

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090632** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.07.31

(51) Int. Cl. *C07K 14/515* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.06.04

(54) **СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАССТРОЙСТВ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОЛЛИСТАТИНОВЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ**

(31) 62/007,908

(72) Изобретатель:

(32) 2014.06.04

Кумар Равиндра, Гринберг Ася (US)

(33) US

(74) Представитель:

(62) 201692529; 2015.06.04

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

АКСЕЛЕРОН ФАРМА ИНК. (US)

(57) Настоящее изобретение относится, в частности, к фоллистатиновым полипептидам, которые могут быть использованы для местного введения, и к способам их применения.

A1

202090632

202090632

A1

**СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАССТРОЙСТВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ФОЛЛИСТАТИНОВЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

В настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки с регистрационным No. 62/007908, поданной 4 июня 2014 г. Содержание вышеуказанной заявки во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники

Суперсемейство трансформирующего фактора роста-бета (TGF-бета) включает ряд факторов роста, которые имеют общие элементы последовательностей и структурных мотивов. Известно, что эти белки оказывают биологическое действие на большое число клеток различных типов у позвоночных и беспозвоночных. Члены такого суперсемейства обладают важными функциями, влияющими на развитие эмбриона и ответственными за образование структуры ткани и за тканеспецифичность, и могут оказывать влияние на ряд процессов дифференцировки, включая адипогенез, миогенез, хондрогенез, кардиогенез, гематопоез, нейрогенез и дифференцировку эпителиальных клеток. Это семейство подразделяется на две основных ветви: BMP/GDF и TGF-бета/активин/BMP10, члены которых обладают различными и часто взаимодополняющими функциями. При изменении активности члена семейства TGF-бета, в организме часто могут происходить значительные физиологические изменения. Так, например, у крупного рогатого скота породы Пьемонт и Бельгийская голубая присутствует мутация гена GDF8 (также называемого миостатином), ответственная за потерю функции, где указанная мутация приводит к значительному увеличению мышечной массы. Grobet et al., Nat. Genet. 1997, 17(1):71-4. Кроме того, у человека, неактивные аллели GDF8 ассоциируются с увеличением мышечной массы и, как сообщалось, с исключительной мышечной силой. Schuelke et al., N. Engl. J. Med. 2004, 350:2682-8.

Изменения в мышцах, костях, хрящах и других тканях могут быть достигнуты путем передачи агонистического или антагонистического сигнала, опосредуемого соответствующим членом семейства TGF-бета. Однако, поскольку члены этого семейства

могут влиять более, чем на одну ткань, то желательно, чтобы лечение некоторых пациентов было направлено на терапевтическое ингибирование членов этого семейства в отдельных органах, но не во всем организме. Таким образом, необходимо получить средства, которые функционировали бы как сильные регуляторы передачи сигнала TGF-бета и могли бы быть применены для местного введения.

Описание сущности изобретения

В частности, настоящее изобретение относится к фоллистатиновым полипептидам, которые были сконструированы так, чтобы они ингибировали лиганды фоллистатина (например, активин А, активин В, GDF8 и GDF11), находящиеся в непосредственной близости от ткани, в которую вводят такие фоллистатиновые полипептиды, где указанные полипептиды оказывают незначительное системное воздействие на пациента, либо вообще не оказывают такого воздействия.

Описанные здесь фоллистатиновые полипептиды включают полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична любой из SEQ ID NOS: 1-4, 7-16 и 26-43. Фоллистатиновый полипептид может быть, но необязательно, сконструирован так, чтобы он димеризовался или образовывал мультимеры высшего порядка. Это может быть достигнуто путем присоединения фоллистатиновой последовательности фоллистатинового полипептида к домену, сообщающему димеризацию или мультимеризацию. Примером такого домена является константный домен иммуноглобулина, включающий, например, Fc-часть иммуноглобулина. Фоллистатиновая часть может быть непосредственно присоединена, но необязательно, к гетерологичной части, либо может быть использована промежуточная последовательность, такая как линкер. Примером линкера является последовательность TGGG. Фоллистатиновый полипептид может, но необязательно, обладать такой же гепарин-связывающей активностью, как и человеческий фоллистатин-288. Альтернативно, фоллистатин может иметь маскированный гепарин-связывающий домен, подобный домену, присутствующему в человеческом фоллистатине-

315. В частности, настоящее изобретение относится к терапевтически оптимизированным фоллистатиновым полипептидам, содержащим часть константного домена иммуноглобулина человеческого IgG, который обладает более низкой ADCC- или CDC-активностью по сравнению с нативным человеческим IgG1. Примерами являются IgG2, IgG3, IgG4, гибрид IgG2/4 и варианты IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В частности, настоящее изобретение относится к оптимально активной форме фоллистатина, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15 или 16, или состоит или, по существу, состоит из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:15 или 16, которые сообщают белку более высокое качество и активность по сравнению с нативными формами FST(288) и FST(315), где такими оптимально активными формами являются димерные гибридные белки, такие как белки «фоллистатин-Fc».

В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему первую аминокислотную последовательность и вторую аминокислотную последовательность, где первая аминокислотная последовательность состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15 и 16, а вторая аминокислотная последовательность содержит константный домен иммуноглобулина. Между первой аминокислотной последовательностью и второй аминокислотной последовательностью может присутствовать, но необязательно, линкерный полипептид. Линкерный полипептид содержит, но необязательно, последовательность TGGG, или состоит или, по существу, состоит из этой последовательности. Вторая аминокислотная последовательность содержит, но необязательно, константный домен иммуноглобулина IgG, или состоит или, по существу, состоит из этого домена. Вторая аминокислотная последовательность содержит, но необязательно, константный домен иммуноглобулина IgG, или состоит или, по существу, состоит из константного домена иммуноглобулина IgG, который обладает пониженной ADCC-активностью по сравнению с человеческим IgG1. Вторая аминокислотная последовательность содержит, но необязательно, константный домен иммуноглобулина IgG, или

состоит, или, по существу, состоит из этого домена. Вторая аминокислотная последовательность содержит, но необязательно, константный домен иммуноглобулина IgG, или состоит, или, по существу, состоит из константного домена иммуноглобулина IgG, который обладает пониженной CDC-активностью по сравнению с человеческим IgG1. Вторая аминокислотная последовательность содержит, но необязательно, константный домен иммуноглобулина IgG, или состоит, или, по существу, состоит из константного домена иммуноглобулина IgG, выбранного из группы, состоящей из IgG1, IgG2 и IgG4. Вторая аминокислотная последовательность содержит, но необязательно, Fc-часть иммуноглобулина или состоит из Fc-части иммуноглобулина, такого как иммуноглобулин IgG, который может представлять собой иммуноглобулин, обладающий пониженной ADCC-активностью, CDC-активностью или той и другой активностью по сравнению с человеческим IgG1, и примерами таких IgG являются IgG2, IgG4 и гибрид IgG2/4 или любые IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 с различными мутациями. В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к фоллистатиновым полипептидам, которые содержат аминокислотную последовательность, или состоят, или, по существу, состоят из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности, выбранной из группы SEQ ID NO: 38-43. В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к фоллистатиновым полипептидам, которые содержат аминокислотную последовательность, или состоят, или, по существу, состоят из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности, выбранной из группы SEQ ID NO: 26-28 и 32-34. В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к фоллистатиновым полипептидам, которые содержат аминокислотную последовательность, или состоят, или, по существу, состоят из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности, выбранной из группы SEQ ID NO: 29-31 и 35-37. Нужные фоллистатиновые полипептиды

могут связываться с одним или более лигандами, выбранными из группы, состоящей из миостатина, GDF-11, активина А и активина В с KD менее, чем 1 нМ, 100 пМ, 50 пМ или 10 пМ. В некоторых аспектах изобретения, любые из вышеупомянутых полипептидов могут представлять собой димеры, включая гетеродимеры или гомодимеры, или мультимеры высшего порядка. Любой из вышеупомянутых полипептидов может быть включен в фармацевтический препарат.

В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим любые описанные здесь фоллистатиновые полипептиды, и к клеткам, содержащим такие нуклеиновые кислоты, где указанные клетки могут быть использованы для продуцирования фоллистатиновых полипептидов.

В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к способам лечения тканей или органов путем непосредственного введения в такую ткань фоллистатинового полипептида. Так, например, настоящее изобретение относится к способу увеличения размера мышц или мышечной силы у пациента, где указанный способ включает введение эффективного количества фоллистатинового полипептида путем внутримышечной инъекции такого полипептида в мышцу пациента, нуждающегося в этом, в результате чего происходит увеличение размера нужной мышцы или ее силы, где фоллистатиновый полипептид не оказывает какого-либо значительного воздействия на размер мышц или мышечную силу всего организма. Нужная мышца может быть повреждена, ослаблена или атрофирована, как это может происходить при различных мышечных расстройствах, включая мышечные дистрофии (такие как мышечная дистрофия Дюшенна, мышечная дистрофия Беккера и плече-лопаточно-лицевая мышечная дистрофия), воспалительные мышечные расстройства (такие как миозит, вызываемый тельцами включения), повреждения или травмы мышц, бездействие мышц (как это может происходить после длительного постельного режима или обездвиживания конечностей) и атрофию или слабость мышц в результате старения, раковых или хронических заболеваний различных типов. Эти способы могут быть также применены к здоровым мышцам, размер или силу которых желательно увеличить. Кроме того, введение фоллистатинового полипептида в мышцу может

приводить к общему снижению жира в организме, а поэтому такой полипептид может быть использован для лечения ожирения или других расстройств, ассоциированных с избытком жира в организме, где такой фоллистатин может быть непосредственно введен, но необязательно, в жировую ткань. Фоллистатиновый полипептид может быть введен только в одну нужную мышцу или в более, чем одну нужную мышцу. Эти способы и фоллистатиновые полипептиды могут быть применены для достижения желательного воздействия на нужную ткань, например, мышцы, но без какого-либо значительного влияния на другие ткани, такие как мышцы или другие органы, не являющиеся мишенями. В результате этого, системные эффекты фоллистатина могут не наблюдаться. Так, например, размер или сила мышцы, которая является контралатеральной по отношению к мышце-мишени, могут, в основном, не увеличиваться, либо у пациента может не наблюдаться какого-либо значительного изменения параметров, выбранных из группы, состоящей из уровней фолликулостимулирующих гормонов (FSH) в сыворотке, размера печени, гематокрита, уровней гемоглобина и ретикулоцитов.

Краткое описание чертежей

На **фигуре 1** представлена полная непротессированная аминокислотная последовательность человеческого фоллистатина 315 (SEQ ID NO:3). Лидерная последовательность показана курсивом и жирным шрифтом, N-концевая область фоллистатина (FSN) подчеркнута одной чертой, а три домена фоллистатина (FSD) подчеркнуты двойной чертой. В частности, фоллистатиновый домен I (FSDI) показан красным шрифтом, фоллистатиновый домен II (FSDII) показан синим шрифтом, а фоллистатиновый домен III (FSDIII) показан зеленым шрифтом.

На **фигуре 2** проиллюстрировано влияние 4-недельной обработки мышей путем подкожной инъекции FST(288)-Fc, FST(315)-Fc или ActRIIB-Fc на массу истощенной ткани у мышей. В качестве носителя использовали забуференный трисом физиологический раствор. Данные представлены как среднее \pm ср. кв. откл. *, величина $P < 0,05$ была вычислена по сравнению с TBS-группами с помощью непарного t-критерия; #, величина $P < 0,05$ была вычислена

по сравнению с FST-группами с помощью непарного t-критерия. Обработка белками FST(288)-Fc, FST(315)-Fc и ActRIIB-Fc приводила к значительному увеличению массы истощенной ткани по сравнению с контрольными мышами, обработанными носителем. Увеличение массы истощенной ткани у ActRIIB-Fc-обработанных мышей было значительно больше, чем увеличение массы истощенной ткани у мышей, обработанных белком FST(288)-Fc или FST(315)-Fc.

На фигуре 3 проиллюстрировано влияние 4-недельной обработки мышей, проводимой 2 раза в неделю путем подкожной инъекции FST(288)-Fc, FST(315)-Fc или ActRIIB-Fc, на силу лап у мышей. В качестве носителя использовали забуференный трисом физиологический раствор. Данные представлены как среднее \pm ср. кв. откл. *, величина $P < 0,05$ была вычислена по сравнению с TBS-группами с помощью непарного t-критерия; #, величина $P < 0,05$ была вычислена по сравнению с FST-группами с помощью непарного t-критерия. ActRIIB-Fc-обработка приводила к увеличению силы лап у мышей. У мышей, обработанных белком FST(288)-Fc или FST(315)-Fc, какого-либо увеличения силы лап не наблюдалось.

На фигуре 4 проиллюстрировано влияние 4-недельной обработки мышей, проводимой два раза в неделю путем подкожной инъекции FST(288)-IgG1, FST(315)-IgG1 или ActRIIB-Fc, на массу мышц грудной клетки (Pecs), передней большеберцовой кости (TA), икроножной мышцы (Gastroc) и мышцы бедра у мышей. В качестве носителя использовали забуференный трисом физиологический раствор. Данные представлены как среднее \pm ср. кв. откл. *, величина $P < 0,05$ была вычислена по сравнению с TBS-группами с помощью непарного t-критерия; #, величина $P < 0,05$ была вычислена по сравнению с FST-группами с помощью непарного t-критерия. ActRIIB-Fc-обработка приводила к значительному увеличению массы мышц грудной клетки, передней большеберцовой кости, икроножной мышцы и мышцы бедра у мышей, но приводила лишь к незначительному увеличению или вообще не приводила к увеличению мышечной массы у мышей, обработанных белком FST(288)-IgG1 или FST(315)-IgG1.

На фигуре 5 проиллюстрировано влияние 4-недельной обработки мышей, проводимой путем подкожной инъекции FST(288)-IgG1 или

FST(315)-IgG1, на уровне фолликулостимулирующего гормона (FSH) в сыворотке. В качестве носителя использовали забуференный трисом физиологический раствор. Данные представлены как среднее \pm ср. кв. откл. *, величина $P < 0,05$ была вычислена по сравнению с TBS-группой с помощью непарного t -критерия. FST(315)-IgG1-обработка приводила к значительному снижению уровней FSH в сыворотке по сравнению с уровнями, наблюдаемыми у контрольных мышей, обработанных носителем. В противоположность этому, FST(288)-IgG1-обработка не оказывала какого-либо влияния на уровни FSH в сыворотке.

На **фигуре 6** проиллюстрировано влияние 4-недельной обработки мышей два раза в неделю белками FST(288)-Fc, FST(315)-Fc или ActRIIB-Fc на массу истощенной ткани у мышей. В качестве носителя использовали забуференный трисом физиологический раствор. Данные представлены как среднее \pm ср. кв. откл. *, величина $P < 0,05$ была вычислена по сравнению с TBS-группой с помощью непарного t -критерия. Обработка белком ActRIIB-Fc приводила к значительному увеличению массы истощенной ткани по сравнению с контрольными мышцами, обработанными носителем. Увеличения массы истощенной ткани у мышей, обработанных FST(288)-IgG1 или FST(315)-IgG1, не наблюдалось.

На **фигуре 7** проиллюстрировано влияние 4-недельной обработки мышей, проводимой два раза в неделю путем внутримышечной инъекции белками FST(288)-IgG1, FST(315)-IgG1 или ActRIIB-Fc в правую икроножную мышцу, на массу икроножной мышцы у мышей. В качестве носителя использовали забуференный трисом физиологический раствор. Данные представлены как среднее \pm ср. кв. откл. *, величина $P < 0,05$ была вычислена по сравнению с TBS-группой с помощью непарного t -критерия. #, величина $P < 0,05$ была вычислена для правой икроножной мышцы, в которую вводили инъекцию, по сравнению с левой икроножной мышцей, в которую не вводили инъекцию, с помощью непарного t -критерия. Обработка белками FST(288)-IgG1, FST(315)-IgG1 и ActRIIB-mFc приводила к значительному увеличению массы правой икроножной мышцы, в которую вводили инъекцию. ActRIIB-mFc-обработка также приводила

к значительному увеличению массы левой икроножной мышцы, в которую не вводили инъекцию. В противоположность этому, у мышей, обработанных белком FST(288)-IgG1 или FST(315)-IgG1, какого-либо увеличения массы левой икроножной мышцы, в которую не вводили инъекцию, не наблюдалось.

На **фигуре 8** проиллюстрировано влияние 3-недельной обработки мышей, проводимой два раза в неделю путем внутримышечной инъекции различных доз FST(288)-IgG1 в правую икроножную мышцу, на массу икроножной мышцы у мышей, и результаты выражали как отношение к величинам, полученным для левой икроножной мышцы, в которую не вводили инъекцию. В качестве носителя использовали забуференный трисом физиологический раствор. Данные представлены как среднее \pm ср. кв. откл. *, величина $P < 0,05$ была вычислена по сравнению с PBS-группой с помощью непарного t-критерия. Увеличение доз FST(288)-IgG1 приводило к повышению гипертрофии икроножной мышцы, в которую вводили инъекцию, по сравнению с мышцей, в которую не вводили инъекцию.

На **фигуре 9** проиллюстрировано влияние 4-недельной обработки мышей, проводимой два раза в неделю путем внутримышечной инъекции различных доз FST(291)-IgG1 в левую икроножную мышцу. В качестве носителя использовали забуференный трисом физиологический раствор. Данные представлены как среднее \pm ср. кв. откл. *, величина $P < 0,05$ была вычислена по сравнению с PBS-группой с помощью непарного t-критерия. Внутримышечное введение FST(291)-IgG2 приводило к значительному увеличению массы икроножной мышцы, в которую вводили инъекцию, по сравнению с массой мышцы, в которую не вводили инъекцию, и по сравнению с контролем.

Подробное описание изобретения

1. Общий обзор

В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к фоллистатиновым полипептидам. Используемый здесь термин «фоллистатин» означает семейство фоллистатиновых (FST) белков и родственных фоллистатину белков, происходящих от организмов любого вида. Фоллистатин представляет собой аутокринный

гликопротеин, которые экспрессируется почти во всех тканях высших животных. Впервые он был выделен из фолликулярной жидкости и идентифицирован как белковая фракция, которая ингибирует секрецию фолликулостимулирующего гормона (FSH) из передней доли гипофиза, а поэтому он был назван FSH-ингибирующим белком (FSP). Впоследствии было определено, что основная его функция заключается в связывании и нейтрализации членов суперсемейства TGF- β , включающего, например, активин, то есть, паракринный гормон, усиливающий секрецию FSH в передней доле гипофиза.

Используемый здесь термин «фоллистатиновый полипептид» означает полипептиды, включая любой природный полипептид, принадлежащий к семейству фоллистатинов, а также любые его варианты (включая мутанты, фрагменты, гибриды и пептидомиметики), которые сохраняют нужную активность, включая, например, активность связывания с лигандом (например, миостатином, GDF-11, активином А, активином В) или с гепарином. Так, например, фоллистатиновые полипептиды включают полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, происходящую от последовательности любого известного фоллистатина, имеющего последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, а предпочтительно, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или более идентична последовательности фоллистатинового полипептида. Термин «фоллистатиновый полипептид» может означать гибридные белки, содержащие любые вышеупомянутые полипептиды вместе с гетерологичной (не-фоллистатиновой) частью. Считается, что аминокислотная последовательность гетерологична фоллистатину, если только она не является более длинной формой (315 аминокислот) человеческого фоллистатина, представленного SEQ ID NO:3. В настоящей заявке представлено много примеров гетерологичных частей, и такие гетерологичные части могут быть непосредственно присоединены посредством аминокислотной последовательности к фоллистатиновой полипептидной части гибридного белка или разделены промежуточной аминокислотной последовательностью, такой как линкер или другая

последовательность.

Фоллистатин представляет собой одноцепочечный полипептид с молекулярной массой в пределах от 31 до 49 кДа, образующийся в результате альтернативного сплайсинга мРНК и варибельного гликозилирования белка. Альтернативно сплайсированные мРНК кодируют два белка, состоящих из 315 аминокислот (то есть, FST315) и 288 аминокислот (то есть, FST288); а фоллистатин 315 может также подвергаться протеолитическому расщеплению с образованием фоллистатина 303 (FST303). Анализ аминокислотной последовательности показал, что нативный человеческий фоллистатиновый полипептид содержит пять доменов (начиная с N-конца), а именно: пептидную сигнальную последовательность (аминокислоты 1-29 SEQ ID NO:1), N-концевой домен (FSN) (аминокислоты 30-94 SEQ ID NO:1), фоллистатиновый домен I (FSDI) (аминокислоты 95-164 SEQ ID NO:1), фоллистатиновый домен II (FSDII) (аминокислоты 168-239 SEQ ID NO:1) и фоллистатиновый домен III (FSDIII) (аминокислоты 245-316 SEQ ID NO:1). См. PNAS, U.S.A., 1988, Vol. 85, No 12, pp 4218-4222.

