

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091230** (13) **A2**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.09.30

(22) Дата подачи заявки
2007.12.18

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

**(54) АНТАГОНИСТЫ АКТИВИН-АСТРИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ
УРОВНЕЙ ЭРИТРОЦИТОВ**

(31) 60/875,682

(32) 2006.12.18

(33) US

(62) 201201199; 2007.12.18

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

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

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

(57) В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к композициям и способам повышения уровней эритроцитов и/или гемоглобина у позвоночных, в том числе у грызунов и приматов, в частности у людей.

202091230

A2

A2

202091230

АНТАГОНИСТЫ АКТИВИН-АСТRII И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УРОВНЕЙ ЭРИТРОЦИТОВ

ОПИСАНИЕ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

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

ПРЕДПОСЫЛКИ К СОЗДАНИЮ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

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

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

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

Лечение с использованием Еро обычно вызывает повышение гемоглобина примерно на 1-3 г/дл у здоровых людей в течение нескольких недель. При введении пациентам с анемией этот режим лечения зачастую обеспечивает значительное повышение уровней гемоглобина и эритроцитов и приводит к улучшению качества жизни и продлевает жизнь. Еро не является одинаково эффективным, и многие пациенты являются невосприимчивыми даже к высоким дозам (Horl et al. (2000) Nephrol Dial Transplant 15, 43-50). Более 50% пациентов со злокачественными заболеваниями имеют неадекватный ответ на Еро, приблизительно 10% на терминальной стадии заболевания почек имеют низкую реактивность (Glaspy et

al. (1997) J. Clin. Oncol. 15, 1218-1234; Demetri et al. (1998) J. Clin. Oncol. 16, 3412-3425) и менее 10% с миелодиспластическим синдромом реагируют благоприятно (Estey (2003) Curr Opin Hematol 10, 60-67). Некоторые факторы, в том числе воспаление, дефицит железа и витаминов, несоответствующий диализ, алюминиевая токсичность и гиперпаратирозидизм, могут давать плохой прогноз терапевтического ответа, молекулярные механизмы резистентности к Еро пока неясны.

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

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Частично, в описании показано, что антагонисты активина, а также антагонисты ActRIIa и ActRIIb, могут быть использованы для повышения уровней эритроцитов и гемоглобина. В частности, в описании показано, что растворимая форма ActRIIa действует как ингибитор активина и, при введении *in vivo*, повышает уровни эритроцитов в крови. Более слабый эффект наблюдался для растворимой формы ActRIIb, которая связывается с Активин-А с меньшей активностью, чем растворимый ActRIIa. Хотя растворимый ActRIIa и ActRIIb могут влиять на уровни эритроцитов посредством механизма, отличного от антагонизма активина, в описании, тем не менее, показано, что желаемые терапевтические средства могут быть выбраны на основе антагонизма активина или антагонизма ActRII, или обоих. Такие средства собирательно называются антагонистами активин-ActRII. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам применения антагонистов активин-ActRII, в том числе, например, активин-связывающих полипептидов ActRIIa, активин-связывающих полипептидов ActRIIb, антител к активину, антител к ActRIIa, антител к ActRIIb, низкомолекулярных молекул и аптамеров, нацеленных на активин-, ActRIIb- или ActRIIa и к нуклеиновым кислотам, которые снижают экспрессию активина, ActRIIb или ActRIIa, для повышения уровней эритроцитов и гемоглобина у пациентов и для лечения заболеваний, связанных с низкими уровнями эритроцитов или гемоглобина у пациентов. Как

описано в патентной заявке США серийный номер 11/603485, приведенной в описании в качестве ссылки, активин-ActRIIa антагонисты могут быть использованы для стимуляции роста костей и повышения плотности костей. Как раскрыто в описании, действие таких антагонистов на уровни эритроцитов является более быстрым и происходит при более низких дозах, чем действие антагонистов на кость. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам применения активин-ActRIIa антагонистов для повышения уровней эритроцитов или гемоглобина, не вызывая значительного повышения плотности костей. Например, способ может вызывать повышение плотности костей менее чем на 3%, 5%, 10% или 15%. Этот селективный эффект может достигаться, например, благодаря использованию более низких доз активин-ActRIIa антагониста, уменьшению частоты дозирования или благодаря использованию активин-ActRIIa антагониста с более коротким периодом полужизни в сыворотке, и частоту рассчитывают для получения более низкой концентрации в сыворотке.

