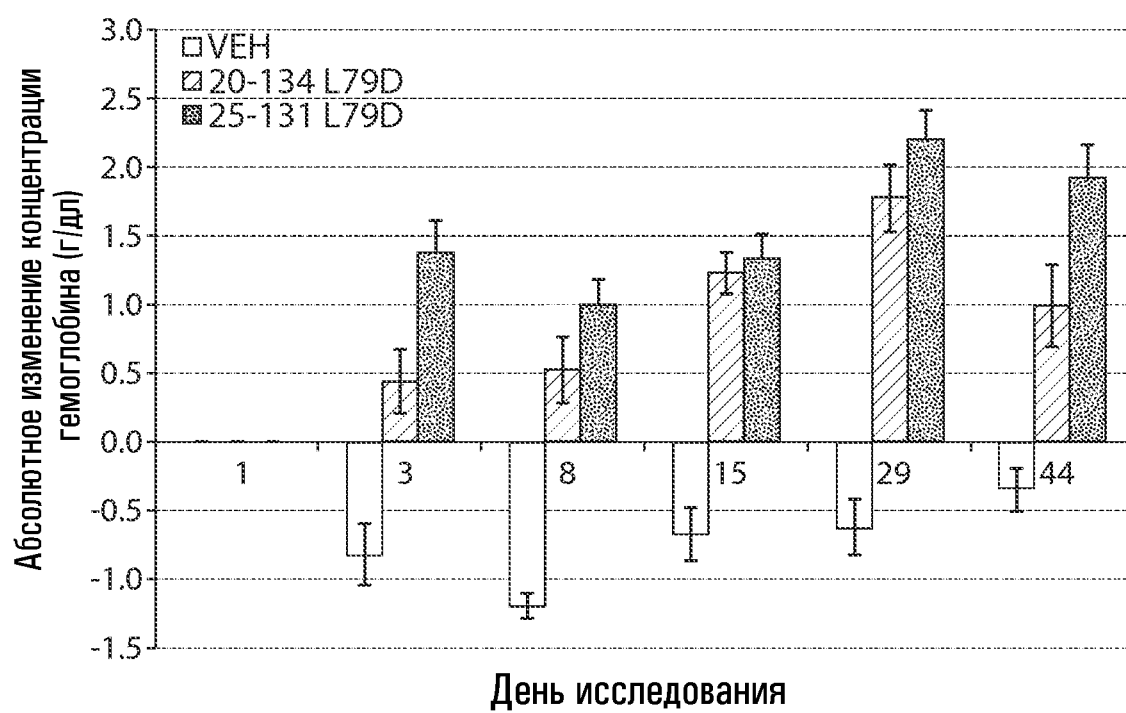


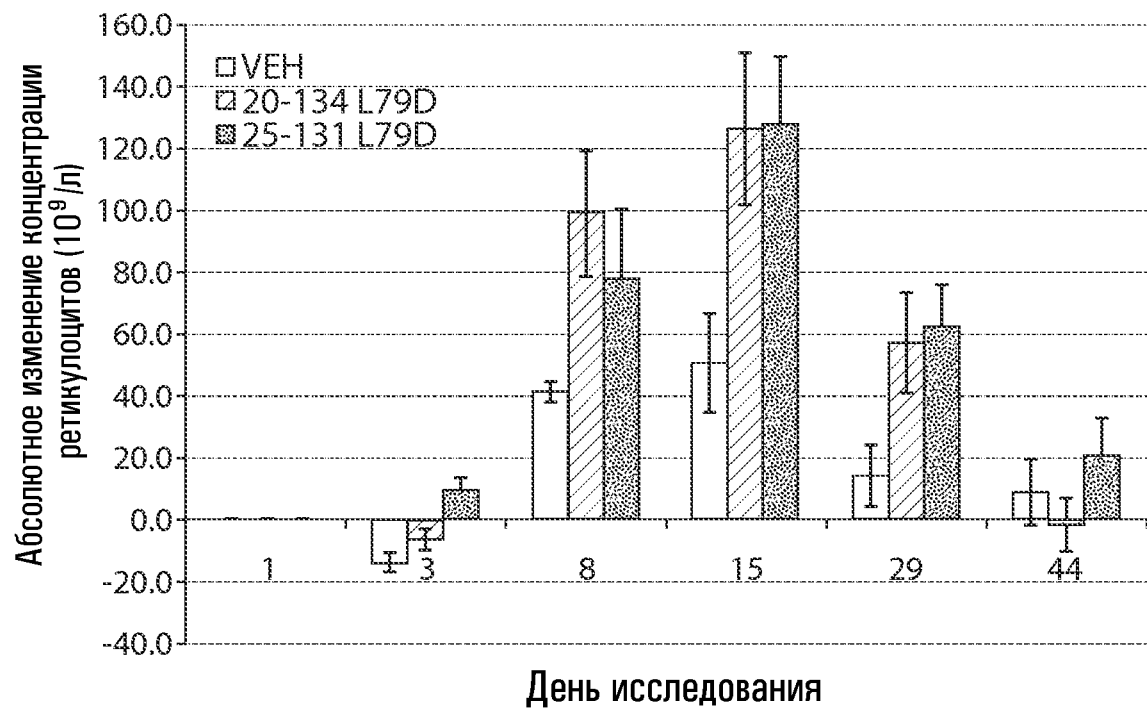
ФИГ.14

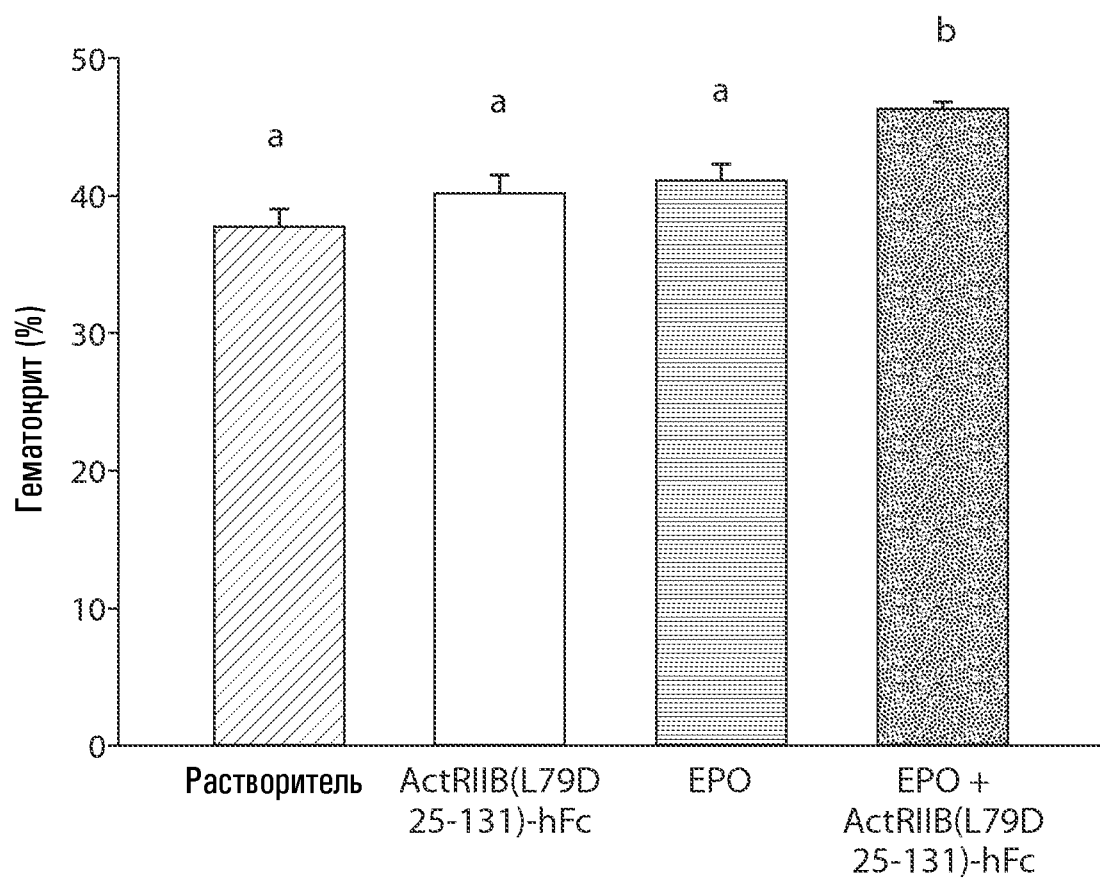


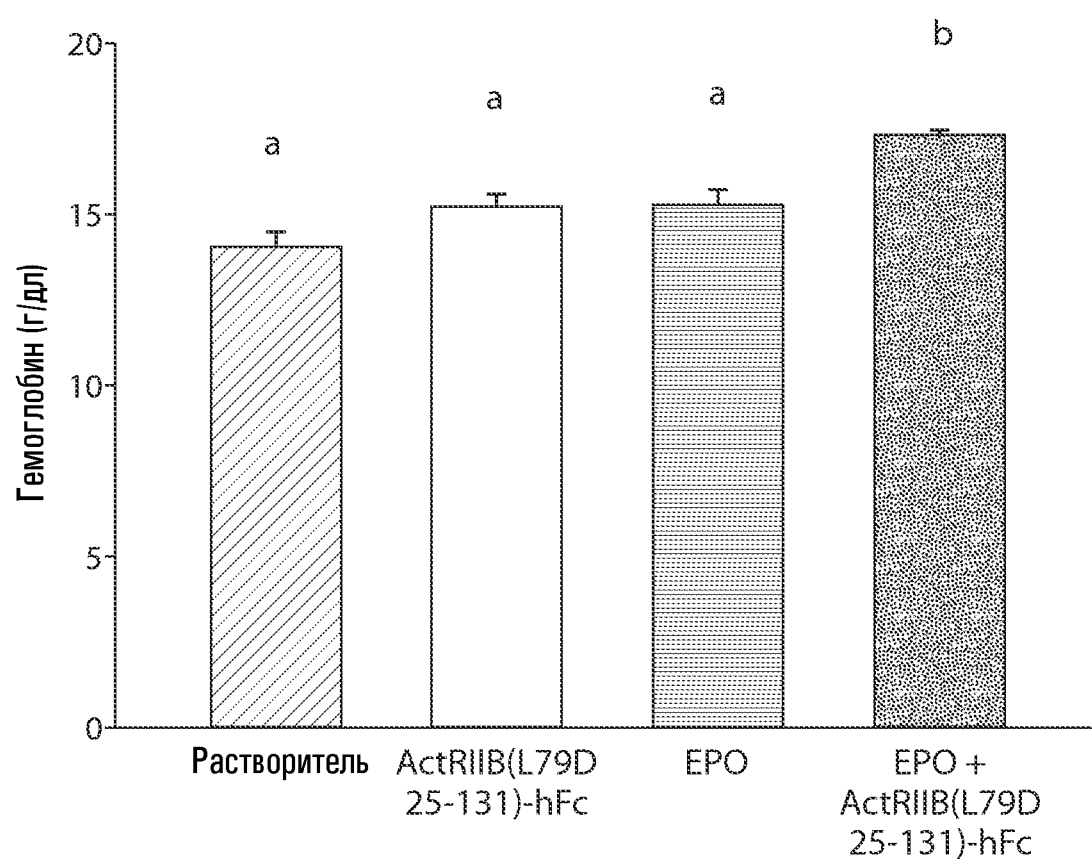