Предшественник человеческого фоллистатина-288 (FST288) имеет нижеследующую аминокислотную последовательность, где сигнальный пептид показан жирным шрифтом, N-концевой домен (FSN) подчеркнут одной чертой, а фоллистатиновые домены I-III (FSI, FSII, FSIII) подчеркнуты двойной чертой.

MVRARHQPGGLCLLLLLLQCQFMEDRSAQAAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTG
RLSTSWTEEDVNDNTLQKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCS
NITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNA
YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT
GGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSDPEVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGS
CN (SEQ ID NO:1).

Процессированный (зрелый) вариант человеческого фоллистатина FST(288) имеет нижеследующую аминокислотную последовательность, где N-концевой домен подчеркнут одной чертой, а фоллистатиновые домены I-III подчеркнуты двойной чертой. Кроме того, следует отметить, что любые начальные аминокислоты G или N, находящиеся перед первым цистеином, могут быть удалены путем процессинга или искусственно элиминированы без каких-либо

последствий, а также могут быть включены полипептиды, содержащие такие менее крупные полипептиды.

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNC
IPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKE
QPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS
ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSD
EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCN (SEQ ID NO:2).

Предшественник человеческого фоллистатина-315 (FST315) имеет нижеследующую аминокислотную последовательность, где сигнальный пептид показан жирным шрифтом, N-концевой домен (FSN) подчеркнут одной чертой, а фоллистатиновые домены I-III (FSI, FSII, FSIII) подчеркнуты двойной чертой (NCBI, регистрационный номер ААН04107.1; 344 аминокислоты).

MVRARHQPGGLCLLLLLLQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTG
RLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCS
NITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNA
YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT
GGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGS
CNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSELEW (SEQ ID NO:3).

Процессированный (зрелый) человеческий FST(315) имеет нижеследующую аминокислотную последовательность, где N-концевой домен подчеркнут одной чертой, а фоллистатиновые домены I-III подчеркнуты двойной чертой. Кроме того, следует отметить, что любые начальные аминокислоты G или N, находящиеся перед первым цистеином, могут быть удалены путем процессинга или искусственно элиминированы без каких-либо последствий, а также могут быть включены полипептиды, содержащие такие менее крупные полипептиды.

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNC
IPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKE
QPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS
ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSD
EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSELEW
 (SEQ ID NO:4).

Фоллистатиновые полипептиды согласно изобретению могут включать любой природный домен фоллистатинового белка, а также

его варианты (включая мутанты, фрагменты и пептидомиметики), которые сохраняют нужную активность. Так, например, хорошо известно, что FST(315) и FST(288) обладают высокой аффинностью связывания с активином (активином А и активином В) и миостатином (и близкородственным GDF11), при этом, считается, что фоллистатиновые домены (например, FSN и FSD I-III) участвуют в связывании лигандов TGF- β . Однако, очевидно, что каждый из этих трех доменов может обладать различными аффинностями связывания с этими лигандами TGF- β . Так, например, недавно проведенные исследования показали, что полипептидные конструкции, содержащие только N-концевой домен (FSN) и два домена FSDI в тандеме, сохраняют высокую аффинность связывания с миостатином и низкую аффинность связывания с активином или вообще не обладают аффинностью связывания с активином, а также стимулируют рост мышц всего организма при введении таких полипептидных конструкций мышам посредством генной экспрессии (Nakatani *et al.*, The FASEB Journal, Vol. 22477-487 (2008)).

Кроме того, домен FSDI содержит гепарин-связывающий домен человеческого фоллистатина, который имеет аминокислотную последовательность KKCRMNKKNKPR (SEQ ID NO: 5). Этот гепарин-связывающий домен может быть представлен как BVXBXXBVXBVB (SEQ ID NO:6), где «В» означает основную аминокислоту, а в частности, лизин (K) или аргинин (R). В соответствии с этим, настоящее изобретение, в частности, охватывает варианты фоллистатиновых белков, которые, в отличие от природного белка FST, обладают способностью селективно связываться с данным лигандом TGF- β и/или ингибировать этот лиганд (например, сохранять высокую аффинность связывания с миостатином и значительно более низкую аффинность связывания с активином).

В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение включает полипептиды, содержащие домен FSN, указанный ниже, и, например, один или более гетерологичных полипептидов, и при этом, следует отметить, что любая из начальных аминокислот G или N, находящихся перед первым цистеином, могут быть делетированы, как показано, например, ниже (SEQ ID NO:8).

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKET (SEQ ID NO:7).

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKET (SEQ ID NO:8).

В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к полипептидам, содержащим домен FSDI, включающий минимальные активные центры, связывающиеся с миостатином (и/или GDF11), а также с гепарином, как показано ниже, и, например, один или более гетерологичных полипептидов.

CENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRC (SEQ ID NO:9).

Последовательность FSDI может преимущественно сохраняться в соответствующем структурном окружении благодаря его экспрессии как полипептида, который также содежит домен FSN. В соответствии с этим, настоящее изобретение относится к полипептидам, содержащим последовательность FSN-FSDI, представленную ниже (SEQ ID NO:10), и, например, один или более гетерологичных полипептидов, и при этом, следует отметить, что любые начальные аминокислоты G или N, находящиеся перед первым цистеином, могут быть удалены путем процессинга или искусственно элиминированы без каких-либо последствий, а также могут быть включены полипептиды, содержащие такие менее крупные полипептиды.

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRC (SEQ ID NO:10).

Как продемонстрировано в публикации Nakani et al., конструкция FSN-FSDI-FSDI является достаточной для инициации роста мышц всего организма в том случае, если эта конструкция генетически экспрессируется у мышей, и в соответствии с этим, настоящее изобретение относится к полипептидам, содержащим аминокислотные последовательности, представленные ниже, и, например, один или более гетерологичных полипептидов.

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRC (SEQ ID NO:11).

Хотя последовательность FSDI сообщает активность связывания с миостатином и GDF11, однако, было продемонстрировано, что активины, а в частности, активин А, а также активин В, также представляют собой негативные регуляторы мышц, а поэтому фоллистатиновый полипептид, который ингибирует группу миостатин/GDF11 и группу активин А/активин В, может сообщать более сильный мышечный эффект. Кроме того, принимая во внимание представленные здесь данные исследования, указывающие на низкую системную доступность некоторых фоллистатиновых полипептидов, а в частности, полипептидов, содержащих гепарин-связывающий домен, а более конкретно, полипептидов в гомодимерной форме, такой как Fc-гибрид, можно решить проблемы безопасности, связанные с известным негативным влиянием ингибирования активина на функционирование репродуктивной системы и других тканей. Если учесть тот факт, что FSDII сообщает активность связывания с активинами А и В, то в настоящее изобретение могут быть включены полипептиды, содержащие FSDI и FSDII (SEQ ID NO:12), а также конструкции FSN-FSDI-FSDII (SEQ ID NOS: 13) и, например, один или более гетерологичных полипептидов.

CENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQ
PELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSA
CHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC (SEQ ID NO:12).

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWMI FNGGAPNCIP
CKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQP
ELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSAC
HLRKATCLLGRSIGLAYEGKC (SEQ ID NO:13).

Как описано в Примерах, фоллистатиновый полипептид, состоящий из 291 аминокислоты (и представляющий собой природный усеченный FST-315), обладает преимущественными свойствами. В соответствии с этим, настоящее изобретение включает непротессированный (SEQ ID NO: 14) и зрелый полипептиды FST(291) (SEQ ID NO: 15), которые могут быть объединены с гетерологичными белками. Кроме того, следует отметить, что любые начальные аминокислоты G или N, находящиеся перед первым цистеином, могут быть удалены путем процессинга или искусственно элиминированы без каких-либо последствий, а также могут быть включены

полипептиды, содержащие менее крупные полипептиды, такие как, например, полипептиды, представленные ниже (SEQ ID NO:16).

MVRARHQPGGLCLLLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTG
RLSTSWTEEDVNDNTLQFKWMI FNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCS
NITWKG P VCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNA
YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT
GGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSDPEVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVVKHSGS
CNSIS (SEQ ID NO:14).

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLQFKWMI FNGGAPNC
IPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKG P VCGLDGKTYRNECALLKARCKE
QPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNA YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS
ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSD
EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVVKHSGSCNSIS (SEQ ID NO:15).

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLQFKWMI FNGGAPNCIP
CKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKG P VCGLDGKTYRNECALLKARCKEQ
PELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNA YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSAC
HLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSDPE
VCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVVKHSGSCNSIS (SEQ ID NO:16).

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к ингибированию лиганда фоллистатина (также называемого фоллистатиновым лигандом) под действием рассматриваемого фоллистатинового полипептида (например, гибридного полипептида FST-IgG). Таким образом, композиции и способы согласно изобретению могут быть применены для лечения расстройств, ассоциированных с аномальной активностью одного или более лигандов фоллистатина. Репрезентативными лигандами фоллистатина являются некоторые члены семейства TGF- β , такие как активин А, активин В, миостатин (GDF8) и GDF11.

Описанные здесь фоллистатиновые белки могут здесь обозначаться как FST. Если за этим обозначением стоит цифра, например, FST(288), то это означает, что белок представляет собой фоллистатин, имеющий 288 аминокислот. Если этот белок имеет обозначение FST(288)-Fc, то это указывает на то, что С-концевой Fc присоединен к FST(288), и такой белок может содержать, а может и не содержать промежуточный линкер. В этом

случае, Fc может представлять собой любую Fc-часть иммуноглобулина, определенную в настоящей заявке. Если этот белок имеет обозначение FST(288)-IgG2, то это указывает на то, что C-концевой Fc присоединен к FST(288) Fc-части человеческого IgG2.

Активины представляют собой димерные полипептидные факторы роста и принадлежат к суперсемейству TGF- β . Существует три вида активинов (A, B и AB), которые представляют собой гомо/гетеродимеры, состоящие из двух близкородственных β -субъединиц ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$ и $\beta_A\beta_B$). Были идентифицированы и другие активины C и E, хотя функции этих белков пока еще точно неизвестны. Активины, принадлежащие к суперсемейству TGF- β , представляют собой уникальные и многофункциональные факторы, которые могут стимулировать продуцирование гормонов в клетках яичника и плаценты; поддерживать выживаемость нейронов; позитивно или негативно влиять на прохождение клеточного цикла в зависимости от типа клеток; и индуцировать дифференцировку мезодермы по меньшей мере в эмбрионах амфибий (DePaolo et al., 1991, Proc. SocExp. 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 фактор дифференцировки эритроидов (EDF), выделенный из стимулированных клеток человеческого моноцитарного лейкоза, идентичен активину A (Murata et al., 1988, PNAS, 85:2434). Было высказано предположение, что активин A действует как природный регулятор эритропоэза в костном мозге. В некоторых тканях, передача сигнала активина подавляется родственным ему гетеродимером, то есть, ингибином. Так, например, в процессе высвобождения фолликулостимулирующего гормона (FSH) из гипофиза, активин стимулирует секрецию и синтез FSH, а ингибин предотвращает секрецию и синтез FSH. Активин также рассматривается как негативный регулятор мышечной массы и функции, а антагонисты активина могут стимулировать мышечный рост или предотвращать потерю мышечной массы *in vivo*. Link and Nishi, Exp. Cell. Res. 1997 Jun 15;233(2):350-62; He et al., Anat. Embryol. (Berl).

2005 Jun;209(5):401-7; Souza et al. Mol. Endocrinol. 2008 Dec;22(12):2689-702; Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2009 Jul;297(1):E157-64; Gilson et al. Zhou et al. Cell. 2010 Aug. 20;142(4):531-43.

Фактор роста и дифференцировки-8 (GDF8) также известен как миостатин. GDF8 представляет собой негативный регулятор массы скелетных мышц. GDF8 в высокой степени экспрессируется в скелетной мышце на стадии развития организма и у взрослых. У трансгенных мышей, GDF8 с нулевой мутацией ассоциируется с тяжелой гипертрофией и гиперплазией скелетной мышцы (McPherron et al., Nature, 1997, 387:83-90). Аналогичное увеличение массы скелетных мышц наблюдается у крупного рогатого скота с природными мутациями GDF8 (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; и Kambadur et al., Genome Res., 1997, 7:910-915), и что удивительно, у человека (Schuelke et al., N. Engl. J. Med. 2004;350:2682-8). Исследования также показали, что истощение мышц, ассоциированное с ВИЧ-инфекцией у человека, сопровождается повышением уровня экспрессии белка GDF8 (Gonzalez-Cadavid et al., PNAS, 1998, 95:14938-43). Кроме того, GDF8 может модулировать продуцирование мышцеспецифичных ферментов (например, креатин-киназы) и модулировать пролиферацию миобластов (WO 00/43781). Пропептид GDF8 может нековалентно связываться со зрелым димером домена GDF8, что приводит к инактивации его биологической активности (Miyazono et al. (1988) J. Biol. Chem., 263: 6407-6415; Wakefield et al. (1988) J. Biol. Chem., 263; 7646-7654; and Brown et al. (1990) Growth Factors, 3: 35-43). Другими белками, которые связываются с GDF8 или со структурно родственными белками и ингибируют их биологическую активность, являются фоллистатин и, возможно, родственные фоллистатину белки (Gamer et al. (1999) Dev. Biol., 208: 222-232).

Термины, используемые в описании настоящей заявки, имеют свои общепринятые значения, обычно употребляемые в литературе, в контексте настоящего изобретения и в конкретном контексте, где

используется каждый из этих терминов. Для лучшего понимания описания композиций согласно изобретению и способов их получения и применения, ниже или в других разделах данного описания объясняются некоторые термины. Объем или значения употребляемых здесь терминов будут понятны специалистам из конкретного контекста описания, в котором используются данные термины.

Термины «около» и «приблизительно», по существу, означают приемлемую величину ошибки при количественных измерениях с учетом способа или точности измерений. Обычно, репрезентативные величины ошибки составляют в пределах 20 процентов (%), предпочтительно, в пределах 10%, а более предпочтительно, в пределах 5% от данной величины или интервала величин.

Альтернативно, а в частности, в биологических системах, термины «около» и «приблизительно», могут иметь значения, которые находятся в пределах порядка величины, предпочтительно в пределах значений, которые 5-кратно, а более предпочтительно, 2-кратно превышают данную величину. Представленные здесь численные величины являются приблизительными, если это не оговорено особо, и это означает, что термины «около» и «приблизительно» могут иметь предположительные значения, если это не указано точно.

Способы согласно изобретению могут включать стадии сравнения двух последовательностей, включая сравнение последовательности дикого типа с одной или более последовательностями мутантов (вариантов последовательностей). Такие сравнения обычно включают выравнивание полимерных последовательностей, например, с использованием программ и/или алгоритмов выравнивания последовательностей, хорошо известных специалистам (например, BLAST, FASTA и MEGALIGN, помимо всех прочих). Для специалиста в данной области совершенно очевидно, что при выравнивании последовательностей, где мутация представляет собой инсерцию или делецию остатка, такое выравнивание предусматривает введение «пробела» (обычно представленного черточкой или буквой «A») в полимерную последовательность, не содержащую встроенного или делетированного остатка.

Термин «гомологичный», используемый во всех его

грамматических формах и вариантах написания, указывает на «общее эволюционное происхождение» двух белков, включая белки, принадлежащие к суперсемействам, происходящим от организмов одного и того же вида, а также гомологичные белки, происходящие от организмов различных видов. Такие белки (и кодирующие их нуклеиновые кислоты) имеют гомологичные последовательности, на что указывает сходство их последовательностей, независимо от процента идентичности или независимо от того, присутствуют ли в этих последовательностях специфические остатки, мотивы или консервативные положения. Однако, термин «гомологичный», используемый в общепринятом смысле и в описании настоящей заявки, вместе с наречием, таким как «в высокой степени», может означать сходство последовательностей и может указывать, а может и не указывать, на их общее эволюционное происхождение.

Термин «сходство последовательностей», используемый во всех его грамматических формах, означает степень идентичности или соответствия последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей, которые могут иметь, а могут и не иметь, общее эволюционное происхождение.

2. Фоллистатиновые полипептиды

В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к фоллистатиновым полипептидам (например, к полипептидам FST-Fc), а в частности, к усеченным формам, представленным полипептидами, содержащими SEQ ID NO: 2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16, и их вариантам. Фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы имеют, но необязательно, подобную, одинаковую или улучшенную биологическую активность по сравнению с соответствующей активностью фоллистатиновых полипептидов дикого типа. Так, например, фоллистатиновый вариант согласно изобретению может связываться с лигандом фоллистатина (например, активином А, активином АВ, активином В и GDF8) и ингибировать его функцию. Фоллистатиновый полипептид модулирует, но необязательно, рост тканей, а в частности, мышц. Примерами фоллистатиновых полипептидов являются полипептиды, содержащие, состоящие или, по существу, состоящие из них: аминокислотные последовательности любых SEQ ID NN. 1-16 и 26-43, а также

полипептиды, содержащие, состоящие или, по существу, состоящие из них: аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны аминокислотной последовательности любых SEQ ID NN. 1-16 и 26-43. Варианты этих полипептидов могут быть получены в соответствии с нижеследующими руководствами. Нумерация аминокислот в фоллистатиновых полипептидах начинается с последовательности SEQ ID NO:1, независимо от того, присутствует ли нативная лидерная последовательность или нет.

Как описано выше, фоллистатин характеризуется тремя цистеин-богатыми областями (то есть, FS-доменами I-III), которые, очевидно, опосредуют связывание фоллистатина с лигандом. Кроме того, исследования продемонстрировали, что полипептидные конструкции, содержащие только один из трех FS-связывающих доменов (например, FSDI), сохраняют сильную аффинность по отношению к некоторым лигандам фоллистатина (например, к миостатину) и являются биологически активными *in vivo*. См. Nakatani *et al.*, The FASEB Journal, Vol. 22477-487 (2008). Поэтому, варианты фоллистатиновых полипептидов согласно изобретению могут содержать одну или более активных частей фоллистатинового белка. Так, например, конструкции согласно изобретению могут начинаться с остатка, соответствующего аминокислотам 30-95 SEQ ID NO:1 и заканчиваться в положении, соответствующем аминокислотам 316-344 SEQ ID NO:1. Другими примерами являются конструкции, которые начинаются в положении, соответствующем аминокислотам 30-95 SEQ ID NO:1 и заканчиваются в положении, соответствующем аминокислотам 164-167 или 238-244. Другие примеры могут включать любые из последовательностей SEQ ID NN. 7-16.

Описанные здесь фоллистатиновые варианты могут быть объединены друг с другом или с гетерологичными аминокислотными последовательностями различными способами. Так, например, варианты фоллистатиновых белков согласно изобретению включают полипептиды, содержащие один или более доменов FS, выбранных из FSDI (аминокислоты 95-164 SEQ ID NO:1 (то есть, SEQ ID NO:2), FSDII (аминокислоты 168-239 SEQ ID NO:1) или FSDIII

(аминокислоты 245-316 SEQ ID NO:1), а также белки, содержащие один или более доменов FS, выбранных из последовательностей, которые по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны FSDI (аминокислоты 95-164 SEQ ID NO:1 (то есть, SEQ ID NO:2), FSDII (аминокислоты 168-239 SEQ ID NO:1) или FSDIII (аминокислоты 245-316 SEQ ID NO:1). Эти FS-домены могут быть объединены в любом порядке в варианте фоллистатинового полипептида согласно изобретению при условии, что такие рекомбинантные белки могут сохранять нужную активность, включая, например, активность связывания с лигандом фоллистатина (например, с миостатином) и биологическую активность (например, способность индуцировать увеличение мышечной массы или мышечной силы). Примерами таких вариантов фоллистатиновых полипептидов являются, например, полипептиды, имеющие доменные структуры, такие как FSDI-FSDII-FSDIII, FSDI-FSDIII, FSDI-FSDI-FSDIII, FSDI-FSDII, FSDI-FSDI, FSN-FSDI-FSDII-FSDIII, FSN-FSDI-FSDII, FSN-FSDI-FSDI, FSN-FSDI-FSDIII, FSN-FSDI-FSDI-FSDIII, и полипептиды, полученные путем присоединения других гетерологичных полипептидов к N-концу или C-концу этих полипептидов. Эти домены могут быть связаны непосредственно или посредством линкерного полипептида. Полипептидные линкеры могут представлять собой, но необязательно, любую последовательность и могут содержать 1-50, предпочтительно, 1-10, а более предпочтительно, 1-5 аминокислот. В некоторых аспектах изобретения, предпочтительные линкеры содержат аминокислоты, не являющиеся цистеинами.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фоллистатиновые варианты согласно изобретению обладают пониженной аффинностью связывания с одним или более лигандами фоллистатина, или вообще не обладают такой аффинностью. В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к фоллистатиновым вариантам, которые обладают пониженной аффинностью связывания с активинном, или вообще не обладают такой аффинностью. В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к фоллистатиновым вариантам, которые обладают пониженной аффинностью связывания с активинном, или вообще не

обладают такой аффинностью, но сохраняют высокую аффинность связывания с миостатином.