В некоторых аспектах изобретение относится к полипептидам, содержащим растворимый активин-связывающий полипептид ActRII, который связывается с активином. Активин-связывающий полипептид может представлять собой полипептид ActRIIa или полипептид ActRIIb. Полипептиды ActRII могут быть введены в состав фармацевтической композиции, содержащей активин-связывающий полипептид ActRII и фармацевтически приемлемый носитель. Активин-связывающий полипептид ActRII может связываться с активином с K_D менее 1 микромоль или менее 100, 10 или 1 наномоль. Необязательно, активин-связывающий полипептид ActRII селективно связывается активин по сравнению с GDF11 и/или GDF8 и необязательно с K_D , которая по меньшей мере в 10 раз, 20 раз или 50 раз ниже для активина, чем для GDF11 и/или GDF8. Не привязываясь к конкретному механизму действия, предполагают, что такая степень селективности в отношении ингибирования активина по сравнению с ингибированием GDF11/GDF8 объясняет влияния на кость или эритропоэз, не оказывая постоянного определяемого воздействия на мышцы. Во многих вариантах осуществления полипептид ActRII выбран в таких дозах, при

которых происходит менее 15%, менее 10% или 5% повышение в мышцах и при которых достигаются желаемые воздействия на уровни эритроцитов. Чистота композиции может составлять по меньшей мере 95%, в отношении других полипептидных компонентов, по данным эксклюзионной хроматографии, необязательно, чистота композиции может составлять по меньшей мере 98%. Активин-связывающий полипептид ActRIIa, использующийся в таком препарате, может быть любым из полипептидов, описанных в настоящем описании, например, полипептидом с аминокислотной последовательностью, выбранной из последовательностей SEQ ID NO: 2, 3, 7 или 12, или с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из последовательностей SEQ ID NO: 2, 3, 7, 12 или 13. Активин-связывающий полипептид ActRIIa может содержать функционально-активный фрагмент природного полипептида ActRIIa, например, фрагмент, содержащий по меньшей мере 10, 20 или 30 аминокислот последовательности, выбранной из последовательностей SEQ ID NO: 1-3 или последовательности SEQ ID NO: 2, лишенной С-концевых аминокислот с 10 по 15 («концевой фрагмент»). Активин-связывающий полипептид ActRIIb, использующийся в таком препарате, может представлять собой любой полипептид, описанный в настоящем описании, например, полипептид с аминокислотной последовательностью, выбранной из последовательностей SEQ ID NO: 16, 17, 20 или 21, или с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из последовательностей SEQ ID NO: 16, 17, 20 или 21. Активин-связывающий полипептид ActRIIb может содержать функционально-активный фрагмент природного полипептида ActRIIb, например, фрагмент, содержащий по меньшей мере 10, 20 или 30 аминокислот последовательности SEQ ID NO: 15-17 или последовательность, лишенную аминокислот с 10 по 15 на С-конце («концевой фрагмент»), например, SEQ ID NO: 17.

Растворимый активин-связывающий полипептид ActRII может содержать одно или несколько изменений в аминокислотной

последовательности (например, в лиганд-связывающем домене) по сравнению с природным полипептидом ActRII. Примеры модифицированных полипептидов ActRIIa и ActRIIb представлены в WO 2006/012627, стр. 59-60 и стр. 55-58, соответственно, которые приведены в настоящем описании в качестве. Изменение аминокислотной последовательности, например, может изменять гликозилирование полипептида, если полипептид продуцируется в клетке млекопитающего, насекомого или другой эукариотической клетке, или изменять его протеолитическое расщепление по сравнению с природным полипептидом ActRII.