ФИГ.15

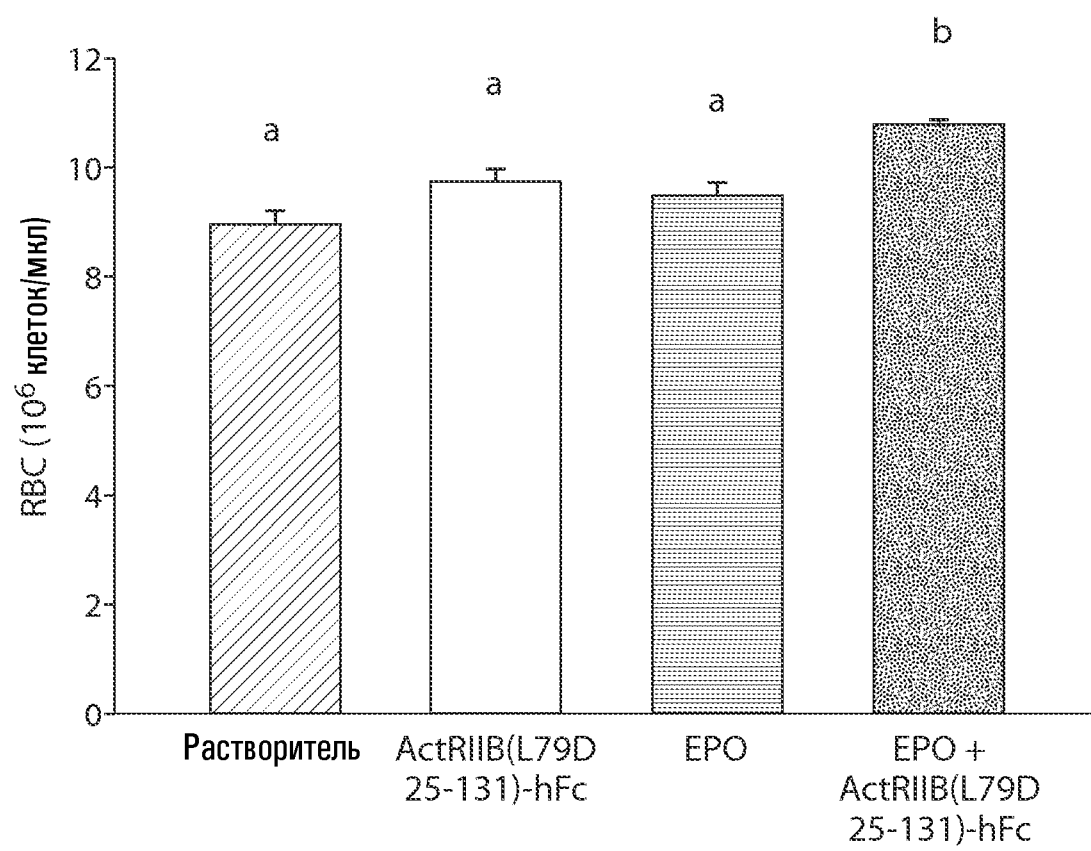
**ФИГ.16**

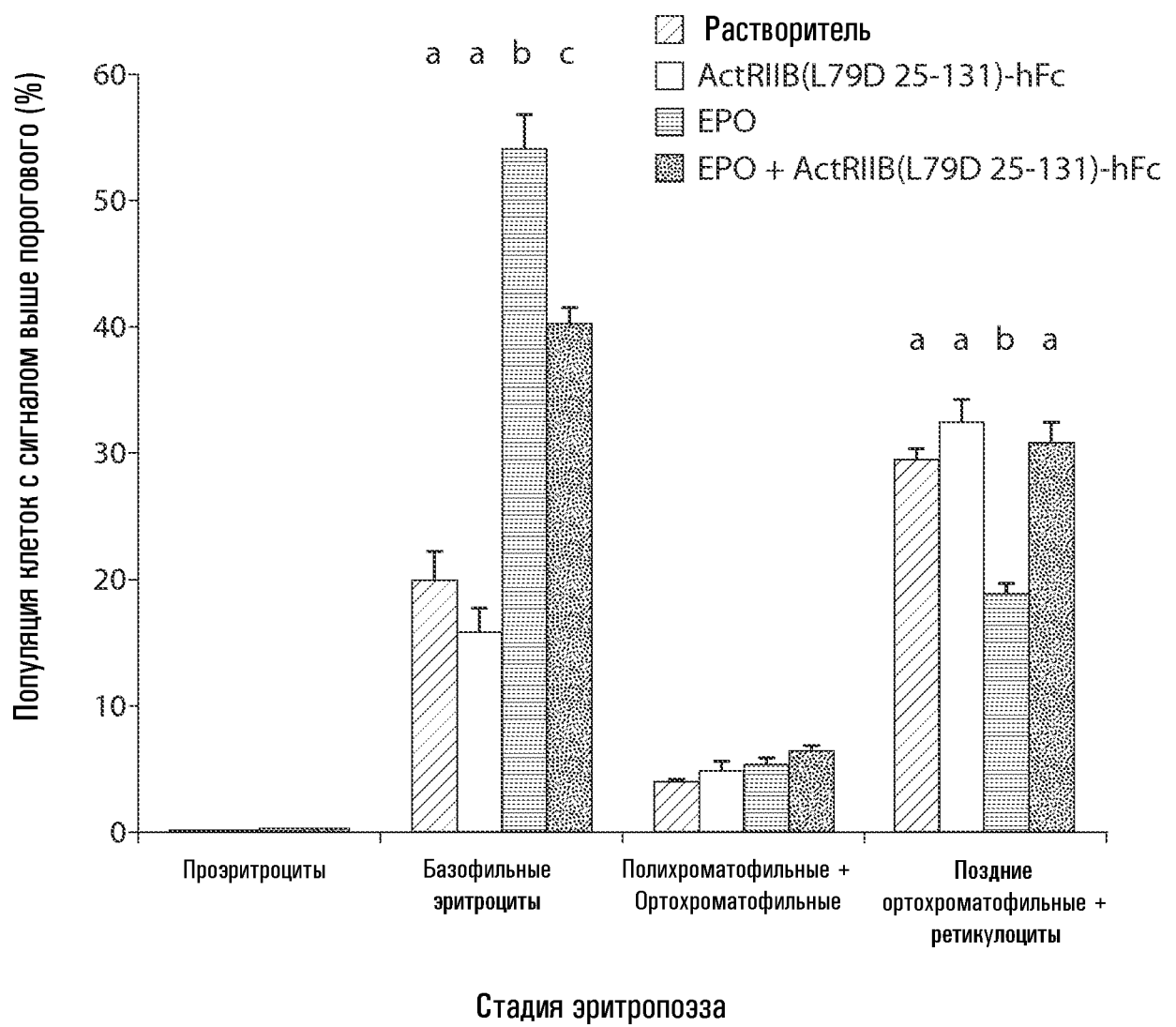
**ФИГ.17**

**ФИГ.18**

**ФИГ.19**

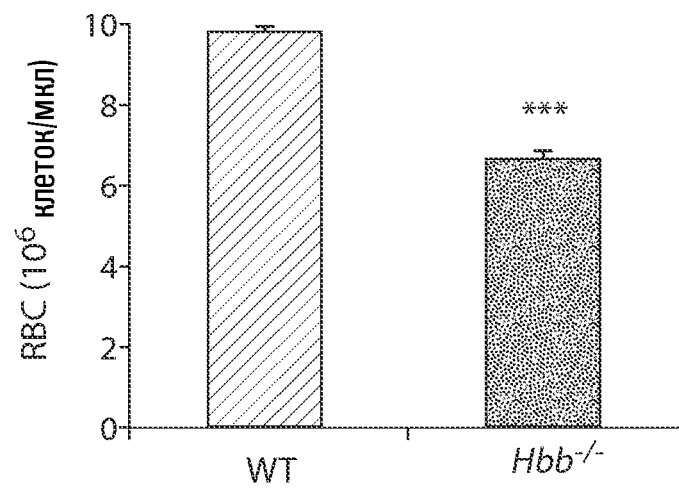