В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к фоллистатиновым вариантам, которые не содержат последовательность, соответствующую домену FSDII или функционально активному домену FSDII. Так, например, фоллистатиновые полипептиды согласно изобретению могут включать вариант, полученный путем частичной или полной делеции домена FSDII. В некоторых аспектах изобретения, такие фоллистатиновые варианты имеют делецию одного или более цистеиновых остатков в области FSDII или замену не-цистеиновыми аминокислотами.

Фоллистатиновые белки согласно изобретению могут содержать сигнальную последовательность. Сигнальной последовательностью может быть нативная сигнальная последовательность фоллистатинового белка (например, аминокислоты 1-29 SEQ ID NO:1) или сигнальная последовательность другого белка, такая как сигнальная последовательность тканевого активатора плазминогена (ТРА) или сигнальная последовательность меллитина пчелиного меда (НВМ).

К фоллистатиновому полипептиду могут быть присоединены дополнительные сайты N-связанного гликозилирования (N-X-S/T), что может приводить к увеличению времени полужизни гибридного белка FST-Fc в сыворотке. Последовательности N-X-S/T могут быть, в основном, введены в положения, находящиеся за пределами лиганд-связывающего «кармана». Последовательности N-X-S/T могут быть введены в линкер между фоллистатиновой последовательностью и Fc или другого компонента гибрида. Такой сайт без каких-либо усилий может быть введен путем включения N в соответствующее положение по отношению к уже существующим S или T, или путем включения S или T в соответствующее положение по отношению к уже существующему N. Любой S, который, предположительно, является гликозилированным, может быть заменен на T без создания иммуногенного сайта, поскольку защита обеспечивается гликозилированием. Аналогичным образом, любой T, который, предположительно, является гликозилированным, может быть заменен на S. В соответствии с этим, фоллистатиновый вариант может

включать одну или более дополнительных не-эндогенных консенсусных последовательностей N-связанного гликозилирования.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рассматривается получение функциональных вариантов путем модификации структуры фоллистатинового полипептида в целях повышения терапевтической эффективности или стабильности (например, повышения срока хранения *ex vivo* и повышения резистентности к протеолитическому расщеплению *in vivo*). Модифицированные фоллистатиновые полипептиды могут быть также получены, например, путем аминокислотных замен, делеций или добавлений. Так, например, есть основания предположить, что отдельная замена лейцина на изолейцин или валин, аспартата на глутамат, треонина на серин или аналогичная замена аминокислоты структурно родственной аминокислотой (например, консервативные замены) не будут оказывать значительного влияния на биологическую активность полученной молекулы. Консервативными заменами являются замены аминокислот одного семейства, которые имеют родственные боковые цепи. Тот факт, что замена в аминокислотной последовательности фоллистатинового полипептида приводит к образованию функционального гомолога, может быть легко подтвержден путем оценки способности варианта фоллистатинового полипептида вырабатывать ответ в клетках по механизму, аналогичному ответу, продуцируемому фоллистатиновым полипептидом дикого типа, или связываться с одним или более лигандами, такими как активин или миостатин, по механизму, аналогичному механизму, осуществляемому фоллистатином дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рассматриваются специфические мутации фоллистатиновых полипептидов, вводимые в целях модификации гликозилирования полипептида. Такие мутации могут быть выбраны так, чтобы они обеспечивали введение или элиминацию одного или более сайтов гликозилирования, таких как сайты O-связанного или N-связанного гликозилирования. Сайты распознавания аспарагин-связанного гликозилирования обычно включают трипептидную последовательность «аспарагин-X-треонин» (где «X» означает любую аминокислоту),

которая специфически распознается соответствующими клеточными ферментами гликозилирования. Модификация может быть также осуществлена путем добавления одного или более сериновых или треониновых остатков или замены этими остатками в последовательности фоллистатинового полипептида дикого типа (для сайтов O-связанного гликозилирования). Различные аминокислотные замены или делеции в одном первом или третьем или в обоих аминокислотных положениях сайта распознавания гликозилирования (и/или аминокислотная делеция во втором положении) приводит к устранению гликозилирования в модифицированной трипептидной последовательности. Другим способом увеличения числа углеводных групп на фоллистатиновом полипептиде является химическое или ферментативное присоединение гликозидов к фоллистатиновому полипептиду. В зависимости от применяемого способа присоединения, сахар(а) может (могут) быть присоединен(ы) к (а) аргинину и гистидину; (b) свободным карбоксильным группам; (c) свободным гидрильным группам, таким как цистеиновые группы; (d) свободным гидроксильным группам, таким как сериновые, треониновые или гидроксипролиновые группы; (e) ароматическим остаткам, таким как фенилаланин, тирозин или триптофан; или (f) амидной группе глутамина. Эти методы описаны в заявке WO 87/05330, опубликованной 11 сентября 1987, и в публикации Arlin and Wriston (1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306, которые вводятся в настоящее описание посредством ссылки. Удаление одной или более углеводных групп, присутствующих на полипептиде ActRIIB, может быть осуществлено химическим и/или ферментативным методом. Химическое дегликозилирование может включать, например, обработку фоллистатинового полипептида соединением трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентным соединением. Такая обработка приводит к расщеплению большинства или всех сахаров, за исключением линкерного сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), при этом, аминокислотная последовательность остается интактной. Химическое дегликозилирование также описано в публикации Hakimuddin et al. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 и Edge et al. (1981) *Anal. Biochem.* 118:131. Ферментативное расщепление углеводных групп на

фоллистатиновых полипептидах может быть достигнуто с использованием ряда эндо- и экзо-гликозидаз как описано Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. Последовательность фоллистатинового полипептида может быть скорректирована, если это необходимо, в зависимости от типа используемой экспрессионной системы, поскольку клетки млекопитающих, дрожжей, насекомых и растений могут иметь различные паттерны гликозилирования, на которые могут влиять аминокислотные последовательности пептида. Вообще говоря, фоллистатиновые белки, используемые для введения человеку, могут быть экспрессированы в клеточной линии млекопитающих, которая имеет нужный паттерн гликозилирования, такая как клеточная линия НЕК293 или СНО, хотя предполагается, что могут быть также использованы и другие экспрессионные клеточные линии млекопитающих.

В настоящем изобретении также рассматривается способ получения вариантов, а в частности, наборов комбинаторных вариантов фоллистатинового полипептида, включая, но необязательно, усеченные варианты, где пулы комбинаторных мутантов являются особенно подходящими для идентификации последовательностей функциональных вариантов. Целью скрининга таких комбинаторных библиотек может быть, например, получение вариантов фоллистатинового полипептида, имеющих модифицированные свойства, такие как модифицированные фармакокинетические свойства или модифицированная активность связывания с лигандом. Ниже описан ряд скрининг-анализов, и такие анализы могут быть проведены для оценки вариантов. Так, например, вариант фоллистатинового полипептида может быть скринирован на его способность связываться с фоллистатиновым полипептидом и предупреждать связывание лиганда фоллистатина с фоллистатиновым полипептидом.

Активность фоллистатинового полипептида или его вариантов может быть также протестировано в клеточном анализе или в анализе *in vivo*. Так, например, может быть оценено влияние варианта фоллистатинового полипептида на экспрессию генов, участвующих в формировании мышц. Это может быть осуществлено,

если это необходимо, в присутствии одного или более рекомбинантных белков-лигандов фоллистатина (например, активина А), и клетки могут быть трансфецированы так, чтобы они продуцировали фоллистатиновый полипептид и/или его варианты, и необязательно, лиганд фоллистатина. Аналогичным образом, фоллистатиновый полипептид может быть введен мышам или другим животным, а затем могут быть оценены одно или более свойств мышц, таких как мышечная масса или мышечная сила. Такие анализы хорошо известны и являются рутинными процедурами. В таких клеточных линиях, для мониторинга влияния на дальнейшую передачу сигнала может быть использован репортерный ген-респондер.

Могут быть получены комбинаторные варианты, обладающие селективной активностью по сравнению с природным фоллистатиновым полипептидом. Такие варианты белков, если они экспрессируются из рекомбинантных конструкций ДНК, могут быть использованы в протоколах генотерапии. Аналогичным образом, в результате мутагенеза могут быть получены варианты, которые имеют внутриклеточное время полужизни, резко отличающееся от времени полужизни соответствующего фоллистатинового полипептида дикого типа. Так, например, модифицированный белок может сообщать большую или меньшую стабильность к протеолитическому расщеплению или инициировать другие процессы, приводящие к деструкции или к какой-либо другой инактивации нативного фоллистатинового полипептида. Такие варианты и гены, кодирующие эти варианты, могут быть использованы для изменения уровней фоллистатинового полипептида путем модуляции времени полужизни фоллистатиновых полипептидов. Так, например, чем короче время полужизни, тем более кратковременными являются биологические эффекты, и, если использовать индуцибельную экспрессионную систему, то можно осуществлять более жесткую регуляцию рекомбинантных уровней фоллистатинового полипептида в клетке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фоллистатиновые полипептиды согласно изобретению могут также включать, помимо модификаций, которые обычно присутствуют в фоллистатиновых полипептидах, посттрансляционные модификации. Такими модификациями являются, но не ограничиваются ими,

ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, липидизация и ацилирование. В результате этого, модифицированные фоллистатиновые полипептиды могут содержать не-аминокислотные элементы, такие как полиэтиленгликоли, липиды, поли- или моносахарид и фосфаты. Влияние таких не-аминокислотных элементов на функциональные свойства фоллистатинового полипептида могут быть протестированы как описано в настоящей заявке для других вариантов фоллистатинового полипептида. Если фоллистатиновый полипептид продуцируется в клетках в результате расщепления растущей формы фоллистатинового полипептида, то посттрансляционный процессинг может также играть важную роль в правильной укладке белка и/или в сообщении ему нужной функции. Различные клетки (такие как CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 или HEK293) обладают специфическими клеточными и характеристическими механизмами, ответственными за сообщение таких посттрансляционных активностей, а поэтому, они могут быть выбраны для гарантии правильной модификации и процессинга фоллистатиновых полипептидов.

В некоторых аспектах изобретения, функциональными вариантами или модифицированными формами фоллистатиновых полипептидов являются гибридные белки, имеющие по меньшей мере часть фоллистатинового полипептида и один или более гибридных доменов. Хорошо известными примерами таких гибридных доменов являются, но не ограничиваются ими, полигистидин, Glu-Glu, глутатион-S-трансфераза (GST), тиоредоксин, белок А, G-белок, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина (например, Fc), белок, связывающийся с мальтозой (MBP), или альбумин человеческой сыворотки. Гибридный домен может быть выбран так, чтобы он сообщал желаемые свойства. Так, например, некоторые гибридные домены являются особенно подходящими для выделения гибридных белков с помощью аффинной хроматографии. Для проведения аффинной очистки используют релевантные матрицы для аффинной хроматографии, такие как смолы, конъюгированные с глутатионом, амилазой, никелем или кобальтом. Многие из таких матриц поставляются в виде «набора», такого как система очистки

Pharmacia GST и система QIAexpress™ (Qiagen), в которой используются партнеры по связыванию (HIS₆). В качестве другого примера может быть выбран гибридный домен, облегчающий детектирование фоллистатиновых полипептидов. Примерами таких детектирующих доменов являются различные флуоресцентные белки (например, GFP), а также «эпитопные метки», обычно представляющие собой короткие пептидные последовательности, для которых имеются специфичные антитела. Хорошо известными эпитопными метками, для которых имеются легко доступные специфические моноклональные антитела, являются FLAG, гемагглютинин вируса гриппа (HA) и метки с-тус. В некоторых случаях, гибридные домены имеют сайт расщепления протеазой, такой как сайт расщепления фактором Ха или тромбином, где указанный сайт позволяет релевантной протеазе частично расщеплять гибридные белки и высвобождать рекомбинантные белки из указанных белков. Затем, высвобождаемые белки могут быть выделены из гибридного домена путем хроматографического разделения. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения, фоллистатиновый полипептид присоединяют к домену, который стабилизирует этот фоллистатиновый полипептид *in vivo* («стабилизирующий домен»). Термин «стабилизирующий» относится к любому увеличению времени полужизни в сыворотке независимо от того, происходит ли это в результате снижения уровня деструкции, снижения клиренса почками или другого фармакокинетического эффекта. Известно, что гибриды, содержащие Fc-часть иммуноглобулина, сообщают белкам широкого ряда нужные фармакокинетические свойства. Аналогичным образом, присоединение к альбумину человеческой сыворотки может сообщать нужные свойства. При этом могут быть выбраны гибридные домены других типов, и такими доменами являются мультимеризующие (например, димеризующие, тетрамеризующие) домены и функциональные домены (которые сообщают дополнительную биологическую функцию, такую как дополнительная стимуляция роста мышц).

В своих конкретных примерах, настоящее изобретение относится к гибридным белкам, содержащим фоллистатиновые

полипептиды, присоединенные к полипептиду, содержащему константный домен иммуноглобулина, такой как CH1-, CH2- или CH3-домен иммуноглобулина или Fc. Fc-домены, происходящие от человеческих IgG1 и IgG2, представлены ниже (SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO:18, соответственно). Как описано в настоящей заявке, Fc-домен IgG2, IgG4 или IgG2/4 является особенно подходящим для его присоединения к фоллистатиновым полипептидам, которые сохраняют гепарин-связывающую активность, поскольку эти Fc-молекулы обладают пониженной CDC- и/или ADCC-активностью, что может оказывать негативное воздействие на клетки, к которым могут быть присоединены эти гепарин-связывающие полипептиды. В объем настоящего изобретения входят и другие мутации, которые, как известно, снижают CDC- или ADCC-активность, а в целом, в настоящее изобретение входят любые из этих вариантов, которые могут быть использованы в качестве предпочтительных компонентов гибридного фоллистатинового белка. Fc-домен SEQ ID NO:17 имеет, но необязательно, одну или более мутаций в остатках, таких как Asp-265, Lys-322 и Asn-434 (пронумерованных в соответствии с нумерацией полноразмерного IgG1). В некоторых случаях, мутантный Fc-домен, имеющий одну или более из этих мутаций (например, мутацию Asp-265), обладает пониженной способностью связываться с рецептором Fcγ по сравнению с Fc-доменом дикого типа. В других случаях, мутантный Fc-домен, имеющий одну или более из этих мутаций (например, мутацию Asn-434), обладает повышенной способностью связываться с Fc-рецептором, ассоциированным с MHC класса I (FcRN) по сравнению с Fc-доменом дикого типа.

Примеры аминокислотных последовательностей человеческих IgG1 и IgG2, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, представлены ниже:

IgG1

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:17).

IgG2

VECPCSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSAFLYSKLT
VDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:18).

Следует отметить, что различные элементы гибридных белков могут быть расположены в любом порядке, при условии, что они будут сообщать нужные функциональные свойства. Так, например, фоллистатиновый полипептид может быть расположен у С-конца по отношению к гетерологичному домену, или, альтернативно, гетерологичный домен может быть расположен у С-конца по отношению к фоллистатиновому полипептиду. Домен фоллистатинового полипептида и гетерологичный домен необязательно должны быть смежными в гибридном белке, и в С- или N-концы любого домена или между этими доменами могут быть включены дополнительные домены или аминокислотные последовательности.

Используемый здесь термин «Fc-домен иммуноглобулина» или просто «Fc» означает карбокси-концевую часть константной области цепи иммуноглобулина, а предпочтительно, константной области тяжелой цепи иммуноглобулина или ее части. Так, например, Fc-область иммуноглобулина может содержать: 1) CH1-домен, CH2-домен и CH3-домен, 2) CH1-домен и CH2-домен, 3) CH1-домен и CH3-домен, 4) CH2-домен и CH3-домен или 5) комбинацию двух или более доменов и шарнирной области иммуноглобулина. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, Fc-область иммуноглобулина содержит по меньшей мере шарнирную область иммуноглобулина, CH2-домен и CH3-домен иммуноглобулина, а предпочтительно, не содержит CH1-домена. Следует также отметить, что фоллистатиновый полипептид может содержать только один домен иммуноглобулина, такой как CH1-домен, CH2-домен или CH3-домен. Многие из этих доменов сообщают нужные фармакокинетические свойства, а также способность образовывать димеры или мультимеры высшего порядка.

В одном из вариантов осуществления изобретения, иммуноглобулины, от которых происходит константная область тяжелой цепи, принадлежат к классу IgG (Ig γ) (γ -подкласса 1, 2, 3 или 4). При этом могут быть использованы иммуноглобулины и

других классов, а именно, IgA (Ig α), IgD (Ig δ), IgE (Ig ϵ) и IgM (Ig μ). Выбор соответствующей константной области тяжелой цепи иммуноглобулина подробно обсуждается в патентах США NN. 5541087 и 5726044. Выбор последовательностей конкретной константной области тяжелой цепи иммуноглобулина некоторых классов и подклассов для достижения конкретного результата может быть осуществлен самим специалистом в данной области. Часть конструкции ДНК, кодирующей Fc-область иммуноглобулина, предпочтительно, включает по меньшей мере часть шарнирного домена, а более предпочтительно, по меньшей мере часть CH₃-домена Fc-гамма или гомологичные домены любого из IgA, IgD, IgE или IgM.

Кроме того, предполагается, что для практического применения описанных здесь способов и композиций, в константные области тяжелой цепи иммуноглобулина может быть введена аминокислотная замена или делеция. Одним из примеров является введение аминокислотных замен в верхнюю CH₂-область с получением Fc-варианта, обладающего пониженной аффинностью связывания с Fc-рецепторами (Cole *et al.* (1997) *J. Immunol.* 159:3613). Кроме того, во многих случаях, С-концевой лизин или К, может быть удален, и таким образом, в любом из описанных здесь полипептидов может отсутствовать С-концевой К, присутствующий в Fc-домене, как показано в SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фоллистатиновые полипептиды согласно изобретению содержат одну или более модификаций, способных стабилизировать фоллистатиновые полипептиды. Так, например, такие модификации увеличивают время полужизни фоллистатиновых полипептидов *in vitro*, увеличивают время полужизни фоллистатиновых полипептидов в кровотоке или снижают уровень протеолитического расщепления фоллистатиновых полипептидов. Такими стабилизирующими модификациями являются, но не ограничиваются ими, гибридные белки (включая, например, гибридные белки, содержащие фоллистатиновый полипептид и домен-стабилизатор), модификации сайта гликозилирования (включая, например, присоединение сайта гликозилирования к

фоллистатиновому полипептиду) и модификации углеводной группы (включая, например, удаление углеводных групп из фоллистатинового полипептида). В случае гибридных белков, фоллистатиновый полипептид присоединяют к домену-стабилизатору, такому как молекула IgG (например, Fc-домен). Используемый здесь термин «домен-стабилизатор» означает не только гибридный домен (например, Fc), как в случае гибридных белков, но также и небелковые модификации, такие как углеводная группа или небелковый полимер, такой как полиэтиленгликоль.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к получению доступных выделенных и/или очищенных форм фоллистатиновых полипептидов, которые могут быть выделены из других белков или, по существу, не содержат эти белки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фоллистатиновые полипептиды (немодифицированные или модифицированные) согласно изобретению могут быть получены различными хорошо известными методами. Так, например, такие фоллистатиновые полипептиды могут быть синтезированы стандартными методами химии белков, такими как методы, описанные в публикациях Bodansky, M. *Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Berlin (1993) и Grant G. A. (ed.), *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W. H. Freeman and Company, New York (1992). Кроме того, автоматические синтезаторы пептидов являются коммерчески доступными (например, Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Biosearch 9600). Альтернативно, фоллистатиновые полипептиды, их фрагменты или варианты могут быть рекомбинантно продуцированы с использованием различных экспрессионных систем (например, с использованием *E. coli*, клеток яичника китайского хомячка, клеток COS, бакуловируса), хорошо известных специалистам (также см. ниже). В другом варианте осуществления изобретения, модифицированные или немодифицированные фоллистатиновые полипептиды могут быть получены путем расщепления природных или рекомбинантно продуцированных полноразмерных фоллистатиновых полипептидов с использованием, например, протеазы, например, трипсина, термолизина, химотрипсина, пепсина или фермента, конвертирующего парные

основные аминокислоты (РАСЕ). Для идентификации сайтов протеолитического расщепления может быть проведен компьютерный анализ (с использованием коммерчески доступной программы, например, MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.). Альтернативно, такие фоллистатиновые полипептиды могут быть получены из природных или рекомбинантно продуцированных полноразмерных фоллистатиновых полипептидов стандартными методами, известными специалистам, такими как химическое расщепление (например, бромцианом, гидроксиламином).