Активин-связывающий полипептид ActRII может представлять собой слитый белок, который имеет в качестве одного домена, полипептид ActRII, (например, лиганд-связывающую часть ActRIIa или ActRIIb) и один или несколько дополнительных доменов, которые обеспечивают желаемые свойства, такие как улучшенные фармакокинетические параметры, более удобную очистку, нацеливание на конкретные ткани и тому подобное, например, домен слитого белка может усиливать одно или несколько из следующих свойств: стабильность *in vivo*, период полужизни *in vivo*, поглощение/введение, локализацию или распределение в тканях, образование белковых комплексов, мультимеризацию слитого белка и/или очистку. Активин-связывающий слитый белок ActRII может содержать Fc-домен иммуноглобулина (дикого типа или мутантный) или сывороточный альбумин или другую полипептидную часть, которая обеспечивает желаемые свойства, такие как улучшенные фармакокинетические параметры, улучшенная растворимость или улучшенная стабильность. В предпочтительном варианте осуществления конструкция ActRII-Fc содержит относительно неструктурированный линкер, расположенный между доменом Fc и внеклеточным доменом ActRII. Этот неструктурированный линкер может соответствовать приблизительно 15 аминокислотной неструктурированной области на С-конце внеклеточного домена ActRII («концевой фрагмент») или может представлять собой искусственную последовательность из 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот, или иметь длину от 5 до 15, 20, 30, 50 или более аминокислот, которые относительно не зависят от вторичной

структуры, или смесь того и другого. Линкер может быть богат остатками глицина и пролина, а может, например, содержать единичную последовательность треонин/серин и глицинов, или повторяющиеся последовательности треонин/серин и глицинов (например, TG₄ или SG₄ синглеты или повторы). Слитый белок может содержать последовательность, облегчающую очистку, такую как эпитопную метку, FLAG-таг, полигистидиновую последовательность и GST слияние. Необязательно, растворимый полипептид ActRII содержит один или несколько модифицированных аминокислотных остатков, выбранных из гликозилированной аминокислоты, ПЭГилированной аминокислоты, фарнезилированной аминокислоты, ацетилированной аминокислоты, биотинилированной аминокислоты, аминокислоты, конъюгированной с липидной частью, и аминокислоты, конъюгированной с органическим средством получения производных. Фармацевтическая композиция также может содержать одно или несколько дополнительных соединений, таких как соединение, которое используют для лечения заболевания костей. Предпочтительно фармацевтическая композиция является по существу апиrogenной. В основном предпочтительно, чтобы белок ActRII экспрессировался в клеточной линии млекопитающих, который опосредует соответствующее природное гликозилирование белка ActRII таким образом, чтобы свести к минимуму вероятность неблагоприятного иммунного ответа у пациента. Успешно использовались клеточные линии человека и CHO, и также ожидается, что другие общепринятые экспрессионные системы млекопитающих будут пригодны.

Как раскрыто в описании, белки ActRIIa, обозначенные как ActRIIa-Fc (форма с минимальным линкером между частью ActRIIa и частью Fc), имеют желаемые свойства, в том числе селективное связывание с активином по сравнению с GDF8 и/или GDF11, высокую аффинность лигандного связывания и период полужизни в сыворотке более двух недель на модельных животных. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полипептидам ActRII-Fc и фармацевтическим композициям, содержащим такие полипептиды и фармацевтически приемлемый эксципиент.

В некоторых аспектах в описании представлены нуклеиновые

кислоты, кодирующие растворимый активин-связывающий полипептид ActRII, такой как полипептид ActRIIa или ActRIIb. Выделенный полинуклеотид может содержать кодирующую последовательность растворимого активин-связывающего полипептида ActRII, например, описанного выше. Например, выделенная нуклеиновая кислота может содержать последовательность, кодирующую внеклеточный домен (например, лиганд-связывающий домен) ActRII и последовательность, которая бы кодировала часть или весь трансмембранный домен и/или цитоплазматический домен ActRII, но со стоп-кодоном, расположенным в трансмембранном домене или цитоплазматическом домене или расположенным между внеклеточным доменом и трансмембранным доменом или цитоплазматическим доменом. Например, выделенный полинуклеотид может содержать полноразмерную полинуклеотидную последовательность ActRIIa, такую как SEQ ID NO: 4 или 5, или полноразмерную полинуклеотидную последовательность ActRIIb, такую как SEQ ID NO: 18, или частично усеченный вариант ActRIIa или ActRIIb, указанный выделенный полинуклеотид дополнительно содержит кодон терминации транскрипции по меньшей мере за шестьсот нуклеотидов до 3'-конца или расположенный иным образом, так, чтобы трансляция полинуклеотида приводила к образованию внеклеточного домена, необязательно слитого с усеченной частью полноразмерного ActRII. Предпочтительной последовательностью нуклеиновой кислоты ActRIIa является SEQ ID NO: 14. Раскрытые в описании нуклеиновые кислоты могут быть функционально связаны с промотором экспрессии, и в описании представлены клетки, трансформированные такими рекомбинантными полинуклеотидами. Предпочтительно клетки представляют собой клетки млекопитающих, например, клетки CHO.