**ФИГ.20**

**ФИГ.21**

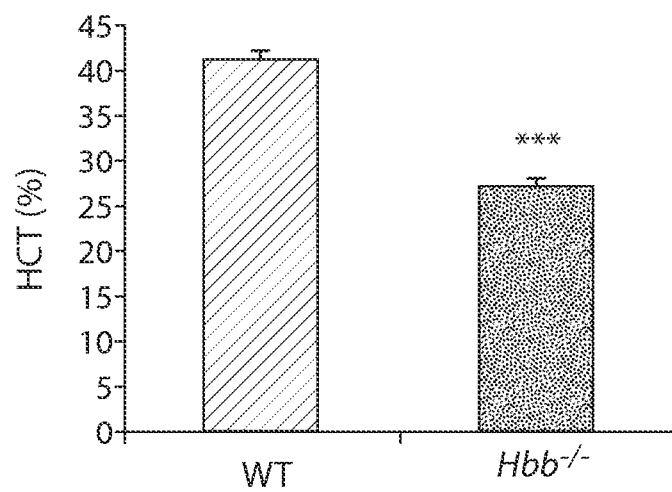


ФИГ.22

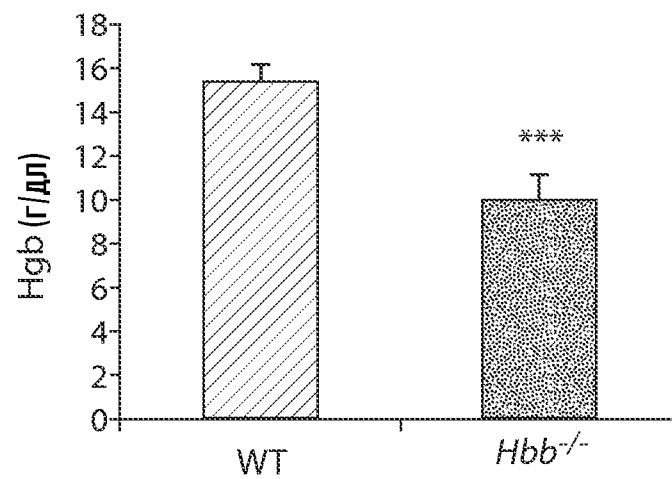
25/36



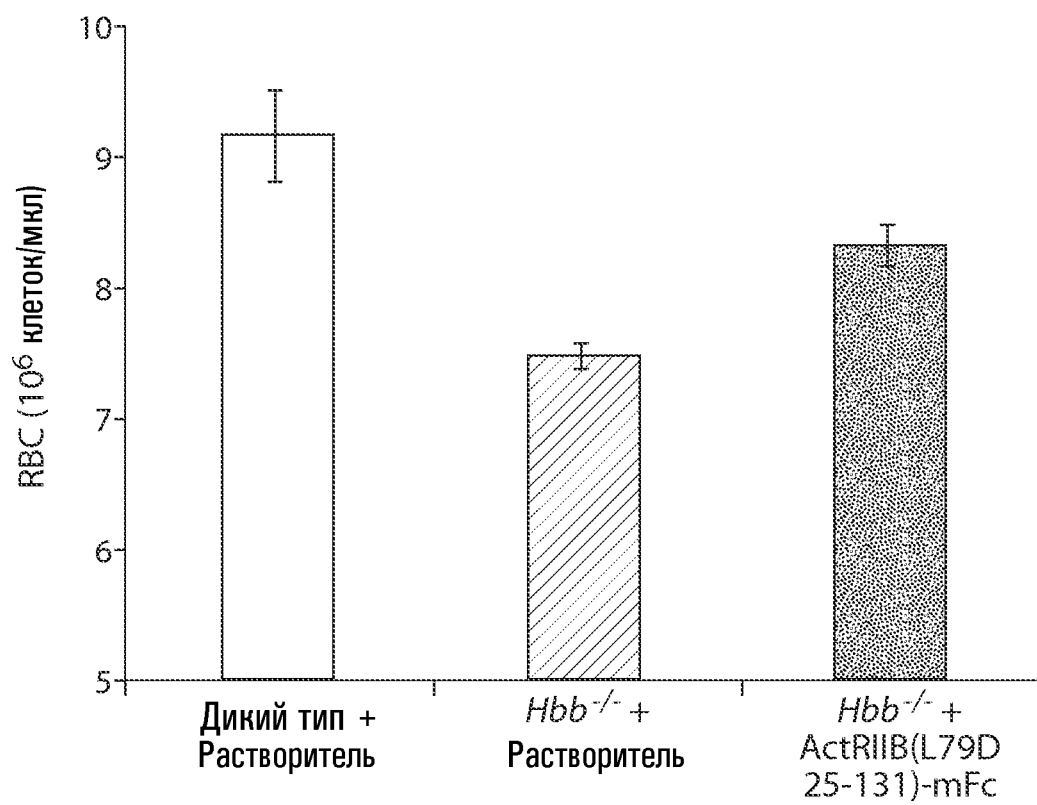
ФИГ.23А