3. Нуклеиновые кислоты, кодирующие фоллистатиновые полипептиды

В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к выделенным и/или рекомбинантным нуклеиновым кислотам, кодирующим любой из описанных здесь фоллистатиновых полипептидов. Рассматриваемые нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными. Такими нуклеиновыми кислотами могут быть молекулы ДНК или РНК. Эти нуклеиновые кислоты могут быть использованы, например, в методах получения фоллистатиновых полипептидов.

Так, например, нижеследующая последовательность кодирует природный полипептид-предшественник человеческого фоллистатина (SEQ ID NO: 19) (NCBI, регистрационный номер BC004107.2, 1032 п.о.):

```
atgggtccgscgagggcaccagccgggtgggctttgcctcctgctgctgctgctctgcca
gttcatggaggaccgcagtgcccaggctgggaactgctggctccgtcaagcgaagaacggccgc
tgccaggctcctgtacaagaccgaactgagcaaggaggagtgctgcagcaccggccggctgagca
cctcgtggaccgaggaggacgtgaatgacaacacactcttcaagtggatgattttcaacggggg
cgccsscaactgcatcccctgtaaagaacgtgtgagaacgtggactgtggacctgggaaaaaa
tgccgaatgaacaagaagaacaaccccgctgctgctgctgccccggattgttccaacatcacct
ggaaggtccagtctgctgggctggatgggaaaacctaccgcaatgaatgtgcaactcctaaaggc
aagatgtaaagagcagccagaactggaagtccagtaccaaggcagatgtaaaaagacttgctcg
gatgttttctgtccaggcagctccacatgtgtgggtggaccagaccaataatgcctactgtgtga
cctgtaatcggatttgcccagagcctgcttcctctgagcaatatctctgtgggaatgatggagt
cacctactccagtgccctgccacctgagaaaggctacctgcctgctgggcagatctattggatta
gcctatgagggaaagtgtatcaaagcaaagtcctgtgaagatatccagtgcaactggtgggaaaa
aatgtttatgggattttcaagggtgggagaggccgggtgtccctctgtgatgagctgtgccctga
```

cagtaagtcggatgagcctgtctgtgccagtgacaatgccacttatgccagcgagtgtgccatg
 aaggaagctgcctgctcctcaggtgtgctactggaagtaaagcactccggatcttgcaactcca
 ttctcgggaagacaccgaggaagaggaggaagatgaagaccaggactacagctttcctatatcttc
 tattctagagtgg.

Нижеследующая последовательность кодирует зрелый полипептид
 FST(315) (SEQ ID NO: 20):

gggaactgctggctccgtcaagcgaagaacggccgctgccaggtcctgtacaagaccga
 actgagcaaggaggagtgtgctgcagcaccggccggctgagcacctcgtggaccgaggaggacgtg
 aatgacaacacactcttcaagtggatgattttcaacggggcgcccccaactgcatcccctgta
 aagaaacgtgtgagaacgtggactgtggacctgggaaaaaatgccgaatgaacaagaagaaca
 accccgctgctgtctgcgccccggattgttccaacatcacctggaaggggtccagtctgcgggctg
 gatgggaaaacctaccgcaatgaatgtgcactcctaaaggcaagatgtaaagagcagccagaac
 tggaagtccagtaccaaggcagatgtaaaaagacttgctcgggatgttttctgtccaggcagctc
 cacatgtgtgggtggaccagaccaataatgcctactgtgtgacctgtaatcggatttgcccagag
 cctgcttcctctgagcaatatctctgtgggaatgatggagtcacctactccagtgcctgccacc
 tgagaaaggctacctgcctgctgggcagatctattggattagcctatgagggaaagtgtatcaa
 agcaaagtcctgtgaagatatccagtgcactggtgggaaaaaatgtttatgggatttcaaggtt
 gggagaggccggtgttccctctgtgatgagctgtgccctgacagtaagtcggatgagcctgtct
 gtgccagtgacaatgccacttatgccagcgagtgtgccatgaaggaagctgcctgctcctcagg
 tgtgctactggaagtaaagcactccggatcttgcaactccatttcggaagacaccgaggaagag
 gaggaagatgaagaccaggactacagctttcctatatcttctattctagagtgg.

Нижеследующая последовательность кодирует полипептид
 FST(288) (SEQ ID NO: 21):

gggaactgctggctccgtcaagcgaagaacggccgctgccaggtcctgtacaagaccga
 actgagcaaggaggagtgtgctgcagcaccggccggctgagcacctcgtggaccgaggaggacgtg
 aatgacaacacactcttcaagtggatgattttcaacggggcgcccccaactgcatcccctgta
 aagaaacgtgtgagaacgtggactgtggacctgggaaaaaatgccgaatgaacaagaagaaca
 accccgctgctgtctgcgccccggattgttccaacatcacctggaaggggtccagtctgcgggctg
 gatgggaaaacctaccgcaatgaatgtgcactcctaaaggcaagatgtaaagagcagccagaac
 tggaagtccagtaccaaggcagatgtaaaaagacttgctcgggatgttttctgtccaggcagctc
 cacatgtgtgggtggaccagaccaataatgcctactgtgtgacctgtaatcggatttgcccagag
 cctgcttcctctgagcaatatctctgtgggaatgatggagtcacctactccagtgcctgccacc
 tgagaaaggctacctgcctgctgggcagatctattggattagcctatgagggaaagtgtatcaa
 agcaaagtcctgtgaagatatccagtgcactggtgggaaaaaatgtttatgggatttcaaggtt
 gggagaggccggtgttccctctgtgatgagctgtgccctgacagtaagtcggatgagcctgtct
 gtgccagtgacaatgccacttatgccagcgagtgtgccatgaaggaagctgcctgctcctcagg

tgtgctactggaagtaaacgactccggatcttgcaac.

Нижеследующая последовательность кодирует зрелый полипептид FST(291) (SEQ ID NO: 22):

gggaactgctggctccgtcaagcgaagaacggccgctgccaggtcctgtacaagaccga
actgagcaaggaggagtgctgcagcaccggccggctgagcacctcgtggaccgaggaggacgtg
aatgacaacacactcttcaagtggatgattttcaacggggcgcccccaactgcatcccctgta
aagaaacgtgtgagaacgtggactgtggacctgggaaaaaatgccgaatgaacaagaagaasa
accccgtgctgctgcgccccggattgttccaacatcacctggaagggtccagtctgcsggctg
gatgggaaaacctaccgcaatgaatgtgcactcctaaggcaagatgtaaagagcagccagaac
tggaagtccagtagcaagcagatgtaaaaagacttgtcgggatgttttctgtccaggcagctc
cacatgtgtgggtggaccagaccaataatgcctactgtgtgacctgtaatcggatttgcccagag
cctgcttcctctgagcaatatctctgtgggaatgatggagtcacctactccagtgcctgccacc
tgagaaaggctacctgcctgctgggcagatctattggattagcctatgagggaaagtgtatcaa
agcaaagtcctgtgaagatatccagtgcactggtgggaaaaaatgtttatgggatttcaaggtt
gggagaggccggtgttccctctgtgatgagctgtgccctgacagtaagtcggatgagcctgtct
gtgccagtgacaatgccacttatgccagcgagtgtgccatgaaggaagctgcctgctcctcagg
tgtgctactggaagtaaacgactccggatcttgcaactccatttcgtgg.

Следует отметить, что в некоторых аспектах изобретения, рассматриваемые нуклеиновые кислоты, кодирующие фоллистатиновые полипептиды, включают нуклеиновые кислоты, которые представляют собой варианты SEQ ID NN: 19-22. Вариантами нуклеотидных последовательностей являются последовательности, отличающиеся тем, что они имеют одну или более нуклеотидных замен, добавлений или делеций, таких как аллельные варианты, а поэтому, такие последовательности включают кодирующие последовательности, отличающиеся от нуклеотидной последовательности кодирующей последовательности, представленной в SEQ ID NN. 19-22.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к выделенным или рекомбинантным последовательностям нуклеиновые кислоты, которые по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96% 97%, 98%, 99% или 100% идентичны SEQ ID NN. 19-22, а в частности, к их частям, происходящим от фоллистатина (нуклеотидам, соответствующим аминокислотам 95-164 SEQ ID NO:1). Для среднего специалиста в данной области очевидно, что в объем настоящего изобретения также входят последовательности нуклеиновой кислоты, комплементарные SEQ ID NN. 19-22, и

варианты SEQ ID NO: 19-22. В других вариантах осуществления изобретения, последовательности нуклеиновой кислоты согласно изобретению могут быть выделенными, рекомбинантными и/или присоединенными к гетерологичной нуклеотидной последовательности, либо они могут присутствовать в библиотеке ДНК.

В других вариантах осуществления изобретения, нуклеиновые кислоты согласно изобретению также включают нуклеотидные последовательности, которые гибридизуются в условиях высокой жесткости с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NN. 19-22, с комплементарной последовательностью SEQ ID NN. 19-22 или с их фрагментами (например, с нуклеотидами 19-22).

Для специалиста в данной области совершенно очевидно, что соответствующие условия жесткости, стимулирующие гибридизацию ДНК, могут варьироваться. Так, например, гибридизация может быть осуществлена с использованием 6,0× хлорида натрия/цитрата натрия (SSC) приблизительно при 45°C, и последующей промывки 2,0× SSC при 50°C. Так, например, концентрация соли в стадии промывки может быть выбрана из концентраций, применяемых в условиях низкой жесткости, а именно, приблизительно 2,0× SSC при 50°C, и концентраций, применяемых в условиях высокой жесткости, а именно, приблизительно 0,2× SSC при 50°C. Кроме того, температура в стадии промывки может быть повышена от температуры, которая применяется в условиях низкой жесткости, а именно, комнатной температуры, приблизительно 22°C, до температуры, применяемой в условиях высокой жесткости, а именно, приблизительно до 65°C. Оба параметра, такие как температура и концентрация соли могут варьироваться, либо один из таких параметров может оставаться постоянным, а другой - варьироваться. В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам, которые гибридизуются в условиях низкой жесткости, а именно, с использованием 6× SSC при комнатной температуре и последующей промывки 2× SSC при комнатной температуре.

Выделенные нуклеиновые кислоты, которые отличаются от

нуклеиновых кислот, представленных в SEQ ID NN. 19-22, что обусловлено вырожденностью генетического кода, также входят в объем настоящего изобретения. Так, например, число аминокислот представлено более, чем одним триплетом. Кодоны, которые соответствуют одной и той же аминокислоте, или синонимичные кодоны (например, CAU и CAC являются синонимичными кодонами гистидина), могут продуцировать «молчащие» мутации, которые не влияют на аминокислотную последовательность белка. Однако, предполагается, что в клетках млекопитающих существует полиморфизм последовательностей ДНК, который не приводит к изменениям в аминокислотных последовательностях рассматриваемых белков. Для специалиста в данной области очевидно, что такие модификации одного или более нуклеотидов (приблизительно до 3-5% нуклеотидов) нуклеиновых кислот, кодирующих конкретный белок, могут присутствовать у индивидуумов данных видов вследствие природной аллельной вариации. Любые и все указанные нуклеотидные вариации и полиморфизм конечных аминокислотных последовательностей входят в объем настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантные нуклеиновые кислоты согласно изобретению могут быть функционально присоединены к одной или более регуляторным нуклеотидным последовательностям в экспрессионной конструкции. Регуляторные нуклеотидные последовательности обычно являются подходящими для клеток-хозяев, используемых для экспрессии. Специалистам известно множество типов экспрессионных векторов и регуляторных последовательностей, подходящих для различных клеток-хозяев. Обычно, указанными одной или более регуляторными нуклеотидными последовательностями могут быть, но не ограничиваются ими, промоторные последовательности, лидерные или сигнальные последовательности, сайты связывания с рибосомой, последовательности инициации и терминации транскрипции, последовательности инициации и терминации трансляции и энхансерные последовательности или последовательности-активаторы. В объем настоящего изобретения также входят конститутивные или индуцибельные промоторы, известные специалистам. Промоторами могут быть природные промоторы или

гибридные промоторы, содержащие комбинацию из более, чем одного промоторного элемента. Экспрессионная конструкция может присутствовать в клетке на эписоме, такой как плаزمид, либо такая экспрессионная конструкция может быть встроена в хромосому. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, экспрессионный вектор содержит селективный маркерный ген, позволяющий проводить отбор трансформированных клеток-хозяев. Селективные маркерные гены хорошо известны специалистам и могут варьироваться в зависимости от типа используемых клеток-хозяев.

В некоторых своих аспектах, настоящее изобретение относится к рассматриваемой нуклеиновой кислоте, присутствующей в экспрессионном векторе, содержащем нуклеотидную последовательность, кодирующую фоллистатиновый полипептид и функционально присоединенную по меньшей мере к одной регуляторной последовательности. Регуляторные последовательности известны специалистам и выбраны так, чтобы они регулировали экспрессию фоллистатинового полипептида. В соответствии с этим, термин «регуляторная последовательность» включает промоторы, энхансеры и другие элементы регуляции экспрессии. Репрезентативные регуляторные последовательности описаны в публикации Goedel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990). Так, например, в этих векторах, для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих фоллистатиновый полипептид, могут быть использованы любые последовательности регуляции экспрессии широкого ряда, которые регулируют экспрессию последовательности ДНК, в том случае, если она функционально присоединена к этим последовательностям. Такими подходящими последовательностями регуляции экспрессии являются, например, ранний и поздний промоторы SV40; промотор tet; предранний промотор аденовируса или цитомегаловируса; промоторы RSV; система lac; система trp; система TAC или TRC; промотор T7, экспрессия которого регулируется РНК-полимеразой T7; главные операторные и промоторные области фага лямбда; регуляторные области оболочечного белка fd; промотор для 3-фосфоглицераткиназы или

других гликолитических ферментов; промоторы кислой фосфатазы, например, Pho5; промоторы факторов скрещивания дрожжей- α ; полиэдроновый промотор бакуловирусной системы; и другие последовательности, которые, как известно, регулируют экспрессию генов прокариотических или эукариотических клеток или их вирусов и их различных комбинаций. Следует отметить, что конструкция экспрессионного вектора может зависеть от таких факторов, как тип трансформируемой клетки-хозяина и/или тип нужного экспрессируемого белка. Кроме того, также должны учитываться число копий вектора, возможность регулировать число копий и уровень экспрессии любого другого белка, кодируемого вектором, такого как маркеры-антибиотики.

Рекомбинантная нуклеиновая кислота согласно изобретению может быть получена путем лигирования клонированного гена или его части в вектор, подходящий для экспрессии в прокариотических клетках, эукариотических клетках (в клетках дрожжей, птиц, насекомых или млекопитающих) или в тех и других клетках. Экспрессионными носителями для продуцирования рекомбинантного фоллистатинового полипептида являются плазмиды и другие векторы. Так, например, векторами, подходящими для экспрессии в прокариотических клетках, таких как *E. coli*, являются плазмиды следующих типов: плазмиды, происходящие от pBR322; плазмиды, происходящие от pEMBL; плазмиды, происходящие от pEX; плазмиды, происходящие от pVTas; и плазмиды, происходящие от pUC.

Некоторые экспрессионные векторы млекопитающих содержат прокариотические последовательности для облегчения репликации вектора в бактериях, и одну или более эукариотических транскрипционных единиц, которые экспрессируются в эукариотических клетках. Примерами экспрессионных векторов млекопитающих, подходящих для трансфекции эукариотических клеток, являются векторы, происходящие от pCDNAI/amp, pCDNAI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo и pNyg. Некоторые из этих векторов модифицируют последовательностями, происходящими от бактериальных плазмид, таких как pBR322, для облегчения

репликации и отбора на резистентность к лекарственным средствам в прокариотических и эукариотических клетках. Альтернативно, производные вирусов, таких как вирус бычьей папилломы (BPV-1), или вирус Эпштейна-Барра (pHEBo, происходящий от pREP и p205) могут быть использованы для транзientной экспрессии белков в эукариотических клетках. Примеры других вирусных экспрессионных систем (включая ретровирусные системы) приводятся ниже в описании систем доставки методами генотерапии. Различные методы получения плазмид и трансформации организмов-хозяев хорошо известны специалистам. Описание других подходящих экспрессионных систем для прокариотических и эукариотических клеток, а также описание общих рекомбинантных методов можно найти в руководстве *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) в главах 16 и 17. В некоторых случаях может оказаться желательной экспрессия рекомбинантных полипептидов с использованием бакуловирусной экспрессионной системы. Примерами таких бакуловирусных экспрессионных систем являются векторы, происходящие от pVL (такие как pVL1392, pVL1393 и pVL941); векторы, происходящие от pAcUW (такие как pAcUW1); и векторы, происходящие от pBlueBac (такие как β -gal-содержащий вектор pBlueBac III).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор может быть сконструирован для продуцирования рассматриваемых фоллистатиновых полипептидов в клетках CHO, и такими векторами являются вектор Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), векторы pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) и векторы pCI-neo (Promega, Madison, Wisc.). Очевидно, что рассматриваемые генные конструкции могут быть использованы для инициации экспрессии рассматриваемых фоллистатиновых полипептидов в клетках, размноженных в культуре, например, для продуцирования белков, включая гибридные белки или их варианты, применяемые для очистки.

Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам, трансфицированным рекомбинантным геном, включающим кодирующую

последовательность (например, SEQ ID NN. 19-22) для одного или более рассматриваемых фоллистатиновых полипептидов. Клетками-хозяевами могут быть любые прокариотические или эукариотические клетки. Так, например, фоллистатиновый полипептид согласно изобретению может экспрессироваться в бактериальных клетках, таких как *E. coli*, в клетках насекомых (например, посредством бакуловирусной экспрессионной системы), в клетках дрожжей или в клетках млекопитающих. Специалистам известны и другие подходящие клетки-хозяева.

В соответствии с этим, настоящее изобретение также относится к способам продуцирования рассматриваемых фоллистатиновых полипептидов. Так, например, клетки-хозяева, трансфецированные экспрессионным вектором, кодирующим фоллистатиновый полипептид, могут быть культивированы в условиях, подходящих для экспрессии фоллистатинового полипептида. Фоллистатиновый полипептид может быть секретирован и выделен из смеси клеток и среды, содержащей фоллистатиновый полипептид. Альтернативно, фоллистатиновый полипептид может оставаться в цитоплазме или в мембранной фракции клеток, которые затем собирают, подвергают лизису и выделяют белок. Клеточная культура включает клетки-хозяева, среду и другие побочные продукты. Среда, подходящие для культивирования клеток, хорошо известны специалистам. Рассматриваемые фоллистатиновые полипептиды могут быть выделены из среды для культивирования клеток, из клеток-хозяев или из того и другого с применением методов, известных специалистам в области очистки белков, включая ионообменную хроматографию, гель-фильтрацию, ультрафильтрацию, электрофорез и иммуноаффинную очистку с использованием антител, специфичных к конкретным эпитопам фоллистатиновых полипептидов. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, фоллистатиновым полипептидом является гибридный белок, содержащий домен, облегчающий его очистку.

В другом варианте осуществления изобретения, гибридный ген, кодирующий лидерную последовательность, используемую для очистки, такую как последовательность сайта расщепления поли-(His)/энтерокиназой, присутствующая у N-конца нужной части

рекомбинантного фоллистатинового полипептида, позволяет осуществлять очистку экспрессированного гибридного белка посредством аффинной хроматографии с использованием смолы, связанной с металлом Ni^{2+} . Затем, лидерная последовательность для очистки может быть удалена путем обработки энтерокиназой с получением очищенного фоллистатинового полипептида (см., например, Hochuli et al., (1987) *J. Chromatography* 411:177; и Janknecht et al., *PNAS USA* 88:8972).