В некоторых аспектах изобретение относится к способам получения растворимого активин-связывающего полипептида ActRII. Такой способ может включать экспрессию любой нуклеиновой кислоты (например, SEQ ID NO: 4, 5, 14, 18 или 19), раскрытой в описании, в подходящей клетке, такой как ооцит китайского хомячка (CHO). Такой способ может включать: а) культивирование клеток в условиях, подходящих для экспрессии растворимого

полипептида ActRII, где указанные клетки трансформированы экспрессионной конструкцией растворимого ActRII; и b) восстановление растворимого полипептида ActRII, экспрессированного таким образом. Растворимые полипептиды ActRII могут быть восстановлены в виде сырых, частично очищенных или высокоочищенных фракций. Очистка может достигаться серией стадий очистки, в том числе, например, одной, двумя или тремя или более из следующих стадий в любом порядке: хроматографией с белком А, анионообменной хроматографией (например, Q сефароза), хроматографией гидрофобного взаимодействия (например, фенилсефароза), эксклюзионной хроматографией и катионообменной хроматографией.

В некоторых аспектах раскрытый в описании активин-ActRII антагонист, такой как растворимый активин-связывающий полипептид ActRIIa или растворимый активин-связывающий полипептид ActRIIb, может быть использован в способе активации продукции эритроцитов или повышения уровней эритроцитов у пациента. В некоторых вариантах осуществления в описании представлены способы лечения нарушения, связанного с низким количеством эритроцитов или низкими уровнями гемоглобина (например, анемии), или активации образования эритроцитов, у пациентов. Способ может включать введение пациенту эффективного количества антагониста активин-ActRII. В некоторых аспектах в настоящем описании представлено применение антагонистов активин-ActRII для получения лекарственного средства для лечения нарушения или состояния, раскрытого в описании.

В некоторых аспектах изобретение относится к способу идентификации средства, которое стимулирует образование эритроцитов. Такой способ включает: а) идентификацию тестируемого вещества, которое связывается с активином или лиганд-связывающим доменом полипептида ActRII; и b) оценку действия этого вещества на уровни эритроцитов, гемоглобина и/или уровни клеток-предшественников эритроцитов (например, уровни ретикулоцитов).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг.1 показана очистка ActRIIa-hFc, экспрессированного

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

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

На фиг.3 показано действие ActRIIa-hFc на число эритроцитов у самок нечеловекообразных приматов. Самкам яванских макак (четыре группы по пять обезьян в каждой) вводили плацебо или 1 мг/кг, 10 мг/кг или 30 мг/кг ActRIIa-hFc на 0 день, 7 день, 14 день и 21 день. На фиг.3А показаны количества эритроцитов (RBC). На фиг.3В показаны уровни гемоглобина. Статистическая значимость относительно фонового значения для каждой группы лечения. На 57 день в каждой группе осталось две обезьяны.

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

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

На фиг.6 показано действие ActRIIa-hFc на количество ретикулоцитов у самок нечеловекообразных приматов. Яванским

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

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

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

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

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

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

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

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

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Обзор

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

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

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

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

Два родственных рецептора II типа (ActRII), ActRIIa и ActRIIb, были идентифицированы как рецепторы II типа активинов (Mathews and Vale, 1991, *Cell* 65:973-982; Attisano et al.,

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

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

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

Приведенные в настоящем описании данные в отношении нечеловекообразных приматов также воспроизводятся у мышей, крыс