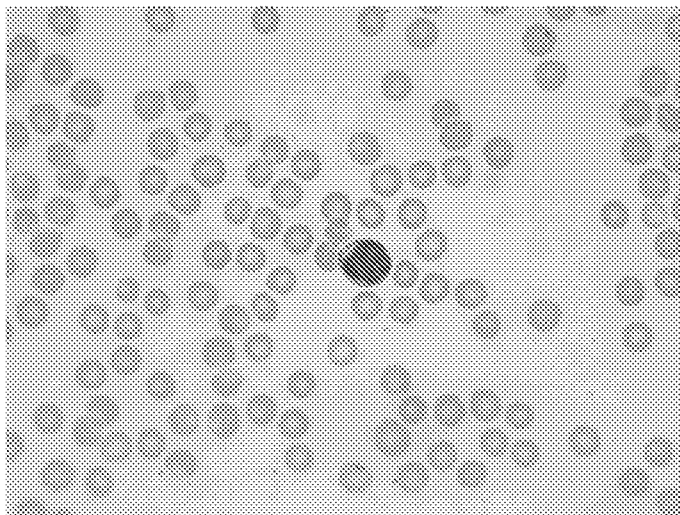
ФИГ.23В



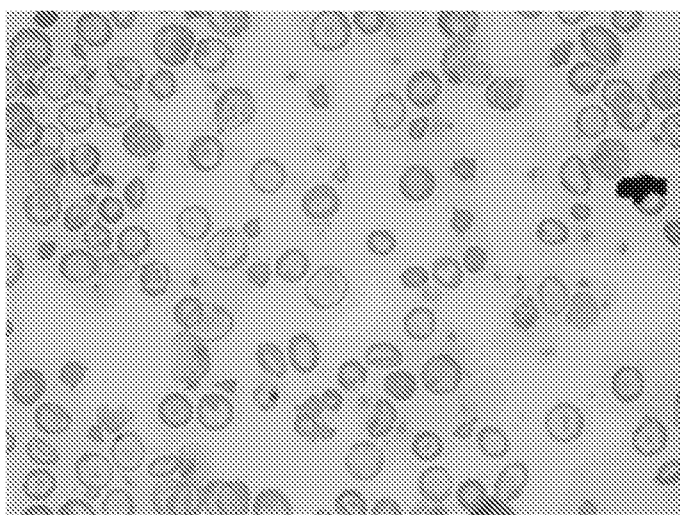
ФИГ.23С

**ФИГ.24**

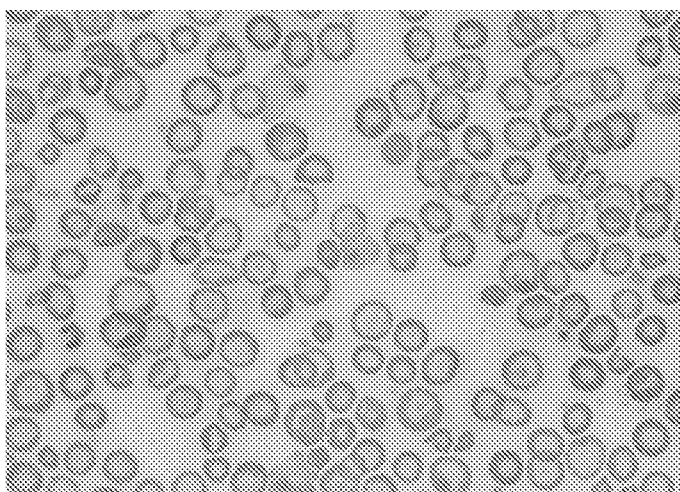
Дикий тип +