Методы получения гибридных генов хорошо известны специалистам. Присоединение различных фрагментов ДНК, кодирующих различные полипептидные последовательности, осуществляют, в основном, стандартными методами посредством лигирования по тупым концам или липким концам; посредством гидролиза рестриктирующими ферментами с образованием соответствующих концов; достраивания липких концов, если это необходимо; обработки щелочной фосфатазой для предотвращения нежелательного связывания; и ферментативного лигирования. В другом варианте осуществления изобретения, гибридный ген может быть синтезирован стандартными методами, включая методы, осуществляемые на автоматических синтезаторах ДНК. Альтернативно, ПЦР-амплификация генных фрагментов может быть осуществлена с использованием «якорных» праймеров, образующих комплементарные «висячие» концы между двумя смежными генными фрагментами, которые могут быть затем гибридизованы с получением химерной генной последовательности (см., например, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

4. Примеры терапевтического применения

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции согласно изобретению, включающие, например, FST(288)-IgG1, FST(288)-IgG2, FST(291)-IgG1, FST(291)-IgG2, FST(315)-IgG1, FST(315)-IgG2 и любые другие описанные здесь фоллистатиновые полипептиды, могут быть использованы для лечения или предупреждения заболевания или расстройства, описанного в этом разделе, включая заболевания или расстройства, ассоциированные с аномальной активностью фоллистатинового полипептида и/или лиганда фоллистатина (например, GDF8). Эти заболевания,

расстройства или состояния обычно называются здесь «состояниями, ассоциированными с фоллистатином». В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способам лечения или предупреждения заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом, путем введения указанному индивидууму терапевтически эффективного количества фоллистатинового полипептида, описанного выше. Эти способы, в частности, применяются для терапии и профилактики заболеваний у животных, а более конкретно, у человека.

Используемый здесь термин терапевтическое средство, которое «предупреждает» развитие расстройства или состояния, означает соединение, которое, при статистической выборке, снижает вероятность возникновения расстройства или состояния в лечебной группе по сравнению с необработанной контрольной группой, либо задерживает наступление или уменьшает выраженность одного или более симптомов заболевания или состояния по сравнению с необработанной контрольной группой. Используемый здесь термин «лечение» означает ослабление тяжести или устранение состояния после его возникновения.

Комплексы «фоллистатин-лиганд» играют важную роль в росте ткани, а также на ранних стадиях развития, таких как правильное формирование различных структур, или в одном или нескольких процессах последующего развития организма, включая половое развитие, продуцирование гормонов гипофиза и образование мышц. Таким образом, состояния, ассоциированные с фоллистатином, включают аномальный рост ткани и дефекты развития.

Репрезентативными состояниями, которые могут быть подвергнуты лечению, являются нейромышечные расстройства (например, мышечная дистрофия и атрофия мышц), застойная обструктивная болезнь легких (и истощение мышц, ассоциированное с ХОБЛ), синдром истощения мышц, саркопения и кахексия. Другими репрезентативными состояниями являются мышечно-дегенеративные и нейромышечные расстройства, репарация ткани (например, заживление ран) и нейродегенеративные заболевания (например, амиотрофический боковой склероз).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции

(например, полипептиды FST-Fc) согласно изобретению используются в процессе лечения мышечной дистрофии. Термин «мышечная дистрофия» означает группу дегенеративных мышечных заболеваний, характеризующихся постепенным истощением и разрушением скелетных мышц, а иногда сердечных мышц и мышц дыхательных путей. Мышечные дистрофии представляют собой генетические расстройства, характеризующиеся прогрессирующим истощением и слабостью мышц, которые начинаются с микроскопических изменений в мышцах. В процессе дегенерации мышц происходит снижение мышечной силы у человека. Репрезентативными мышечными дистрофиями, которые могут быть подвергнуты лечению по схеме, включающей введение рассматриваемых фоллистатиновых полипептидов, являются: мышечная дистрофия Дюшенна (МДД), мышечная дистрофия Беккера (МДБ), мышечная дистрофия Эмери-Дрейфуса (МДЭД), мышечная дистрофия тазового и плечевого поясов (МДТП), плече-лопаточная лицевая мышечная дистрофия (ПЛЛД или ПЛЛМД) (также известная как болезнь Ландузи-Дежерина), миотоническая дистрофия (МТД) (также известная как болезнь Стейнерта), окулофарингеальная мышечная дистрофия (ОРМД), дистальная мышечная дистрофия (ДД), застойная мышечная дистрофия (ЗМД).

Мышечная дистрофия Беккера (МДБ) была впервые описана французским неврологом Гийомом Бенджамином Амандом Дюшенном в 1860-х годах. Мышечная дистрофия Беккера (МДБ) была названа по имени немецкого врача Петера Эмиля Беккера, который впервые описал этот вариант МДБ в 1950-е годы. МДБ является одним из наиболее распространенных наследственных заболеваний у мужчин, и такое заболевание встречается у каждого одного из 3500 подростков. МДБ возникает в результате разрушения гена дистрофина, локализованного на коротком плече хромосомы X. Поскольку у мужчин имеется только одна копия хромосомы X, то у них присутствует только одна копия гена дистрофина. В отсутствие белка дистрофина, мышца легко разрушается в процессе циклов сокращения и релаксации. Хотя на ранней стадии развития мышечного заболевания происходит компенсация путем регенерации мышц, однако, впоследствии, мышечные клетки-предшественники не могут противостоять такому поражению, и здоровая мышца

заменяется нефункциональной фиброжировой тканью.

МДБ возникает в результате различных мутаций в гене дистрофина. У пациентов с МДБ присутствует некоторое количество дистрофина, но этот дистрофин либо присутствует в недостаточном количестве, либо является низкокачественным. Как и у пациентов с МДД, присутствие некоторого количества дистрофина у пациентов с МДБ защищает мышцы от дегенерации либо на недостаточном уровне, либо на короткое время.

Так, например, проведенные недавно исследования показали, что блокирование или элиминация функции GDF8 (лиганда фоллистатина) *in vivo* могут быть эффективно достигнуты путем устранения по меньшей мере некоторых симптомов у пациентов с МДД и МДБ. Таким образом, рассматриваемые фоллистатиновые полипептиды могут действовать как ингибиторы (антагонисты) GDF8 и представляют собой альтернативные средства для блокирования функций GDF8 *in vivo* у пациентов с МДД и МДБ.

Аналогичным образом, рассматриваемые фоллистатиновые полипептиды представляют собой эффективное средство для увеличения мышечной массы при других патологических состояниях, для лечения которых необходимо такое увеличение мышечной массы. Так, например, АБС, также называемый болезнью Луи Герига (болезнь двигательных нейронов), представляет собой хроническое, неизлечимое и прогрессирующее расстройство ЦНС, поражающее двигательные нейроны, которые являются компонентами ЦНС и осуществляют взаимодействие головного мозга со скелетными мышцами. При АБС, двигательные нейроны разрушаются и, в конечном счете, погибают, и хотя головной мозг у такого человека обычно полностью сохраняет свою функцию и активность, однако, его команды контроля двигательных функций никогда не передаются мышцам. АБС, в основном, страдают люди в возрасте от 40 до 70 лет. Двигательные нейроны, которые первыми подвергаются ослаблению, являются нейроны, ответственные за движения рук или ног. Пациенты с АБС могут испытывать затруднения при ходьбе, а также они могут ронять вещи и падать, при этом, у них наблюдаются дефекты речи и непроизвольный смех или плач. В конечном счете, мышцы конечностей начинают атрофироваться в

результате бездействия. Слабость этих мышц может усиливаться, в результате чего человек может передвигаться только на коляске или вообще не может встать с постели. Большинство пациентов с АБС умирает от респираторной недостаточности или от осложнений после искусственной вентиляции легких, протекающих подобно пневмонии, через 3–5 лет после начала заболевания.

Болезнь Шарко-Мари-Тута (ШМТ) может быть подвергнута лечению путем местного введения описанных здесь фоллистатиновых полипептидов. ШМТ принадлежит к группе наследственных расстройств, поражающих периферические нервы и приводящих к прогрессирующей, а чаще всего к локальной слабости и дегенерации мышц. Характерными признаками такого заболевания, которое может быть подвергнуто лечению, являются деформация стопы (очень сильно деформированная дугообразная стопа); отвислая стопа (неспособность поставить стопу в горизонтальное положение); «шаркающая» походка (шарканье ногами по полу при ходьбе из-за отвислости стопы); потеря мышечной массы нижней части голени; онемение стопы; трудности в поддержании равновесия; или слабость в плечах и в руках.

Пациенты с различными системными мышечными расстройствами, включая миастенический синдром Ламберта-Итона (МСЛИ); метаболические дистрофии; атрофию мышц спинного мозга (АМСМ); дерматомиозит (ДМ); дистальную мышечную дистрофию (ДД); дистрофию Эмери-Дрейфуса (МДЭД); эндокринные миопатии; атаксию Фридриха (АФ); наследственные миопатии; митохондриальную миопатию; тяжелую миастению (ТМ); и полимиозит (ПМ), могут быть подвергнуты лечению описанными здесь фоллистатиновыми полипептидами.

Пациенты с послеоперационной или дисфункциональной атрофией одной или нескольких мышц, включая атрофию мышц после перелома бедра, общего протезирования тазобедренного сустава (ОПТС), общего протезирования коленного сустава (ОПКС) или хирургической операции на влагалище мышц-вращателей, могут быть подвергнуты лечению описанными здесь фоллистатиновыми полипептидами.

Пациенты, страдающие различными другими заболеваниями, вызывающими потерю мышечной ткани или истощение мышц, включая

мышечные расстройства у пациентов с такими заболеваниями, как саркопения; кахексия; раковые заболевания различных типов, включая рак легких, толстой кишки и яичника; длительное искусственное дыхание; диабет; хроническая обструктивная болезнь легких; почечная недостаточность; сердечная недостаточность; травмы; и расстройства периферических нервов, могут быть подвергнуты лечению описанными здесь фоллистатиновыми полипептидами.

Увеличение мышечной массы, индуцированное фоллистатиновым полипептидом, может также давать благоприятный эффект у пациентов, страдающих заболеваниями, ассоциированными с истощением мышц. При этом, наблюдается обратная корреляция экспрессии GDF8 и отсутствия жировой массы у человека, и такое повышение уровня экспрессии гена GDF8 ассоциируется с потерей массы у пациентов с синдромом истощения при СПИД'е. При ингибировании функции GDF8 у пациентов со СПИД'ом может наблюдаться ослабление, а то и полное устранение по меньшей мере некоторых симптомов СПИД'а, что способствует значительному улучшению качества жизни пациентов со СПИД'ом.

5. Фармацевтические композиции

В некоторых вариантах осуществления изобретения, соединения (например, фоллистатиновые полипептиды) согласно изобретению получают в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем. Так, например, фоллистатиновый полипептид может быть введен отдельно или как компонент фармацевтического препарата (то есть, терапевтической композиции). Рассматриваемые здесь соединения могут быть приготовлены для их введения человеку или животному любым стандартным способом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ терапии согласно изобретению включает местное или системное введение композиции или локальное введение посредством имплантата или другого приспособления. Очевидно, что терапевтическую композицию, используемую в настоящем изобретении, вводят в апиrogenной физиологически приемлемой форме. Кроме того, желательно, чтобы такая композиция была инкапсулирована или введена в вязкой форме для доставки в нужный

участок ткани (например, в кость, хрящ, мышцу, жировую ткань или нейроны), например, в участок пораженной ткани. Местное введение может быть подходящим для заживления ран и репарации ткани. Помимо фоллистатиновых полипептидов, в описанную выше композицию могут быть также включены, но необязательно, терапевтически приемлемые агенты, и такие агенты могут, альтернативно или дополнительно, введены одновременно или последовательно вместе с рассматриваемыми соединениями (например, с фоллистатиновыми полипептидами), применяемыми в способах согласно изобретению.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции согласно изобретению могут включать матрицу, способную доставлять одно или более терапевтических соединений (например, фоллистатиновых полипептидов) в нужный участок ткани, с образованием структуры, необходимой для развития ткани и обладающей оптимальной способностью ресорбироваться в организме. Так, например, эта матрица может обеспечивать медленное высвобождение фоллистатиновых полипептидов. Такие матрицы могут состоять из материалов, которые в настоящее время используются в других методах терапии с использованием имплантатов.

Выбор материала матрицы зависит от ее биологической совместимости, биологической разлагаемости, механических свойств, косметически приемлемого внешнего вида и межфазных свойств. Соответствующая форма препарата зависит от конкретной цели применения рассматриваемых композиций. Матрицы, подходящие для получения композиций, могут быть биоразлагаемыми и могут включать среду определенного химического состава, такую как сульфат кальция, трифосфат кальция, гидроксипатит, полимолочная кислота и полиангидриды. Другими подходящими материалами являются биоразлагаемые материалы определенного биологического состава, такие как костный или кожный коллаген. Другие матрицы состоят из чистых белков или компонентов внеклеточного матрикса. Другие подходящие матрицы являются биологически неразлагаемыми и могут включать среду определенного химического состава, такую как спеченный гидроксипатит, биологическое стекло, алюминаты или другие керамические изделия. Матрицы могут состоять из комбинаций любых соединений вышеупомянутых типов, таких как

полимолочная кислота и гидроксипатит, или коллаген и трифосфат кальция. Состав биокерамических материалов может быть изменен, например, они могут содержать фосфат кальция-алюминат и могут быть подвергнуты обработке для изменения размера пор, размера частиц, формы частиц и биологической разлагаемости.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции, применяемые в способах согласно изобретению, могут быть введены перорально, например, в форме капсул, каши, гранул, таблеток, пастилок (полученных с добавлением ароматизаторов, а обычно сахарозы и аравийской или трагакантовой камеди), порошков, гранул, растворов или суспензий в водной или безводной жидкости, эмульсий типа «масло в воде» или «вода в масле», эликсира или сиропа, лекарственных конфеток (полученных на инертной основе, такой как желатин или глицерин или сахароза и аравийская камедь) и/или жидкости для полоскания рта и т.п., где каждый из этих компонентов содержит предварительно определенное количество агента, используемого в качестве активного ингредиента. Агент может быть также введен в виде болюса, лекарственной каши или пасты.

В твердых лекарственных формах для перорального введения (в капсулах, таблетках, пилюлях, драже, порошках, гранулах и т.п.), одно или более терапевтических соединений согласно изобретению могут быть смешаны с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, такими как цитрат натрия или дифосфат кальция, и/или с любым из нижеследующих компонентов, таких как (1) наполнители или разбавители, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; (2) связующие агенты, такие как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или аравийская камедь; (3) увлажнители, такие как глицерин; (4) дезинтегрирующие агенты, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный крахмал или крахмал тапиоки, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия; (5) агенты, замедляющие растворение, такие как парафин; (6) ускорители абсорбции, такие как четвертичные соединения аммония; (7) смачивающие агенты, такие как цетиловый спирт и моностеарат глицерина; (8) абсорбенты, такие как каолин

и бентонит; (9) замасливатели, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси; и (10) красители. В случае капсул, таблеток и пилюль, фармацевтические композиции могут также содержать забуферивающие агенты. Твердые композиции аналогичного типа могут быть также использованы в качестве наполнителей в мягких и твердых желатиновых капсулах, полученных с использованием наполнителей, таких как лактоза или молочные сахара, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли.

Жидкими лекарственными формами для перорального введения являются фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. Жидкие лекарственные формы, помимо активного ингредиента, могут содержать инертные разбавители, обычно используемые для этих целей, 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, масло из семян хлопчатника, арахисовое масло, кукурузное масло, масло из проросших семян, оливковое масло, касторовое масло и кунжутное масло), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирной кислоты и сорбитана и их смеси. Композиции для перорального введения, помимо инертных разбавителей, могут также содержать, адъюванты, такие как смачивающие, эмульгирующие и суспендирующие агенты, подсластители, отдушки, красители, ароматизаторы и консерванты.

Суспензии, помимо активных соединений, могут содержать суспендирующие агенты, такие как этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтиленсорбит и сложные эфиры сорбитана, микрористаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакантовая камедь и их смеси.

Некоторые описанные здесь композиции могут быть введены местно, либо в кожу, либо в слизистую оболочку. Препараты для местного введения могут также включать один или более агентов широкого ряда, которые, как известно, являются эффективными в качестве усилителей пенетрации в кожу или в роговой слой.

Примерами таких агентов являются 2-пирролидон, N-метил-2-пирролидон, диметилацетами, диметилформаид, пропиленгликоль, метиловый или изопропиловый спирт, диметилсульфоксид и азон. Для получения косметически приемлемого препарата, в композицию могут быть также включены дополнительные агенты. Примерами таких агентов являются жиры, воски, масла, красители, ароматизаторы, консерванты, стабилизаторы и поверхностно-активные вещества. В композицию могут быть также включены кератолитические агенты, такие как агенты, известные специалистам. Примерами таких агентов являются салициловая кислота и сера.

Лекарственными формами для местного или чрезкожного введения являются порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и ингаляторы. Активное соединение может быть смешано в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми консервантами, буферами или пропеллентами, если это необходимо. Мази, пасты, кремы и гели, помимо рассматриваемого соединения согласно изобретению (например, фоллистатинового полипептида), могут содержать наполнители, такие как животные и растительные жиры, масла, воски, парафины, крахмал, трапакантовая камедь, производные целлюлозы, полиэтиленгликоли, силиконы, бентониты, кремниевая кислота, тальк и оксид цинка или их смеси.

Порошки и спреи, помимо рассматриваемого соединения, могут содержать наполнители, такие как лактоза, тальк, кремниевая кислота, гидроксид алюминия, силикаты кальция, полиамидный порошок или смеси этих веществ. Спреи могут также содержать специально приготовленные пропелленты, такие как хлорфторуглеводороды и летучие незамещенные углеводороды, такие как бутан и пропан.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, могут содержать один или более фоллистатиновых полипептидов в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или безводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями, или стерильными порошками, которые, перед их применением, могут быть

разведены стерильными инъекруемыми растворами или дисперсиями, и которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты, растворенные вещества, сообщающие препарату изотоничность с кровью рассматриваемого реципиента, или суспендирующие агенты или загустители. Примерами подходящих водных и безводных носителей, которые могут быть использованы в фармацевтических композициях согласно изобретению, являются вода, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Соответствующая текучесть может поддерживаться, например, с использованием материала для нанесения покрытий, такого как лецитин, путем сохранения требуемого размера частиц в случае дисперсий, и с использованием поверхностно-активных веществ.

Композиции согласно изобретению могут также содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто путем включения различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т.п. В композиции могут быть также включены изотонические агенты, такие как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, пролонгированная абсорбция инъекруемой фармацевтической формы может быть достигнута путем включения агентов, замедляющих абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Следует отметить, что схема введения доз может быть определена лечащим врачом с учетом различных факторов, модифицирующих действие рассматриваемых соединений согласно изобретению (например, фоллистатиновых полипептидов). Указанные различные факторы зависят от типа заболевания, подвергаемого лечению.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение также относится к генотерапии для *in vivo* продуцирования фоллистатиновых полипептидов или других соединений, описанных в настоящей заявке. Терапевтический эффект такой терапии

достигается путем введения последовательностей фоллистатиновых полинуклеотидов в пораженные клетки или в ткани пациента с перечисленными выше расстройствами. Доставка последовательностей фоллистатиновых полинуклеотидов может быть достигнута с использованием рекомбинантного экспрессионного вектора, такого как химерный вирус или коллоидная дисперсионная система. Для терапевтической доставки последовательностей фоллистатиновых полинуклеотидов предпочтительно использовать липосомы для доставки.

Различными вирусными векторам, которые могут быть использованы для проведения рассматриваемой здесь генотерапии, являются аденовирус, вирус герпеса, вирус коровьей оспы или, предпочтительно, РНК-вирус, такой как ретровирус. Предпочтительно, ретровирусным вектором является производное мышинового или птичьего ретровируса. Примерами ретровирусных векторов, в которые может быть встроен один чужеродный ген, являются, но не ограничиваются ими, вирус мышинового лейкоза Молони (MoMuLV), вирус мышинной саркомы Харви (HaMuSV), мышинный вирус опухоли молочной железы (MuMTV) и вирус саркомы Рауса (RSV). Ряд дополнительных ретровирусных векторов могут включать множество генов. Все эти векторы могут переносить или встраивать ген селективного маркера для идентификации и продуцирования трансдуцированных клеток. Ретровирусные векторы могут быть сделаны мишень-специфическими путем присоединения, например, сахара, гликолипида или белка. Предпочтительное нацеливание осуществляют с использованием антитела. Специалисту в данной области известно, что специфические полинуклеотидные последовательности могут быть встроены в ретровирусный геном или присоединены к вирусной оболочке для направленной специфической доставки ретровирусного вектора, содержащего фоллистатиновый полинуклеотид. В одном предпочтительном варианте осуществления изобретения, вектор вводят в клетки/ткани костей, хряща, мышц или нейронов.

Альтернативно, клетки тканевой культуры могут быть непосредственно трансфицированы плазмидами, кодирующими ретровирусные структурные гены *gag*, *pol* и *env*, стандартным

методом трансфекции, опосредуемой фосфатом кальция. Затем эти клетки трансфецируют векторной плазмидой, содержащей представляющие интерес гены. Полученные клетки высвобождают ретровирусный вектор в культуральную среду.