и людей, и, следовательно, в этом описании представлены способы применения полипептидов ActRII и других антагонистов активин-ActRII для стимуляции образования эритроцитов и повышения уровней эритроцитов у млекопитающих от грызунов до людей. Антагонисты активин-ActRII включают, например, активин-связывающие растворимые полипептиды ActRIIa, активин-связывающие растворимые полипептиды ActRIIb, антитела, которые связываются с активином (в частности, А или В субъединицами активина, также называемыми β A или β B) и нарушают ActRIIa и/или ActRIIb связывание, антитела, которые связываются с ActRIIa и нарушают связывание с активином, антитела, которые связываются с ActRIIb и нарушают связывание с активином, белки, не являющиеся антителами, выбранные для связывания с активином, ActRIIb или ActRIIa (смотри, например, WO/2002/088171, WO/2006/055689 и WO/2002/032925 в качестве примеров таких белков и способов их создания и выбора), рандомизированные пептиды, выбранные для связывания с активином, ActRIIb или ActRIIa, зачастую присоединенные к домену Fc. Два различных белка (или их части), обладающие связывающей активностью с активином, ActRIIb или ActRIIa, особенно вещества, связывающиеся с активином, которые блокируют I тип (например, растворимый рецептор активина I типа) и II тип (например, растворимый рецептор активина II типа) сайтов связывания, соответственно, могут быть соединены вместе с образованием бифункциональной связывающей молекулы. Аптамеры нуклеиновых кислот, малые молекулы и другие вещества, которые ингибируют сигнальную ось активин-ActRII включены в качестве антагонистов активин-ActRII. Различные белки обладают антагонистической активностью в отношении активин-ActRII, в том числе ингибин (т.е. альфа субъединица ингибина), хотя ингибин не является универсальным антагонистом активина во всех тканях, фоллистатин (например, фоллистатин-288 и фоллистатин-315), FSRP, активин С, альфа(2)-макроглобулин и M108A (замена метионина на аланин в положении 108) мутантный активин А. В основном альтернативные формы активина, в частности, формы с изменениями в связывающем домене рецепторов I типа, могут связываться с рецепторами II

типа и не смогут образовывать активный тройной комплекс, таким образом, действуя как антагонисты. Дополнительно, нуклеиновые кислоты, такие как антисмысловые молекулы, siRNA или рибозимы, которые ингибируют активин А, В, С или Е, или, в частности, экспрессию ActRIIa или ActRIIb, могут быть использованы в качестве антагонистов активин-ActRII. Используемый антагонист активин-ActRII может проявлять селективность в отношении ингибирования опосредованного активин-сигнального пути по сравнению с другими представителями семейства TGF-бета и, в частности, в отношении GDF8 и GDF11.

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

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

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

Способы по изобретению могут включать стадии сравнения последовательностей друг с другом, в том числе сравнения последовательности дикого типа с одной или несколькими

мутантными (вариантами последовательности). Такое сравнение обычно предусматривает выравнивания полимерных последовательностей, например, используя программы выравнивания последовательностей и/или алгоритмы, которые хорошо известны из уровня техники (например, BLAST, FASTA и MEGALIGN и так далее). Специалисту в данной области будет понятно, что в таких выравниваниях, где мутация содержит вставку остатка или делецию, выравнивание последовательности будет вводить «пропуск» (обычно представленный тире или «А») в полимерной последовательности, не содержащей вставочный или делеционный остаток.

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

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

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

2. Полипептиды ActRII

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

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

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

Последовательность белка-предшественника ActRIIa человека представляет собой:

MGAAAKLAFAVFLISCSSGAILGRSETQECLEFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRR
HCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP
EMEVTQPTSNPVTPKPPYYNILLYSLVPLMLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLVPTQDPGPPPPS
PLLGLKPLQLLEVKARGRFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKHENIL
QFIGAEKRGTSVDVDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVVSWNELCHIAETMARGLAYLHEDIPGL

KDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFGLALKFEAGKSAGDTHGQVGTRRYMAPEVLEG
 AINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELASRCTAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEDMQEYVVVHKK
 KRPVLRDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMQRLTNIITTEDIVTVVT
 MVTNVDFPPKESSL (SEQ ID NO: 1).