Растворитель



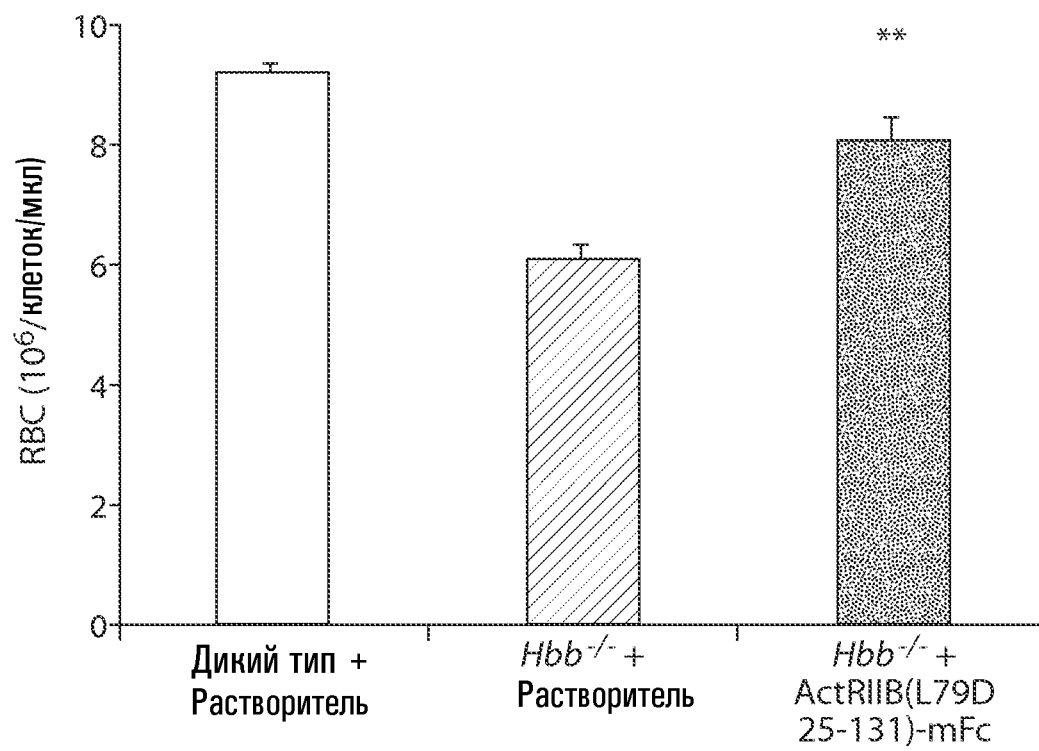
Hbb^{-/-} +
Растворитель



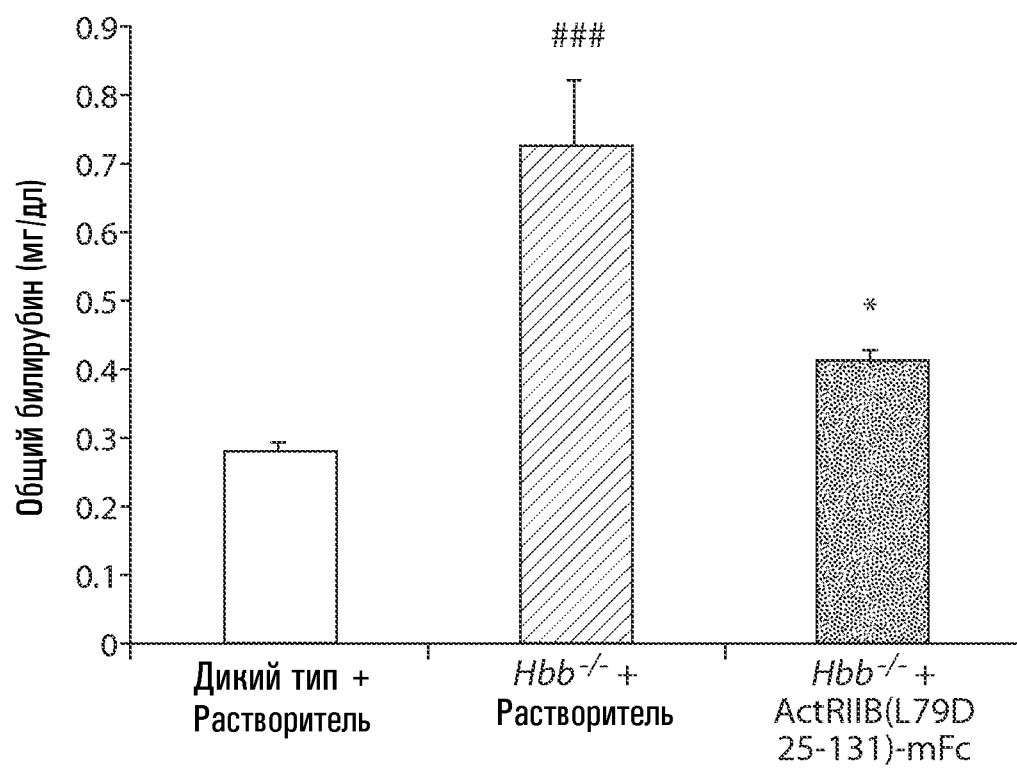
Hbb^{-/-} +
ActRIIB(L79D
25-131)-mFc