Другой системой направленной доставки фоллистатиновых полинуклеотидов является коллоидная дисперсионная система. Коллоидными дисперсионными системами являются макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросферы, сферы и липидные системы, включающие эмульсии типа «масло в воде», мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Предпочтительной коллоидной системой согласно изобретению является липосома. Липосомы представляют собой искусственные мембранные везикулы, которые могут быть использованы в качестве носителей для доставки *in vitro* и *in vivo*. РНК, ДНК и интактные вирионы могут быть инкапсулированы в водном носителе и могут быть доставлены в клетки в биологически активной форме (см., например, Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Методы эффективного переноса генов с использованием липосомного носителя известны специалистам, см., например, Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988. В состав липосомы обычно входит комбинация фосфолипидов, а чаще всего комбинация фосфолипидов вместе со стероидами, а в частности, с холестерином. При этом могут быть также использованы и другие фосфолипиды или липиды. Физические свойства липосом зависят от рН, ионной силы и присутствия двухвалентных катионов.

Примерами липидов, которые могут быть использованы для продуцирования липосом, являются фосфатидиловые соединения, такие как фосфатидилглицерин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтанолламин, сфинголипиды, цереброзиды и ганглиозиды. Репрезентативными фосфолипидами являются яичный фосфатидилхолин, дипальмитоилфосфатидилхолин и дистеароилфосфатидилхолин. Нацеливание липосом может быть также осуществлено, например, посредством орган-специфического, клетко-специфического и органелло-специфического связывания, и такой метод известен специалистам.

Примеры

Настоящее изобретения будет более понятным из описания

нижеследующих примеров, которые приводятся лишь в целях иллюстрации некоторых вариантов осуществления изобретения. Эти примеры не должны рассматриваться как ограничение объема изобретения.

Пример 1: Получение белков «фоллистатин-Fc»

Известно, что фоллистатин (FST) обладает сложными фармакокинетическими свойствами. Сообщалось, что короткая форма FST(288) является более эффективной для блокирования лигандов и связывания с клеточными поверхностями, что частично обусловлено присутствием немаскированного гепарин-связывающего домена. Считается, что FST(315) является менее эффективным и плохо связывается с клеточной поверхностью, что обусловлено присутствием богатой кислотными остатками С-концевой аминокислотной последовательности, которая нейтрализует гепарин-связывающий домен. В литературе сообщается, что фоллистатин обычно обладает системным действием. Заявителями была сделана попытка определить, можно ли получить фоллистатиновую конструкцию, которая действовала бы только в тканях, в которые ее вводят путем инъекции (например, в мышечную ткань), и может ли димеризация фоллистатина способствовать повышению способности фоллистатина сохраняться в ткани. Известно, что Fc-домены иммуноглобулинов образуют димеры. Для исследования влияния гибридных белков «фоллистатин-Fc» на мышечные и другие ткани и для оценки влияния Fc-опосредуемой димеризации на фармакокинетические свойства фоллистатиновых полипептидов, авторами настоящего изобретения были получены гибридные белки, содержащие FST(288) или FST(315), которые были присоединены к Fc-части IgG1. Для присоединения каждого фоллистатинового полипептида к Fc-части была выбрана линкерная последовательность TGGG.

Для каждой конструкции FST-IgG1, рассматриваются три нижеследующих лидерных последовательности:

(1) Лидерная последовательность фоллистатина:
MVRARNQPGGLCLLLLLLLCQFMEDRSAQA (SEQ ID NO: 23),

(2) Тканевый активатор плазминогена (TPA):
MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 24),

(3) Меллитин пчелиного меда (HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 25).

Выбранные белки FST-Fc включают лидерную последовательность фоллистатина. Гибридный белок FST(288)-IgG1 имеет непротессированные и зрелые аминокислотные последовательности, представленные ниже.

Непротессированный FST(288)-IgG1 (SEQ ID NO:26)

MVRARHQPGGLCLLLLLLQCFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTG
RLSTSWTEEDVNDNTLFWMI FNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCS
NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNA
YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT
GGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSDPEVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGS
CNTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

Зрелый FST(288)-IgG1 (SEQ ID NO:27)

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWMI FNGGAPNC
IPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKE
QPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNA YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS
ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSD
EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK.

Начальная последовательность «GN» может быть удалена с получением следующего полипептида (SEQ ID NO: 28):

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWMI FNGGAPNCIP
CKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQ
ELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNA YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSAC
HLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSDPE
VCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK

SLSLSPGK.

Гибрид FST(315)-IgG1 имеет непротессированные и зрелые аминокислотные последовательности, представленные ниже.

Непротессированный FST(315)-IgG1 (SEQ ID NO:29)

MVRARHQPGGLCLLLLLLQCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTG
RLSTSWTEEDVNDNTLQFKWMI FNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCS
NITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNA
YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT
GGKKCLWDFKVGGRGRCSLDELCPDSKSDPEVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGS
CNSISEDTEEEEEDEDEDQDYSFPISSILEWTTGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK.

Зрелый FST(315)-IgG1 (SEQ ID NO:30)

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLQFKWMI FNGGAPNC
IPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKE
QPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS
ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSLDELCPDSKSD
EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDEDQDYSFPISSILEW
TGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

Начальная последовательность «GN» может быть удалена с получением следующего полипептида (SEQ ID NO: 31):

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLQFKWMI FNGGAPNCIP
CKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQ
PELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSAC
HLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSLDELCPDSKSDPE
VCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDEDQDYSFPISSILEWTT
GGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

Белки были экспрессированы в клетках HEK-293 или CHO и

очищены из кондиционированной среды путем фильтрации и хроматографии на белке А. В некоторых случаях может быть также проведена анионообменная и гидрофобная хроматография и/или гелефильтрация.

Активность белка оценивали по связыванию с активином А или GDF11. В каждом случае, белки связывались с K_D менее, чем 10 пМ.

Пример 2: Влияние системного введения белков «фоллистатин-Fc» на мышечную массу и силу у мышей

Заявителями была определена способность белков «фоллистатин-Fc» повышать мышечную массу и мышечную силу у мышей дикого типа после системного введения. Гибридный белок ActRIIB-Fc, который, как хорошо известно, стимулирует значительное увеличение истощенной мышечной массы всего организма, использовали в качестве позитивного контроля.

Мышам C57BL/6 два раза в неделю в течение четырех недель вводили дозу (10 мг/кг; подкожно (s.c.)) белка FST(288)-IgG1, человеческого белка FST(315)-IgG1 или человеческого белка ActRIIB-Fc. Мышей подвергали сканированию всего организма методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) для определения процента изменения массы истощенной ткани всего организма. У ActRIIB-Fc-обработанных мышей наблюдалось значительное (приблизительно 35%-ное) увеличение массы истощенной ткани по сравнению с контрольной группой, которой вводили носитель. У мышей, обработанных белком FST(288)-IgG1 или FST(315)-IgG1, наблюдалось небольшое увеличение массы истощенной ткани по сравнению с контрольной группой. См. фигуру 2. По окончании исследования, мышцы грудной клетки, передней большеберцовой кости (ТА), икроножной мышцы и мышцы бедра иссекали и взвешивали. Как показано на фигуре 4, ActRIIB-Fc-обработка приводила к значительному увеличению мышечной массы у мышей каждой из этих групп. В противоположность этому, в группах обработки белками FST(288)-IgG1 или FST(315)-IgG1 наблюдалось незначительное увеличение мышечной массы, либо такого увеличения вообще не наблюдалось. См. фигуру 2.

Во время проведения данного исследования, мышей также оценивали на изменение мышечной силы. Мышечную силу мышей

измеряли по показанию растяжения датчика силы для оценки силы захвата передними конечностями. Авторами настоящего изобретения было обнаружено, что у мышей, обработанных белком ActRIIB-Fc, наблюдалось увеличение мышечной силы. В противоположность этому, в группах обработки белками FST(288)-IgG1 или FST(315)-IgG1, такого увеличения мышечной силы не наблюдалось. См. фигуру 3.

В целом, полученные результаты подтвердили, что системное введение ActRIIB-Fc приводит к значительному увеличению мышечной массы и мышечной силы у мышей по сравнению с животными контрольной группы, обработанными носителем. В противоположность этому, у мышей, обработанных гибридным белком «фоллистатин-Fc», FST(288)-IgG1 или FST(315)-IgG1, наблюдалось незначительное увеличение мышечной массы или мышечной силы, либо такого увеличения вообще не наблюдалось. Поэтому, очевидно, что гибридные белки «фоллистатин-Fc», при их системном введении *in vivo*, оказывают незначительное влияние или вообще не оказывают никакого влияния на мышечную массу или силу.

Пример 3: Влияние системного введения белков «фоллистатин-Fc» на уровни FSH

Фоллистатин охарактеризовывали, главным образом, на его способность связываться с членами суперсемейства сигнал-передающих белков TGF-бета. В частности, известно, что фоллистатин является сильным ингибитором активности активина. Активин представляет собой сильный индуктор продуцирования фолликулостимулирующего гормона (FSH). FSH синтезируется и секретруется гонадотрофами передней доли гипофиза и регулирует рост и развитие организма в процессе полового созревания и различные репродуктивные процессы в организме. Для оценки системных эффектов полипептидов «фоллистатин-Fc» определяли их влияние на уровни FSH.

Обработка (10 мг/кг; подкожно (s.c.) два раза в неделю) белком FST(288)-IgG1 давала уровни лекарственного средства в кровотоке, составляющие 3,836 ($\pm 5,22$) мкг/мл. Аналогичная обработка белком FST(315)-IgG1 приводила к значительному повышению уровней лекарственного средства в сыворотке до 19,31

($\pm 1,85$) мкг/мл. Как показано на фигуре 5, FST(288)-IgG1 не оказывал какого-либо значительного влияния на уровни FSH в сыворотке, что позволяет предположить, что такая схема обработки белком FST(288)-IgG1 не оказывает значительного влияния на системную активность активина. В противоположность этому, обработка белком FST(315)-IgG1 приводила к снижению уровней FSH в кровотоке, что указывало на то, что системное введение FST(315)-IgG1 оказывает влияние на системную передачу сигнала активина. В целом, эти данные показали, что использование фоллистатинового полипептида с немаскированным гепарин-связывающим доменом, присоединенным к Fc-домену, который опосредует димеризацию, такому как FST(288)-IgG1, приводит к получению белка, обладающего минимальной системной активностью или вообще не обладающего такой активностью, тогда как FST(315)-IgG1, имеющий маскированный гепарин-связывающий домен, может быть использован для достижения системных эффектов.

Пример 4: Влияние местного введения белков «фоллистатин-Fc» на мышечную массу и мышечную силу у мышей

Хотя после системного введения не наблюдалось каких-либо значимых эффектов, авторами настоящего изобретения был проведен аналогичный эксперимент для того, чтобы определить, может ли фоллистатин использоваться для локального увеличения мышечной массы и мышечной силы у мышей дикого типа после внутримышечного (i.m.) введения.

Мышам C57BL/6 два раза в неделю в течение четырех недель вводили дозу (50 микрограммов; i.m., в правую икроножную мышцу) белка FST(288)-Fc, белка FST(315)-Fc или человеческого белка ActRIIB-Fc. В различные периоды времени, после первой обработки, мышей подвергали сканированию всего организма методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) для определения процента изменения массы истощенной ткани всего организма. У ActRIIB-Fc-обработанных мышей наблюдалось значительное увеличение массы истощенной ткани по сравнению с контрольной группой, которой вводили носитель. В противоположность этому, ни у мышей, обработанных белком FST(288)-IgG1, ни у мышей, обработанных

белком FST(315)-IgG1, не наблюдалось какого-либо значимого увеличения массы истощенной ткани по сравнению с контрольной группой. По окончании исследования, правую икроножную мышцу, в которую вводили инъекцию, и левую контралатеральную икроножную мышцу иссекали и взвешивали. Как показано на фигуре 6, ActRIIB-Fc-обработка приводила к значительному увеличению мышечной массы в правой и левой икроножных мышцах по сравнению с мышцами, обработанными носителем. Следовательно, ActRIIB-Fc оказывал системное действие с увеличением мышечной массы даже при его местном введении в одну мышцу. В противоположность этому, FST(288)-Fc и FST(315)-Fc способствовали значительному увеличению мышечной массы правой икроножной мышцы, но не оказывали какого-либо влияния на массу контралатеральной мышцы. Таким образом, было установлено, что в противоположность эффектам, наблюдаемым после системного введения, фоллистатиновый белок действует как сильный стимулятор мышечной массы при его непосредственном введении в мышцу. Кроме того, было обнаружено, что фоллистатин имеет явное преимущество по сравнению с другими агентами, подобными ActRIIB-Fc, и это преимущество заключается в его влиянии на мышечную массу в конкретном участке введения, что указывает на то, что фоллистатин может быть использован для направленной терапии выбранной мышцы или группы мышц, при которой он не будет оказывать какого-либо влияния на рост/активность нормальных окружающих мышц, не являющихся мишенями.

Заявителями был также проведен тщательный мониторинг уровней гибридного белка «фоллистатин-Fc» в сыворотке после i.m. введения. Обработка белком FST(288)-IgG1 давала уровни лекарственного средства в кровотоке, составляющие 0,156 ($\pm 0,245$) мкг/мл. Аналогичная обработка белком FST(315)-IgG1 давала немного более высокие уровни лекарственного средства в сыворотке, составляющие 3,58 ($\pm 1,73$) мкг/мл, но эти уровни были значительно ниже, чем уровни, наблюдаемые после системного введения FST(315)-IgG1. Поскольку белки FST(288)-IgG1 и FST(315)-IgG1 присутствовали в сыворотке пациента на более

низких уровнях после i.m.-инъекции, чем это наблюдалось после системного введения FST(288)-IgG1 (то есть, 3,836 ($\pm 5,22$) мкг/мл), то, как и ожидалось, ни один из белков FST(288)-IgG1 и FST(315)-IgG1 не оказывал какого-либо значительного влияния на уровни FSH в сыворотке, поскольку FST(288)-IgG1 вообще не давал такого эффекта после s.c.-введения. См. фигуру 5. В соответствии с этим, эти данные показали, что белки FST(288)-IgG1 и FST(315)-IgG1 должны быть особенно подходящими для стимуляции увеличения мышечной массы у пациентов, которые являются репродуктивно активными, или у которых желательно минимизировать влияние на репродуктивную систему.

Аналогичный эксперимент был проведен для построения дозозависимой кривой влияния FST(288)-IgG1 на мышечную массу и ее качество. Мышам C57BL/6 в правую икроножную мышцу вводили i.m. различные дозы (1-100 микрограммов) два раза в неделю в течение четырех недель. Как показано на фигуре 8, селективное увеличение массы мышц, в которые вводили инъекцию, по сравнению с контралатеральной мышцей, становилось еще больше по мере повышения доз FST(288)-IgG1. Исследование поперечных срезов мышц показало, что увеличение мышечной массы является результатом гипертрофии мышечных волокон, но не гипоплазии.

Пример 5: Fc-оптимизация локально действующих гибридных белков «фоллистатин-Fc»

Как описано в предыдущих примерах, гибридные белки «фоллистатин-Fc», такие как FST(288)-IgG1 и FST(315)-IgG1 обладают низким системным действием на мышцы и другие ткани, а в частности, FST(288)-формы белка являются активными на участке инъекции. Авторами настоящей заявки и другими авторами было установлено, что FST(288) связывается с клетками посредством гепарин-связывающего домена, и такое связывание может быть устранено путем введения экзогенного гепарина. Впоследствии, авторами настоящей заявки было определено, что домены иммуноглобулина, которые, как известно, опосредуют влияние CDC и ADCC на клетки-мишени, могут вызывать повреждение клеток, обработанных гепарин-связывающими фоллистатиновыми

конструкциями. Такое повреждение может проявляться как иммунная реакция в ткани-мишени или как снижение роста такой ткани. Поэтому, авторами настоящей заявки были получены варианты фоллистатиновых полипептидов с использованием Fc-части человеческого IgG2, являющейся примером константного домена IgG, который, как известно, обладает пониженной способностью стимулировать CDC- и ADCC-активность. Этот эксперимент был проведен для того, чтобы определить, могут ли гибридные белки «фоллистатин-Fc», полученные с использованием альтернативных Fc-доменов, сохранять свою активность.

Авторами настоящего изобретения были получены гибридные белки, содержащие FST(288) или FST(315), присоединенные к Fc-части IgG2. Для присоединения каждого фоллистатинового полипептида к Fc-части была выбрана линкерная последовательность TGGG.

Для каждой конструкции FST-IgG2 была использована лидерная последовательность фоллистатина.

Гибрид FST(288)-IgG2 имеет непротессированные и зрелые аминокислотные последовательности, представленные ниже.

Непротессированный FST(288)-IgG2 (SEQ ID NO:32)

MVRARHQPGGLCLLLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTG
 RLSTSWTEEDVNDNTLQFKWMI FNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCS
 NITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNA
 YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT
 GGKKCLWDFKVGGRCSLDELCPDSKSDPEVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGS
 CNTGGGVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV
 EVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

Этот белок кодируется нижеследующей последовательностью нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO:44):

atgggtccgscgagggcaccagccgggtgggctttgcctcctgctgctgctgctctgcc
 gttcatggaggaccgscagtgccaggctgggaactgctggctccgtcaagcgaagaacggccgc
 tgccaggtcctgtacaagaccgaactgagcaaggaggagtgctgcagcaccggccggctgagca
 cctcgtggaccgaggaggacgtgaatgacaacacactcttcaagtggatgattttcaacggggg
 cgccccaactgcatcccctgtaaagaacgtgtgagaacgtggactgtggacctgggaaaaaa

tgccgaatgaacaagaagaacaacccccgctgcgctctgcgccccggattgttccaacatcacct
 ggaaggggtccagtctgcgggctggatgggaaaacctaccgcaatgaatgtgactcctaaaggc
 aagatgtaaagagcagccagaactggaagtccagtaccaaggcagatgtaaaaagacttgtcgg
 gatgttttctgtccaggcagctccacatgtgtggtggaccagaccaataatgcctactgtgtga
 cctgtaatcggatttgcccagagcctgcttctctgagcaatatctctgtgggaatgatggagt
 cacctactccagtgcctgccacctgagaaaggctacctgcctgctgggcagatctattggatta
 gcctatgagggaaagtgtatcaaagcaaagtcctgtgaagatatccagtgcactggtgggaaaa
 aatgtttatgggatttcaaggtgggagaggccgggtgttccctctgtgatgagctgtgccctga
 cagtaagtcggatgagcctgtctgtgccagtgacaatgccacttatgccagcgagtgtgccatg
 aaggaagctgctgctcctcaggtgtgctactggaagtaaagcactccggatcttgcaacaccg
 gtggtggagtcgagtgccaccctgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagctcttctctt
 cccccaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgctggtggtg
 gacgtgagccacgaagacccccgaggtccagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgata
 atgccaagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtggtcagcgtcctcac
 cgtcgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaggcctc
 ccagccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaagggcagccccgagaaccacaggtgtaca
 ccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaagg
 cttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaag
 accacacctccatgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcacctggaca
 agagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaacca
 ctacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatgagaattc.

Зрелый FST (288) - IgG2 (SEQ ID NO: 33)

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWMI FNGGAPNC
 IPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKG P VCGLDGKTYRNECALLKARCKE
 QPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNA YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS
 ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVG RGRCSLDELCPDSKSD
 EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGV LLEVKHSGSCNTGGGVECP P PAPPVAGPSVFLFPPKP
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK.

Начальная последовательность «GN» может быть удалена с получением следующего полипептида (SEQ ID NO: 34):

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWMI FNGGAPNCIP
 CKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKG P VCGLDGKTYRNECALLKARCKEQP
 ELELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNA YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSAC

HLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRCSLDELCPDSKSDEP
 VCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNTGGGVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD
 TLMISRTP EVT CVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDW
 LNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPGK.

Гибрид FST(315)-IgG2 имеет непротессированные и зрелые аминокислотные последовательности, представленные ниже.

Непротессированный FST(315)-IgG2 (SEQ ID NO:35)

MVRARHQPGGLCLLLLLLQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTG
 RLSTSWTEEDVNDNTLTKWMI FNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKRCRMNKKNKPRCVCAPDCS
 NITWKG PVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNA
 YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT
 GGKKCLWDFKVGGRCSLDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGS
 CNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEWTGGGVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY
 KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 .