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

Растворимая (внеклеточная) процессированная полипептидная последовательность ActRIIa человека представляет собой:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGD~~KDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGC~~
 WLDDINCYDR~~TD~~CEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ
 ID NO: 2).

Концевой фрагмент на С-конце внеклеточного домена подчеркнут. Последовательность с делецированным «концевым фрагментом» (последовательность $\Delta 15$) представляет собой:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGD~~KDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGC~~
 WLDDINCYDR~~TD~~CEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM (SEQ ID NO: 3).

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-предшественник ActRIIa человека, представляет собой (нуклеотиды 164–1705 входящий номер Genbank NM_001616):

ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGCCGTCTTTCTTATCTCCTGTTCTTCAGGTG
 CTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACA
 GAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCGTGTTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTTGTTTTG
 CTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCCTATTGAAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATA
 TCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTTTGTT
 GCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCAGAGATGGAAGTCACACAGC
 CCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCTATTACAACATCCTGCTCTATTCCCTTGGTGC
 CACTTATGTTAATTGCGGGGATTGTCATTTGTGCATTTTGGGTGTACAGGCATCACAAAGATGG
 CCTACCCTCCTGTACTTGTTCCTCAACTCAAGACCCAGGACCACCCACCTTCTCCATTACTAG
 GGTGAAACCACTGCAGTTATTAGAAGTGAAAGCAAGGGGAAGATTTGGTTGTGTCTGGAAAG
 CCCAGTTGCTTAACGAATATGTGGCTGTCAAAATATTTCCAATACAGGACAAACAGTCATGGC
 AAAATGAATACGAAGTCTACAGTTTGCCTGGAATGAAGCATGAGAACATATTACAGTTCATTG
 GTGCAGAAAAACGAGGCACCAGTGTGTGATGTGGATCTTTGGCTGATCACAGCATTTTCATGAAA
 AGGGTTCACTATCAGACTTTCTTAAGGCTAATGTGGTCTCTTGGAAATGAACTGTGTCAATATG
 CAGAAACCATGGCTAGAGGATTGGCATATTTACATGAGGATATACCTGGCCTAAAAGATGGCC
 ACAAACCTGCCATATCTCACAGGGACATCAAAAGTAAAAATGTGCTGTTGAAAAACAACCTGA

CAGCTTGCATTGCTGACTTTGGGTTGGCCTTAAAATTTGAGGCTGGCAAGTCTGCAGGCGATA
 CCCATGGACAGGTGGTACCCGGAGGTACATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTGCTATAAACT
 TCCAAAGGGATGCATTTTTTGAGGATAGATATGTATGCCATGGGATTAGTCCTATGGGAACTGG
 CTTCTCGCTGTACTGCTGCAGATGGACCTGTAGATGAATACATGTTGCCATTTGAGGAGGAAA
 TTGGCCAGCATCCATCTCTTGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGTGCATAAAAAAAGAGGCCTG
 TTTTAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGAATGGCAATGCTCTGTGAAACCATTTGAAGAAT
 GTTGGGATCACGACGCAGAAGCCAGGTATCAGCTGGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGA
 TGCAGAGACTAACAAATATTATTACCACAGAGGACATTGTAACAGTGGTCACAATGGTGACAA
 ATGTTGACTTTTCCTCCCAAAGAATCTAGTCTATGA (SEQ ID NO: 4).

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

АТАСТТGGTAGATCAGAAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAG
 ACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGTAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTT
 TTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCCATTGAAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATG
 ATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTTT
 GTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCAGAGATGGAAGTCACAC
 AGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCC (SEQ ID NO: 5).

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

Термин «полипептид ActRIIb» включает полипептиды, содержащие любой природный полипептид представителей семейства ActRIIb, а также любой их вариант (в том числе мутанты, фрагменты, слияния и пептидомиметические формы), который сохраняет полезную активность. Смотри, например, WO/2006/012627. Например, полипептиды ActRIIb включают

полипептиды, полученные из последовательности, любого известного ActRIIb с последовательностью, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности полипептида ActRIIb и, необязательно, идентична по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или более. Например, полипептид ActRIIb по изобретению может связываться и ингибировать функцию белка ActRIIb и/или активина. Полипептид ActRIIb может быть выбран по активности стимуляции образования эритроцитов *in vivo*. Примеры полипептидов ActRIIb включают полипептид-предшественник ActRIIb человека (SEQ ID NO: 15) и растворимые полипептиды ActRIIb человека (например, SEQ ID NO: 16, 17, 20 и 21).