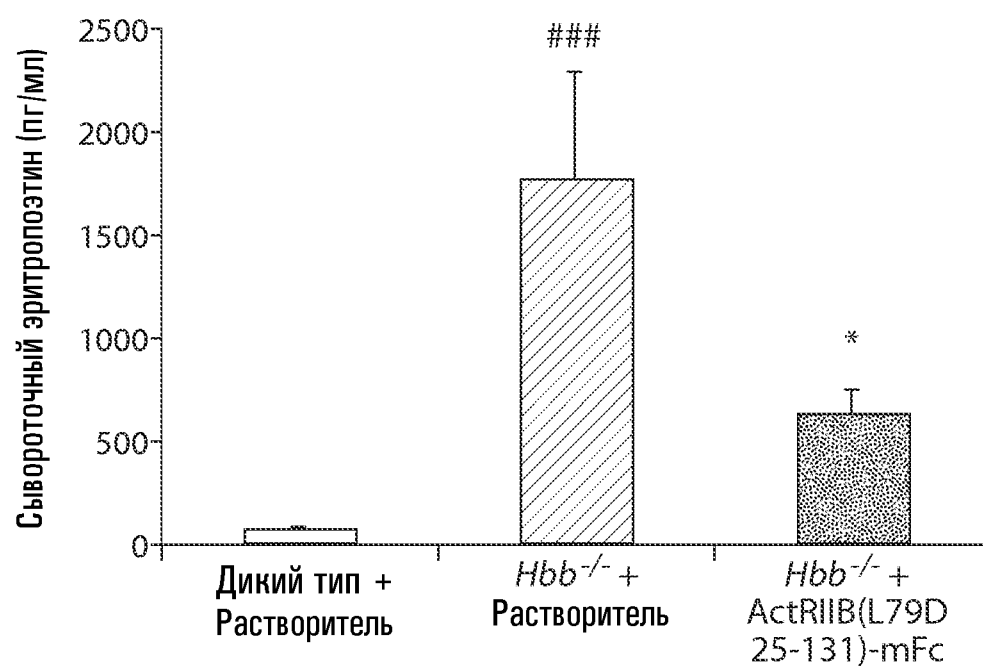


ФИГ.25

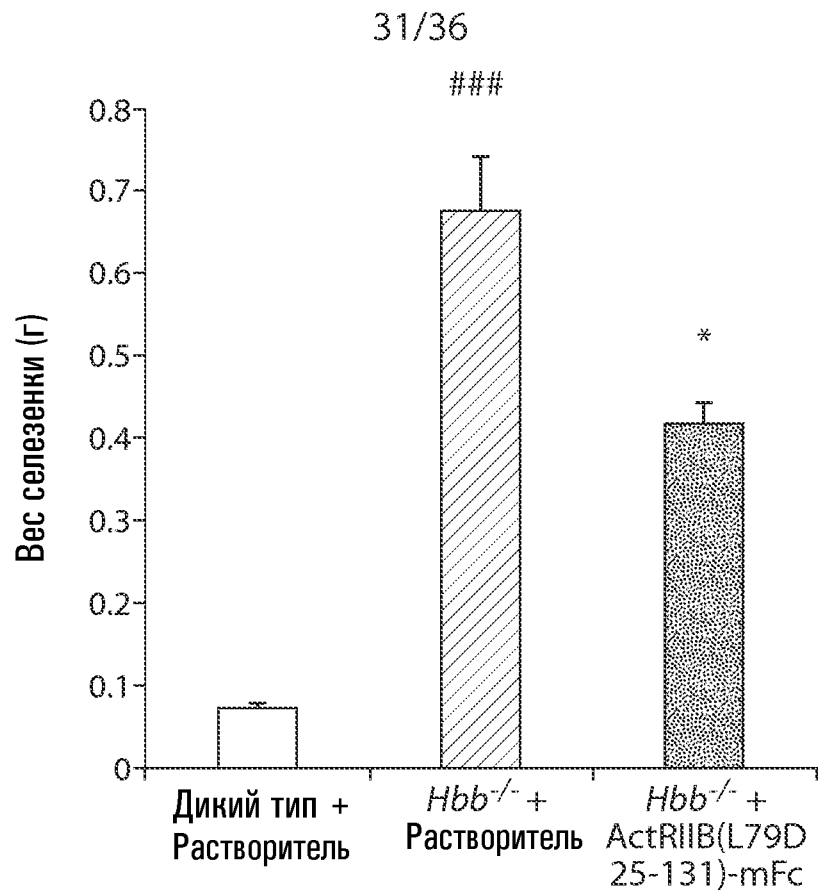


ФИГ.26

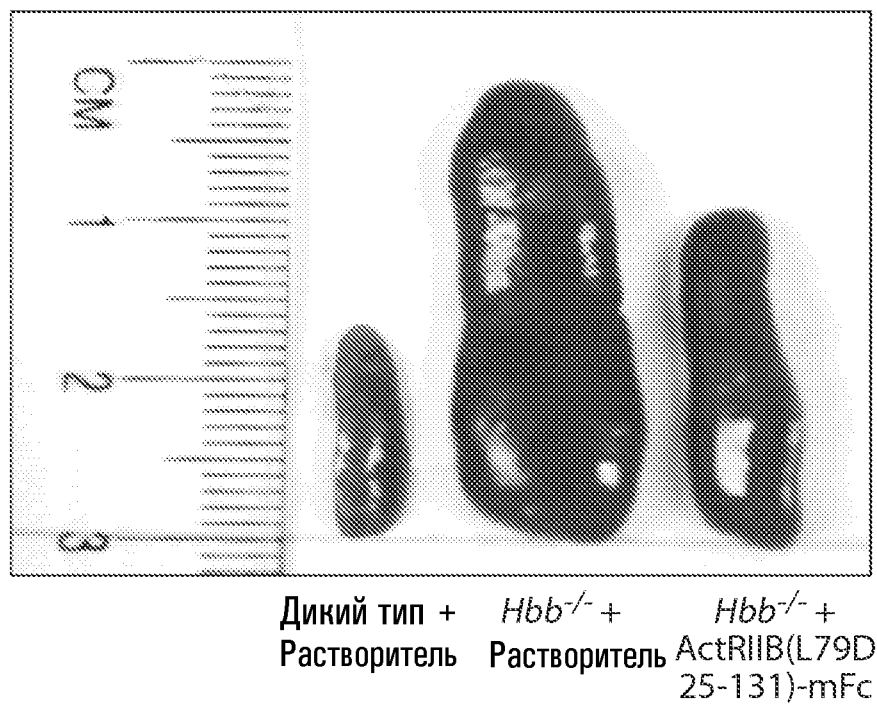
**ФИГ.27**



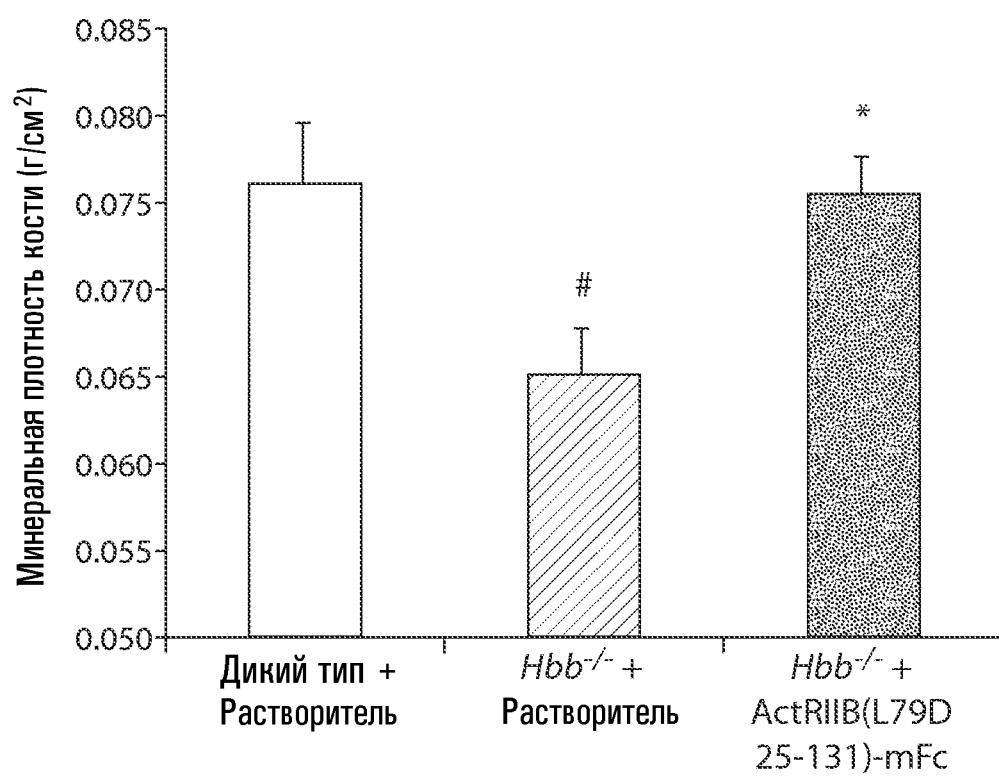