Этот белок кодируется нижеследующей последовательностью нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO:45):

atgggtccgcgagggcaccagccgggtgggctttgcctcctgctgctgctgctctgcc
 gttcatggaggaccgcagtgcccaggctgggaactgctggctccgtcaagcgaagaacggccgc
 tgccaggtcctgtacaagaccgaactgagcaaggaggagtgctgcagcaccggccggctgagca
 cctcgtggaccgaggaggacgtgaatgacaacacactcttcaagtggatgattttcaacggggg
 tgccccaactgcatcccctgtaaagaacgtgtgagaacgtggactgtggacctgggaaaaaa
 tgccgaatgaacaagaagaacaaccccgctgctgctgctgccccggattgttccaacatcacct
 ggaaggtccagctctgcgggctggatgggaaaacctaccgcaatgaatgtgactcctaaaggc
 aagatgtaaagagcagccagaactggaagtccagtagcaaggcagatgtaaaaagacttgctcg
 gatgttttctgtccaggcagctccacatgtgtgggtggaccagaccaataatgcctactgtgtga
 cctgtaatcggatttgcccagagcctgcttccctctgagcaatatctctgtgggaatgatggagt
 cacctactccagtgccctgccacctgagaaaggctacctgcctgctgggcagatctattggatta
 gcctatgagggaaagtgtatcaaagcaaagtcctgtgaagatatccagtgactgggtgggaaaa
 aatgtttatgggatttcaaggtgggagaggccgggtgtccctctgtgatgagctgtgccctga
 cagtaagtcggatgagcctgtctgtgccagtgacaatgccacttatgccagcgagtgatgccatg
 aaggaagctgcctgctcctcaggtgtgctactggaagtaaagcactccggatcttgcaactcca

tttcggaagacaccgaggaagaggaggaagatgaagaccaggactacagctttcctatatcttc
 tattctagagtggaccggtggtggagtgcagtgcccaccgtgcccagcaccacctgtggcagga
 ccgtcagtccttctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgagg
 tcacgtgcggtggtggacgtgagccacgaagaccccagaggtccagttcaactggtacgtgga
 cggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgt
 gtggtcagcgtcctcaccgtcgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaagg
 tctccaacaaaggcctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaaagggcagccccg
 agaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctg
 acctgcctggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagc
 cggagaacaactacaagaccacacctcccatgctggactccgacggctccttcttctctacag
 caagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcat
 gaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaagagaattc.

Зрелый FST(315)-IgG2 (SEQ ID NO:36)

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMI FNGGAPNC
 IPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNI TWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKE
 QPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS
 ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSD
 EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW
 TGGVVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV
 YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

Начальная последовательность «GN» может быть удалена с
 получением следующего полипептида (SEQ ID NO: 37):

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMI FNGGAPNCIP
 CKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNI TWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQP
 ELELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSAC
 HLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSD
 EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEWTG
 GGVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYT
 LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

Белки были экспрессированы в клетках HEK-293 или CHO и
 очищены из кондиционированной среды путем фильтрации и
 хроматографии на белке А. В некоторых случаях может быть также

проведена анионообменная и гидрофобная хроматография и/или геле-фильтрация.

Активность белка оценивали по связыванию с активином А или GDF11. В каждом случае, белки связывались с K_D менее, чем 10 пМ. Эти данные показали, что могут быть получены и экспрессированы гибридные белки «фоллистатин-IgG2», сохраняющие пикомолярную лиганд-связывающую активность.

Пример 6: Оптимизированные локально действующие гибридные белки «фоллистатин-Fc»

Для оценки возможности получения оптимального гибридного белка «фоллистатин-IgG2» был получен ряд белков от FST(288) и до FST(315) с различными С-концевыми усечениями. Один из этих белков с усечением аминокислот до положения 291, обозначаемый FST(291), обнаруживал превосходные экспрессионные свойства по сравнению с другими формами и сохранял нужную гепарин-связывающую активность, несмотря на то, что он содержал небольшую часть маскирующего домена FST(315). Эта форма была присоединена к Fc-части человеческих IgG1 и IgG2 с получением FST(291)-IgG1 и FST(291)-IgG2.

Для присоединения каждого фоллистатинового полипептида к Fc-части была выбрана линкерная последовательность TGGG.

Для каждой конструкции FST-IgG1 была использована лидерная последовательность фоллистатина.

Гибрид FST(291)-IgG1 имеет непротессированные и зрелые аминокислотные последовательности, представленные ниже.

Непротессированный FST(291)-IgG1 (SEQ ID NO:38)

MVRARHQPGGLCLLLLLLCLQFMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTG
RLSTSWTEEDVNDNTLQKMI FNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCS
NITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNA
YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT
GGKKCLWDFKVGGRCSLDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGS
CNSISTGGGTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

Зрелый FST(291)-IgG1 (SEQ ID NO:39)

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWMI FNGGAPNC
 IPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKG PVCGLDGKTYRNECALLKARCKE
 QPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNA YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS
 ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVG RGRCSLCDELCPDSKSD
 EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHN
 HNTQKSLSLSPGK.

Начальная последовательность «GN» может быть удалена с
 получением следующего полипептида (SEQ ID NO: 40):

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWMI FNGGAPNCIP
 CKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKG PVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQP
 ELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNA YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSAC
 HLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVG RGRCSLCDELCPDSKSD
 EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNH
 NTQKSLSLSPGK.

Гибрид FST(291)-IgG2 имеет непротессированные и зрелые
 аминокислотные последовательности, представленные ниже.

Непротессированный FST(291)-IgG2 (SEQ ID NO:41)

MVRARHQPGGLCLLLLLLQC FMEDRSAQAGNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTG
 RLSTSWTEEDVNDNTLFWMI FNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCS
 NITWKG PVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNA
 YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT
 GGKKCLWDFKVG RGRCSLCDELCPDSKSD
 EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGS
 CNSISTGGGV ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLY
 SKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHNTQKSLSLSPGK.

Зрелый FST(291)-IgG2 (SEQ ID NO:42)

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWMI FNGGAPNC
 IPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKG PVCGLDGKTYRNECALLKARCKE
 QPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNA YCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS

ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSD
 EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSISTGGGVECPPCPAPPVAGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV
 VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPGK.

Начальная последовательность «GN» может быть удалена с получением следующего полипептида (SEQ ID NO: 43):

CWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFWMI FNGGAPNCIP
 CKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGVPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQP
 ELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAVCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSAC
 HLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSD
 EPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSISTGGGVECPPCPAPPVAGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV
 VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPGK.

Белки были экспрессированы в клетках HEK-293 или CHO и очищены из кондиционированной среды путем фильтрации и хроматографии на белке А. В некоторых случаях может быть также проведена анионообменная и гидрофобная хроматография и/или гель-фильтрация.

Активность белка оценивали по связыванию с активином А или GDF11. В каждом случае, белки связывались с K_D менее, чем 10 пМ.

Были проведены дополнительные эксперименты по усечению белков для идентификации конструкций «фоллистатин-IgG2», содержащих линкер TGGG и обладающих оптимальной активностью связывания с лигандом и гепарином, в результате чего был получен полипептид, обладающий высокой активностью, значительной тенденцией к удерживанию в обработанной ткани и низкой тенденцией к продуцированию воспалительной или иммунной реакции в обработанной ткани. Для этих целей был получен ряд конструкций, обозначаемых FST(278)-IgG2, FST(284)-IgG2, FST(291)-IgG2 и FST(303)-IgG2, и эти конструкции сравнивали друг с другом и с FST(288)-IgG2 и FST-(315)-IgG2. Активность связывания с гепарином оценивали путем определения уровня высвобождения белка

из клеток в присутствии или в отсутствии гепарина, а затем эту активность оценивали с помощью ELISA и выражали как отношение белка, высвобождаемого в присутствии гепарина, к белку, высвобождаемому в отсутствии гепарина. Как показано ниже в таблице, все FST(278)-IgG2, FST(284)-IgG2, FST(288)-IgG2 и FST(291)-IgG2 имели аналогичные отношения, составляющие 3,00-4,00, а FST(303)-IgG2 и FST(315)-IgG2 имели отношения 1,50 и 0,97, соответственно. Это означает, что при включении большего количества аминокислот в положения от 291 до 303, гепарин-связывающая активность резко снижается.

Гепарин-связывающая активность усеченных белков FST-IgG2

Конструкция FST-IgG2	Отношение (белок, высвобождаемый в присутствии гепарина/белок, высвобождаемый в отсутствии гепарина)
FST(278)-IgG2	4,18
FST(284)-IgG2	3,54
FST(288)-IgG2	3,34
FST(291)-IgG2	3,00
FST(303)-IgG2	1,50
FST(315)-IgG2	0,97

Были проведены клеточные анализы гена-репортера (анализ гена-репортера A-204, описанные в WO/2006/012627) для оценки ингибирования активина и GDF11. Как показано ниже в таблице, конструкции, последовательность которых простирается за положение аминокислоты 288, обладают повышенной способностью ингибировать лиганд.

Ингибирование лиганда усеченными белками FST-IgG2

Конструкция FST-IgG2	IC50 (нг/мл) для активина A	IC50 (нг/мл) для GDF-11
FST(278)-IgG2	521	91
FST(284)-IgG2	369	123
FST(288)-IgG2	30	41
FST(291)-IgG2	20	26
FST(303)-IgG2	2	18

FST(315)-IgG2	10	15
---------------	----	----

В целом, данные по связыванию с гепарином и ингибированию лиганда, показали, что конструкции FST-IgG2, полученные с использованием линкера TGGG или линкеров аналогичной длины (например, линкеров размером 1-10 аминокислот и необязательно 3-8 аминокислот), которые заканчиваются аминокислотами в положении 291-302, обнаруживали повышенную способность ингибировать лиганд по сравнению с FST(288)-IgG2, и повышенную гепарин-связывающую активность по сравнению с FST(315)-IgG2, и что FST(291)-IgG2 представляет собой белок, обладающий оптимальным эффектом при местном введении.

Пример 7: Эффективность действия белка FST(291)-IgG2 на мышечную массу и силу при его местном введении мышам

Авторами настоящей заявки была оценена активность оптимизированного белка FST(291)-IgG2, используемого для локального увеличения мышечной массы и силы у мышей дикого типа после внутримышечного (i.m.) введения.

Мышам C57BL/6 два раза в неделю в течение четырех недель вводили дозу (100 микрограммов в 50 микролитрах; i.m., в правую икроножную мышцу) носителя (PBS), белка FST(291)-IgG2 или контрольного Fc, происходящего от IgG1. По окончании исследования, левую икроножную мышцу, в которую вводили инъекцию, и правую контралатеральную икроножную мышцу иссекали и взвешивали. Как показано на фигуре 9, FST(291)-IgG2-обработка приводила к значительному увеличению мышечной массы в левой икроножной мышце по сравнению с мышами, обработанными носителем, причем в контралатеральной мышце, какого-либо эффекта не наблюдалось. Кроме того, мышцы грудной клетки и бедра взвешивали, и в этих мышцах, после введения носителя или FST(291)-IgG2, каких-либо изменений не обнаруживалось. Следовательно, FST(291)-IgG2 имел ограниченное действие на группу мышц после инъекции этого белка, причем, системный эффект был минимальным или вообще отсутствовал. Были проведены аналогичные эксперименты, но при этом, инъекции вводили в другие группы мышц, включая трехглавую мышцу и переднюю мышцу

большеберцовой кости. В каждом случае наблюдалась селективная гипертрофия мышцы, в которую вводили инъекцию.

Были проведены дополнительные эксперименты для непосредственного сравнения влияния FST(288)-IgG1 и FST(291)-IgG2 на рост мышечной массы. Хотя обе конструкции стимулировали значительное увеличение мышечной массы в мышце, в которую вводили инъекцию (в икроножную мышцу), однако, FST(291)-IgG2 вызывал приблизительно 42%-е увеличение мышечной массы в мышце, в которую вводили инъекцию, по сравнению с контралатеральной мышцей, а FST(288)-IgG1 вызывал приблизительно 22%-е увеличение мышечной массы в мышце, в которую вводили инъекцию, по сравнению с контралатеральной мышцей.

В соответствии с этим, полученные данные показали, что белок FST(291)-IgG2 представляет собой соединение, которое является оптимальным для стимуляции роста мышечной массы в мышце-мишени у пациентов, нуждающихся в этом.

Пример 8: Эффективность действия белка FST(291)-IgG2 на мышечную массу при его местном введении мышам с моделью мышечной дистрофии Дюшенна

Влияние FST(291)-IgG2 на мышечную массу оценивали у мышей с моделью мышечной дистрофии Дюшенна. Мыши линии C57BL/10ScCN-Dmd^{mdx}/J (*mdx*) представляют собой хорошо известную модель человеческой мышечной дистрофии Дюшенна (Bulfield, Siller et al. 1984; Partridge 2013).

Два отдельных исследования были проведены на мышях *mdx* и на мышях дикого типа линии C57BL/10SnJ (WT). В первом исследовании, обработку (либо белком FST(291)-IgG2, либо контрольным носителем) начинали, когда мыши достигли 6-недельного возраста. Во втором исследовании, обработку начинали, когда мыши достигли 4-недельного возраста. В обоих исследованиях, мышам внутримышечно вводили 100 мкг FST(291)-IgG2 в левую икроножную мышцу два раза в неделю в фиксированном объеме 50 мкл на инъекцию. 4-недельных мышей обрабатывали в течение 4 недель, а 6-недельных мышей обрабатывали в течение 6 недель.

После аутопсии, икроножные мышцы голени (левой), в которую вводили инъекцию, и контралатеральной голени (правой), в которую

не вводили инъекцию, вырезали и взвешивали. В обоих исследованиях, икроножные мышцы животных дикого типа (WT), в которые были введены инъекции белка FST(291)-IgG2, имели значительно больший размер, чем мышцы контралатеральной голени, а также мышцы контрольного животного, которому вводили носитель ($P < 0,001$). В обоих исследованиях, икроножная мышца, обработанная белком FST(291)-IgG2, имела значительно больший размер, нормализованный по массе тела, по сравнению с размером контралатеральной мышцы у животных, обработанных носителем, то есть, у мышей WT и мышей *mdx*. Увеличение мышечной массы было несколько более выраженным у молодых животных, чем у старых животных. С точки зрения увеличения процента по отношению к контралатеральной мышце, FST(291)-IgG2 давал увеличение мышечной массы на 34,2% и 16,4% у 6-недельных мышей WT и мышей *mdx*, соответственно. Было обнаружено, что мышечная масса у 4-недельных мышей WT и мышей *mdx* увеличивалась на 62,8% и 41,8%, соответственно.

Эти данные свидетельствуют о том, что блокирование передачи сигнала активина/миостатина после внутримышечного введения FST(291)-IgG2 два раза в неделю приводило к увеличению мышечной массы у мышей с моделью мышечной дистрофии. Такое увеличение мышечной массы было локальным и наблюдалось только в мышце, в которую вводили инъекцию.

Введение посредством ссылки

Все упомянутые здесь публикации и патенты во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки так, как если бы каждая отдельная публикация или каждый отдельный патент были конкретно и отдельно введены посредством ссылки.

Хотя в настоящем описании обсуждаются конкретные варианты осуществления изобретения, однако, эти варианты приводятся лишь в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничение объема изобретения. Многие варианты будут более понятны специалистам исходя из данного описания и формулы изобретения, прилагаемой ниже. Полный объем настоящего изобретения определен в указанной формуле изобретения вместе с полным объемом эквивалентов, и в описании изобретения вместе с указанными вариантами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ скрининга вариантов фоллистатиновых полипептидов, включающий тестирование способности фоллистатинового полипептида связываться с одним или несколькими из миостатина, GDF11, активина А или активина В; где если фоллистатиновый полипептид способен связываться с одним или несколькими из миостатина, GDF11, активина А или активина В, то идентифицируется вариант фоллистатинового полипептида; где фоллистатиновый полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 15 или 16; где фоллистатиновый полипептид заканчивается аминокислотой, соответствующей любой из аминокислот 291-302 SEQ ID NO: 4; и, где фоллистатиновый полипептид необязательно слит с гетерологичной группой.

2. Способ по п.1, где фоллистатиновый полипептид слит с гетерологичной частью.

3. Способ по п.2, где гетерологичная часть представляет собой Fc-домен иммуноглобулина.

4. Способ по п.2 или 3, где фоллистатиновый полипептид необязательно содержит линкерный полипептид между полипептидом фоллистатина и гетерологичной частью.

5. Способ по п.4, где линкерный полипептид включает последовательность TGGG.

6. Способ по любому из пп.2-5, где гетерологичная часть содержит константный домен иммуноглобулина IgG, который обладает пониженной активностью ADCC относительно человеческого IgG1.

7. Способ по любому из пп.2-6, где гетерологичная часть содержит константный домен иммуноглобулина IgG, который обладает пониженной активностью CDC относительно человеческого IgG1.

8. Способ по любому из пп.2-6, где гетерологичная часть содержит константный домен иммуноглобулина IgG, выбранного из группы: IgG1, IgG2 и IgG4.

9. Способ по любому из пп.1-8, где фоллистатиновый полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 15 или 16.

10. Способ по любому из пп.1-8, где аминокислотная последовательность фоллистатинового полипептида заканчивается аминокислотой, соответствующей положению 291 SEQ ID NO: 4.

11. Способ по любому из пп.1-10, где фоллистатиновый полипептид связывается с одним или несколькими лигандами, выбранными из группы, состоящей из: миостатина, фактора дифференцировки роста 11 (GDF-11), активина А и активина В с константой диссоциации (KD) менее 1 нМ, 100 пМ, 50 пМ или 10 пМ.

12. Способ по п.3, где Fc-домен иммуноглобулина представляет собой константный домен IgG1.

13. Способ по п.12, где константный домен IgG1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

14. Способ по п.3, где Fc-домен иммуноглобулина представляет собой константный домен IgG2.

15. Способ по п.14, где константный домен IgG2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

16. Способ по любому из пп.1-15, где фоллистатиновый полипептид является членом димера.

По доверенности

MVRARHQPGGLCLLLLLLLCQFMEDRSAQA GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTL

FK

WMI FNGGAPNCI PCKET CENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKG P VCGLDGKTYRNECALLKARCKE

QP

КРАСНЫЙ

FSI

ELEVQYQGRCKKT CRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGR

SI

СИНИЙ

FSII

GLAYEGKCIKAKS CEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGV

LL

ЗЕЛЕНый

FSIII

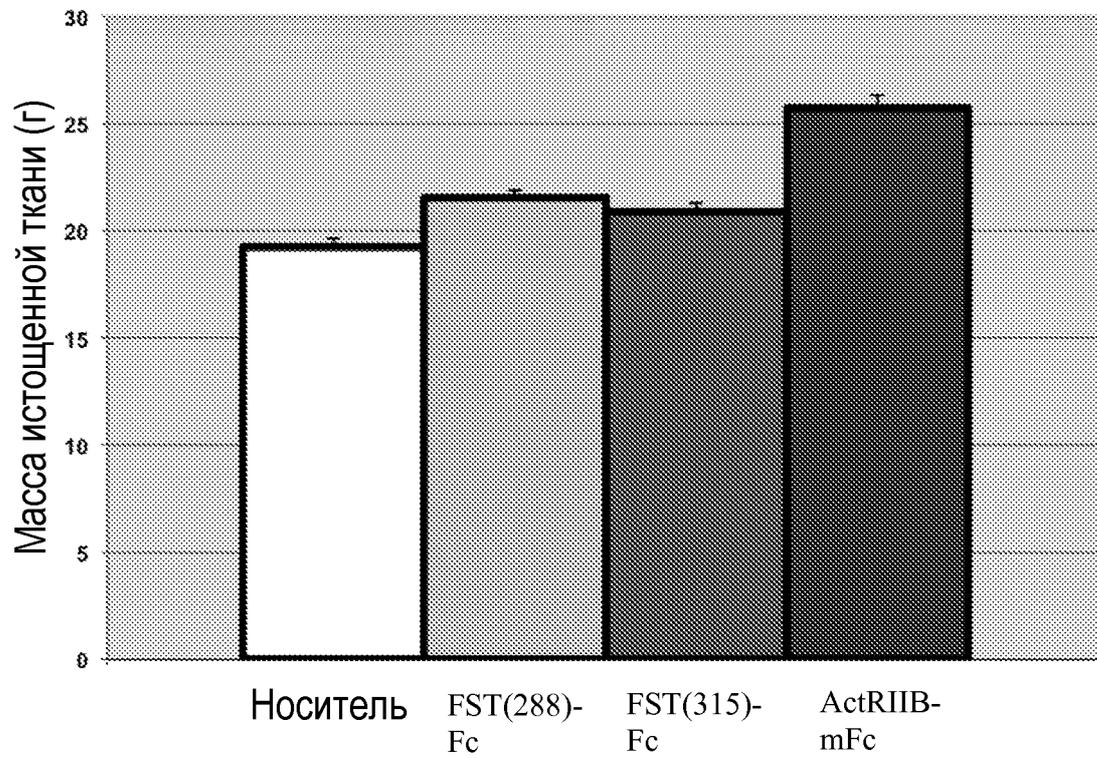
EVKHSGSC NSISEDTEEEEEDEDEDQDYSFPISILEW

1/9

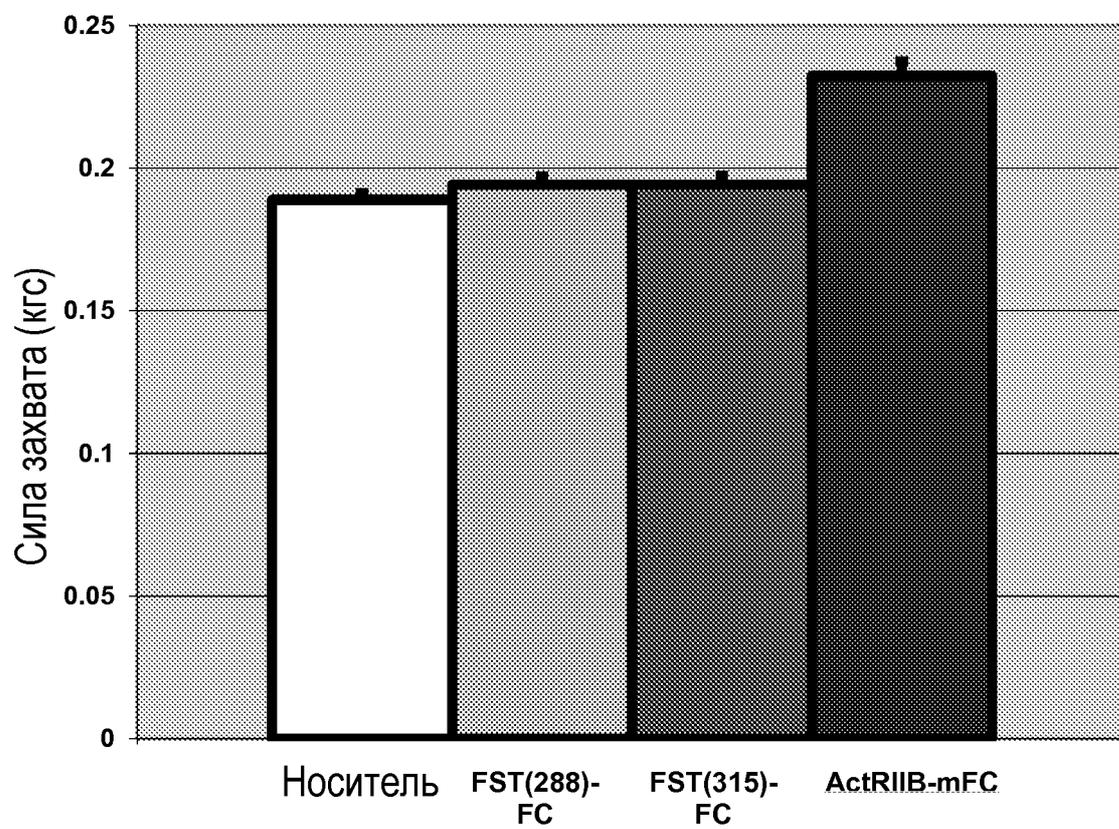
ФИГ. 1

562356

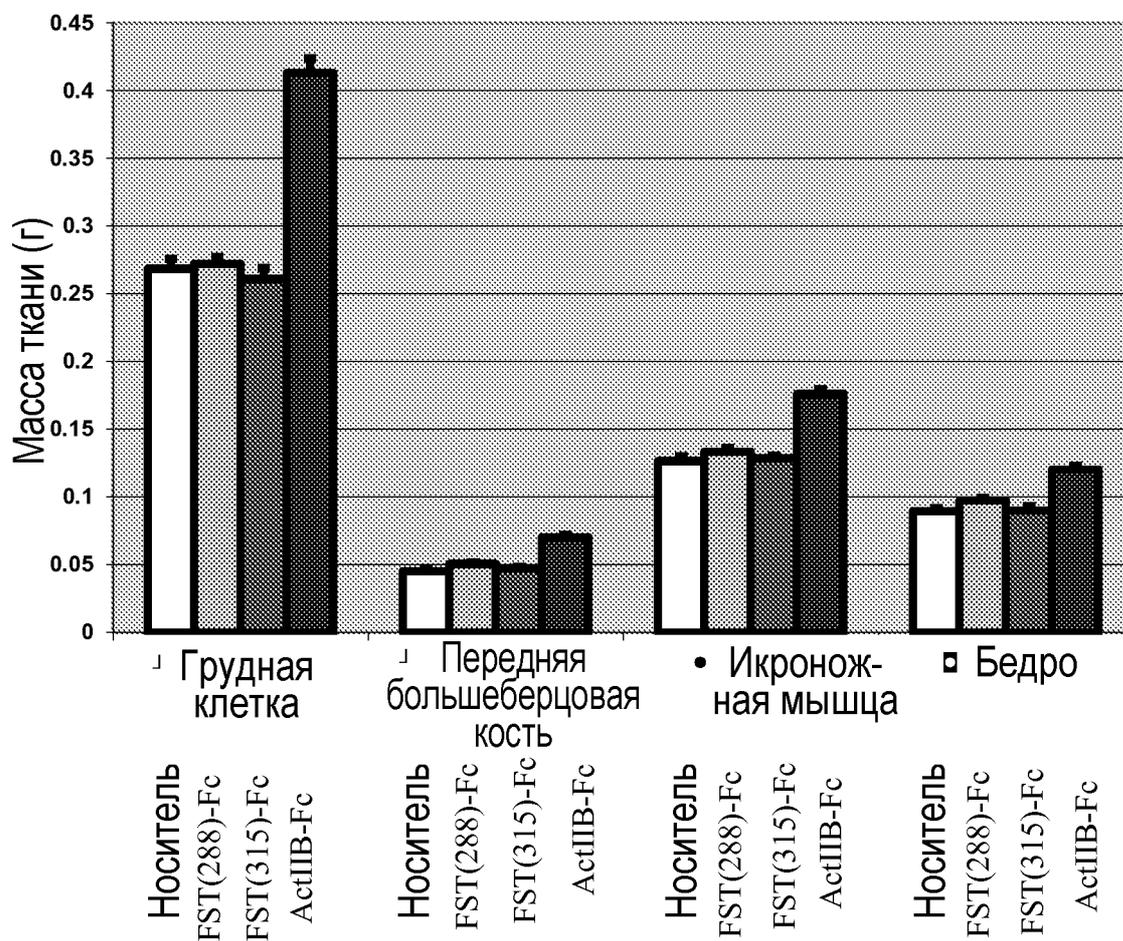
ФИГ. 2



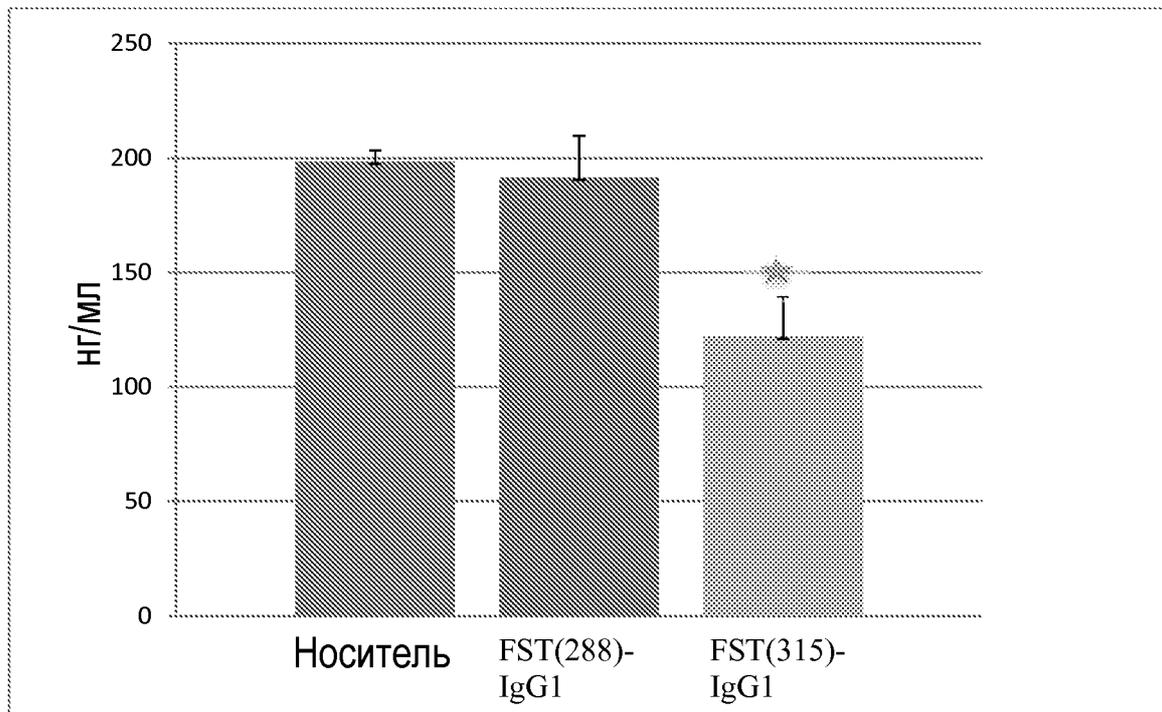
ФИГ. 3



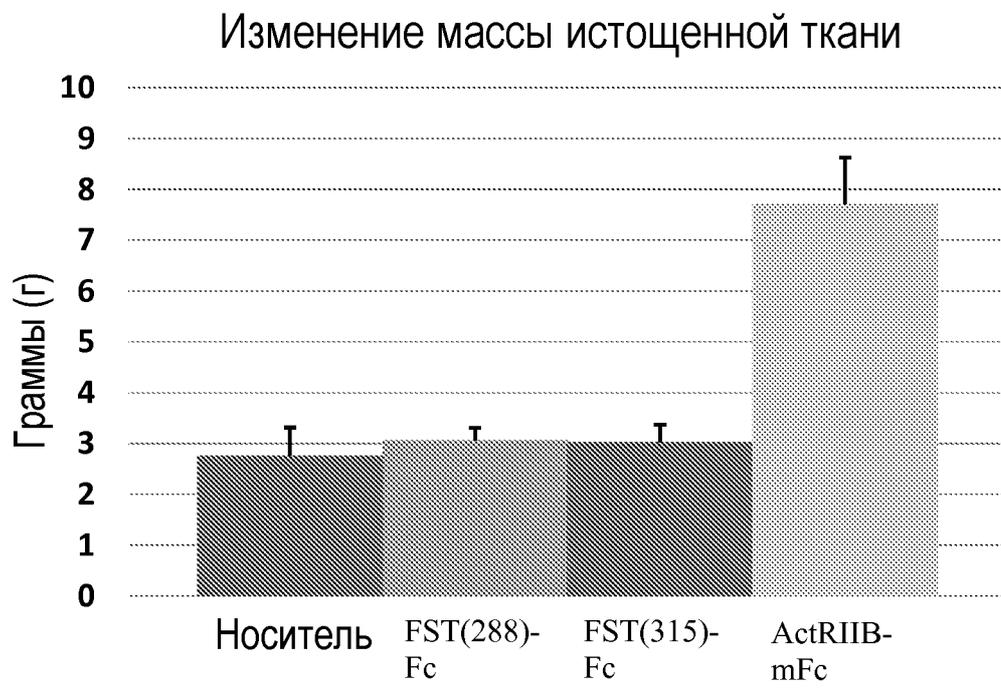
ФИГ. 4



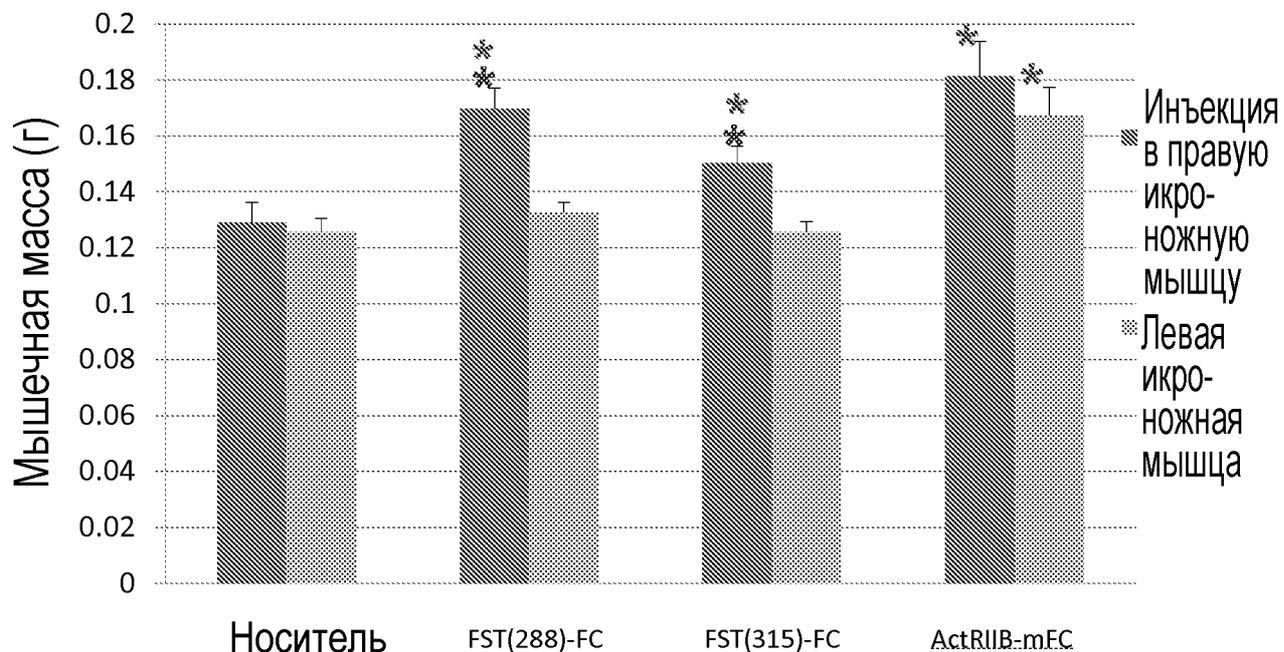
ФИГ. 5



ФИГ. 6



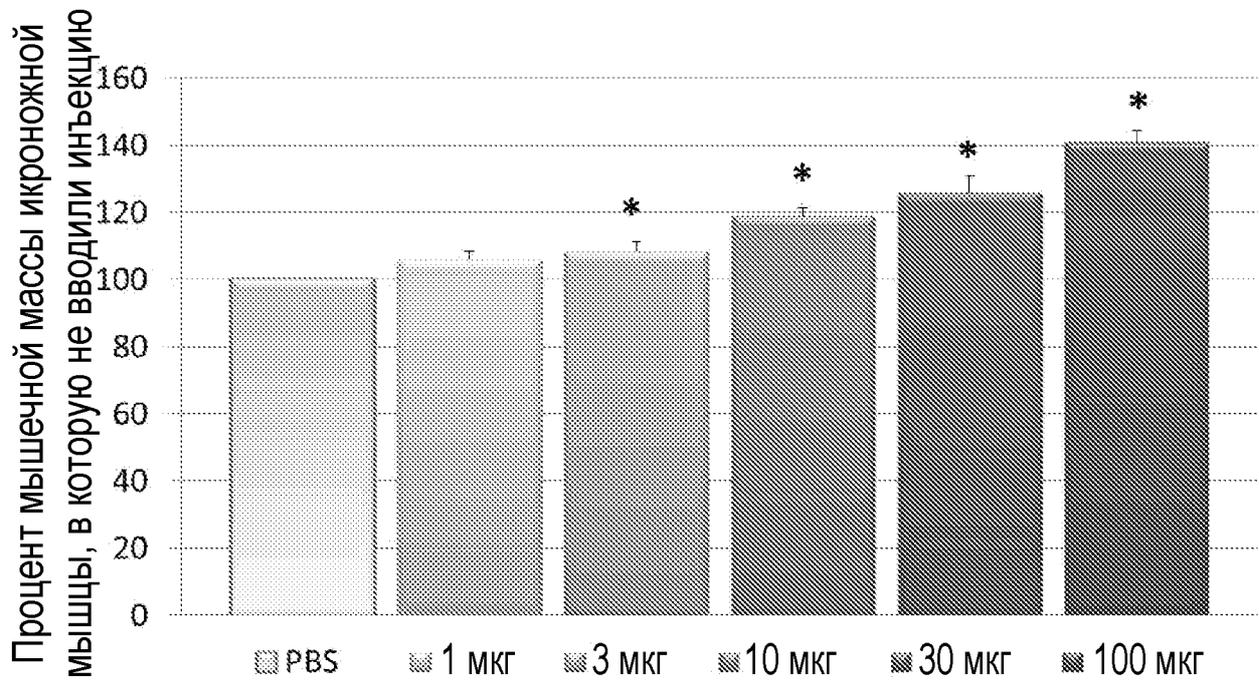
ФИГ. 7



Носитель FST(288)-FC FST(315)-FC ActRIIB-mEC
P < 0,05 по сравнению с TBS

P < 0,05 по сравнению с левой икроножной мышцей

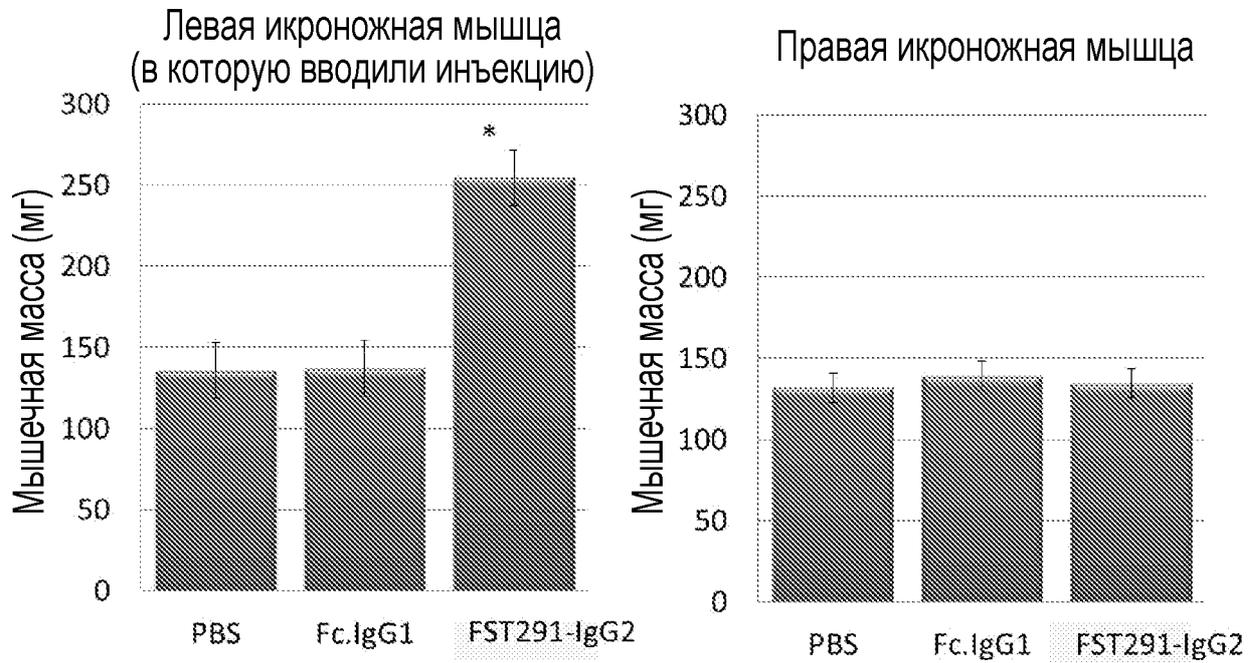
ФИГ. 8



• Икроножная мышца, в которую непосредственно инъецировали FST(288)-IgG1

* P < 0,05 по сравнению с PBS

ФИГ. 9



* =P <0,05 по сравнению с PBS

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202090632

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:
C07K 14/515 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
EAPATIS; ESPACENET; PATENTSCOPE

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
C07K 14/515

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	WO 2008/060156 A1 (UNIV ERASMUS MEDICAL CT; VAN LEEWEN JOHANES PETRUS TH) 22.05.2008, весь документ	1 – 16
A	WO 2013/151665 A2 (MODERNA THERAPEUTICS) 10.10.2013	1 – 16
A	WO 2009/158025 A2 (ACCELERON PHARMA) 30.12.2009	1 - 16

последующие документы указаны в продолжении

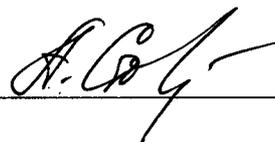
* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке
«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее
«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **25/06/2020**

Уполномоченное лицо:
Заместитель начальника Управления экспертизы
Начальник отдела химии и медицины



А.В.Чебан