ФИГ.28

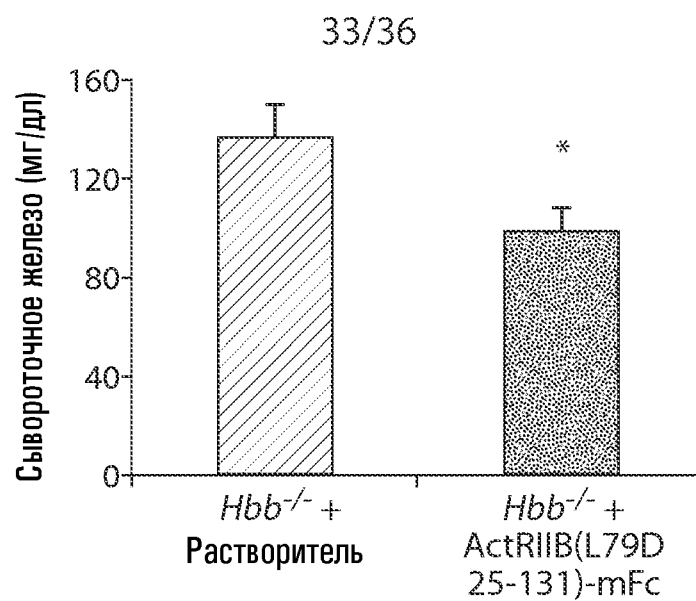


ФИГ.29А

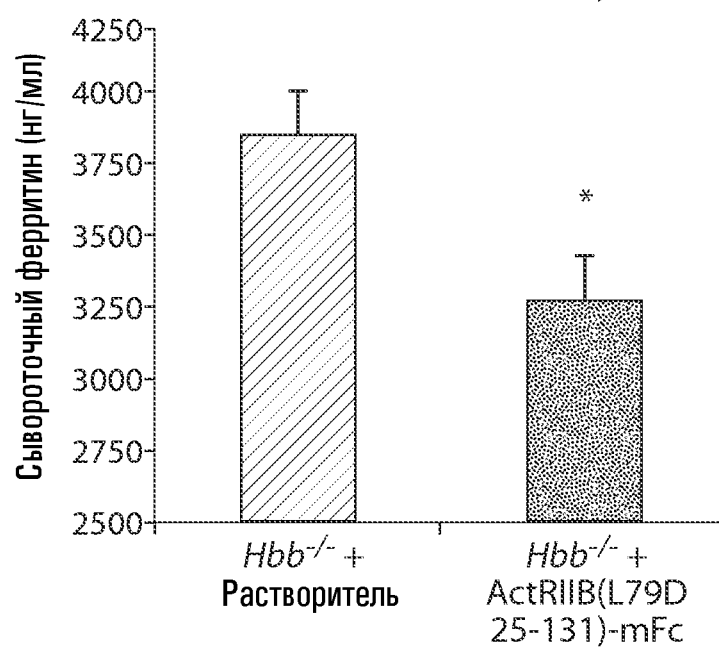


ФИГ.29В

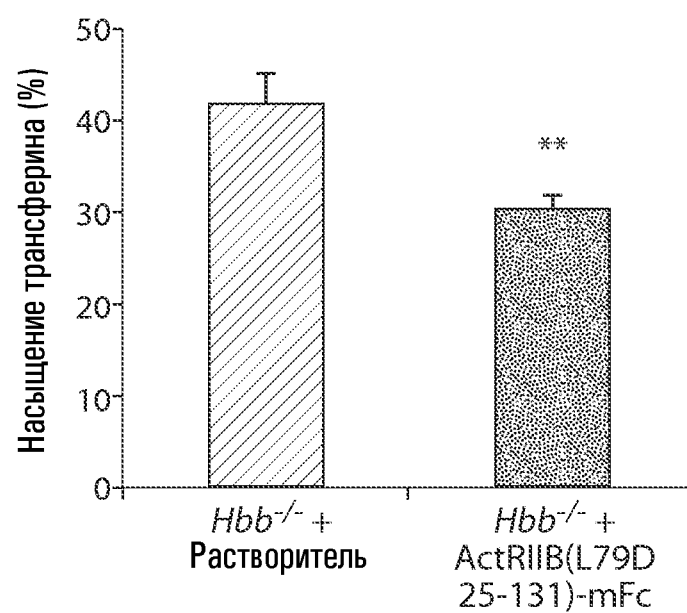
**ФИГ.30**



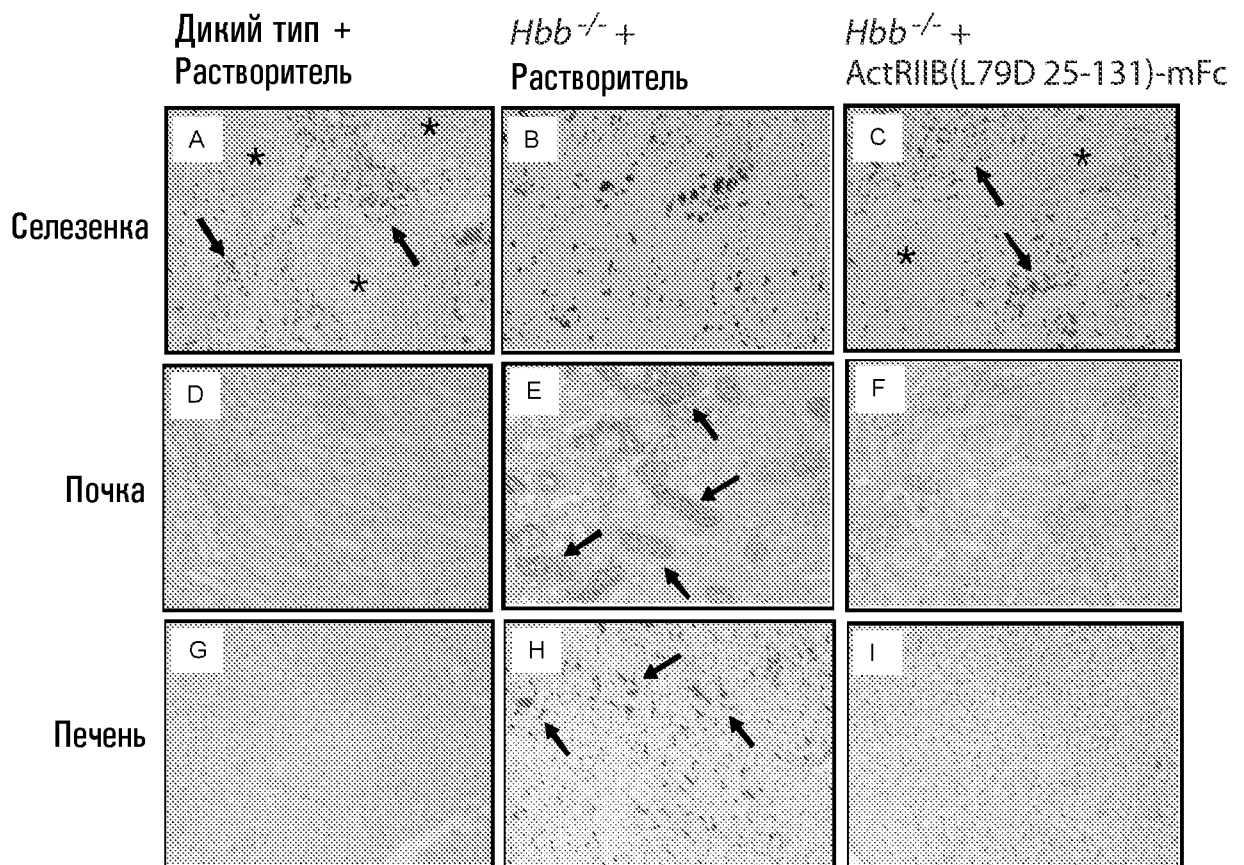
ФИГ.31А



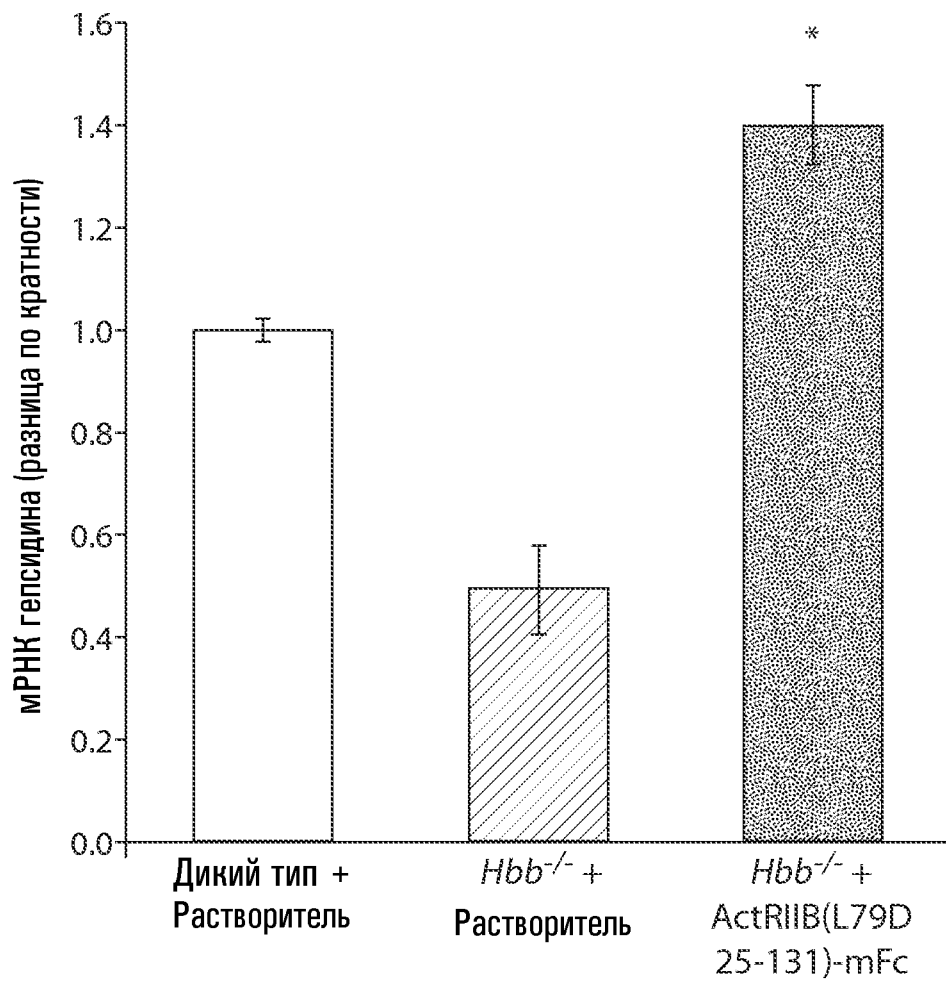
ФИГ.31В

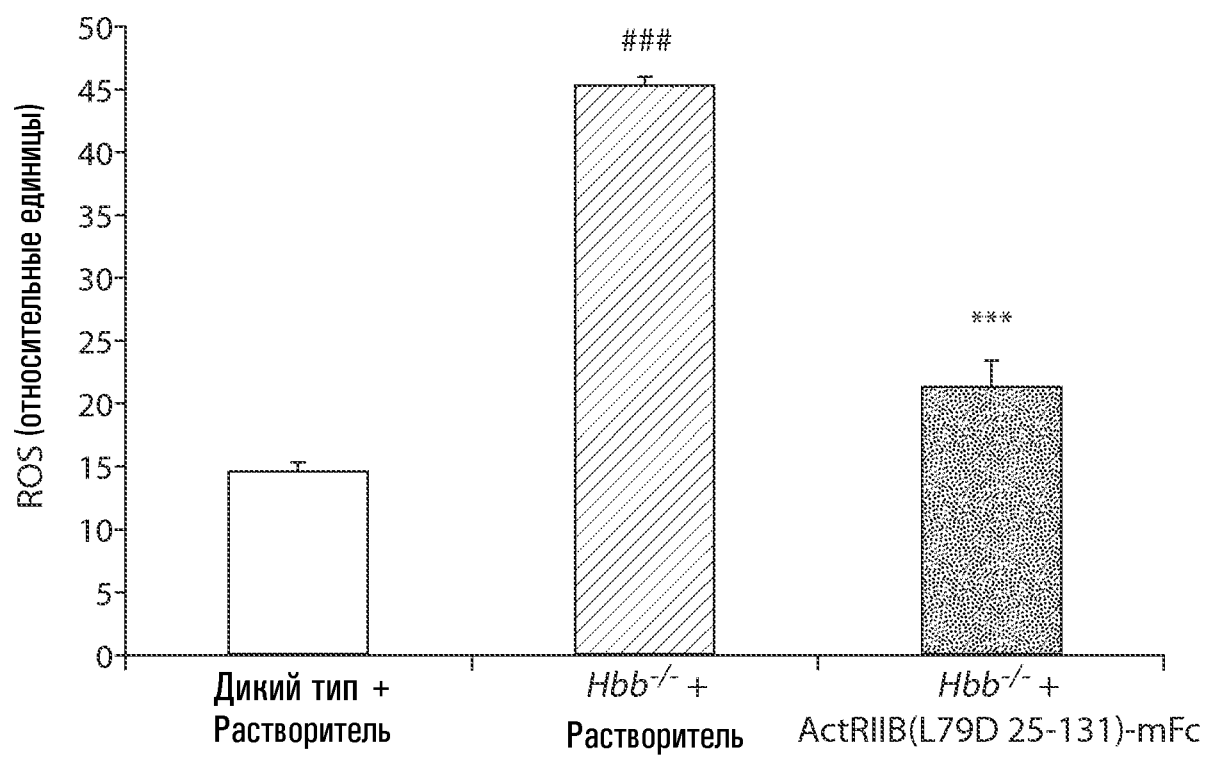


ФИГ.31С



ФИГ.32

**ФИГ.33**

**ФИГ.34**