Последовательность белка-предшественника ActRIIb человека представляет собой:

MTAPWVALALLWGSLWP**GS**SGRGEAETRECIYYNANWELERTN**Q**SGLERCEGEQDKRLH
CYASWANSSGTIELVKKG**CWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGG**
PEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPPSPL
VGLKPLQLLEIKARGRFGCVWKAQLMNDFAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLLQF
IAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGKNIITWNELCHVAETMSRGLSYLHEDVPWCRG
EGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLAVERFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGA
INFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVVHKKM
RPTIKDHWLKHNPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTSDCLVSLVTS
VTNVDLPPKESSI (SEQ ID NO: 15).

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

Растворимая (внеклеточная) процессированная полипептидная последовательность ActRIIb человека представляет собой:

SGRGEAETRECIYYNANWELERTN**Q**SGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKG
CWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT (SEQ
ID NO: 16).

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

SGRGEAETRECIYYNANWELERTN**Q**SGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKG
CWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (SEQ ID NO: 17).

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

ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGGCCCCGGCTCTG
GGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCAACTGGGAGCTGGAGCGCA
CCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCT
CCTGGGCCAACAGCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCA
ACTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTACTTCTGCTGCT
GTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTTGCCAGAGGCTGGGGGCCCGGAAGTCA
CGTACGAGCCACCCCCGACAGCCCCCACCTGCTCACGGTGCTGGCCTACTCACTGCTGCCCA
TCGGGGGCCTTTCCCTCATCGTCCTGCTGGCCTTTTGGATGTACCGGCATCGCAAGCCCCCCT
ACGGTCATGTGGACATCCATGAGGACCCTGGGCCTCCACCACCATCCCCCTCTGGTGGGCCTGA
AGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAAGGCTCGGGGGCGCTTTGGCTGTGTCTGGAAGGCCCAGC
TCATGAATGACTTTGTAGCTGTCAAGATCTTCCCACTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAGTG
AACGGGAGATCTTCAGCACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCTGCTACAGTTCATTGCTGCCG
AGAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAGCTGTGGCTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCT
CCCTCACGGATTACCTCAAGGGGAACATCATCACATGGAACGAACCTGTGTCATGTAGCAGAGA
CGATGTCACGAGGCCTCTCATACTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGCCGTGGCGAGGGCCACA
AGCCGTCTATTGCCACAGGGACTTTAAAAGTAAGAATGTATTGCTGAAGAGCGACCTCACAG
CCGTGCTGGCTGACTTTGGCTTGGCTGTTCGATTTGAGCCAGGGAAACCTCCAGGGGACACCC
ACGGACAGGTAGGCACGAGACGGTACATGGCTCCTGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTTCC
AGAGAGATGCCTTCCTGCGCATTGACATGTATGCCATGGGGTTGGTGCTGTGGGAGCTTGTGT
CTCGCTGCAAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATGAGTACATGCTGCCCTTTGAGGAAGAGATTG
GCCAGCACCTTCGTTGGAGGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTGACACAAGAAGATGAGGCCACCA
TTAAAGATCACTGGTTGAAACACCCGGGCCTGGCCCAGCTTTGTGTGACCATCGAGGAGTGCT
GGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTGTCCGCGGGCTGTGTGGAGGAGCGGGTGTCCCTGATTC
GGAGGTCGGTCAACGGCACTACCTCGGACTGTCTCGTTTCCCTGGTGACCTCTGTCACCAATG
TGGACCTGCCCCCTAAAGAGTCAAGCATCTAA (SEQ ID NO: 18) .

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

TCTGGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCAACTGGGAGC
TGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACT
GCTACGCCTCCTGGGCCAACAGCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAG
ATGACTTCAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTACT
TCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTTGCCAGAGGCTGGGGGCC

CGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCGACAGCCCCCACC (SEQ ID NO: 19).

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

медоносной пчелы (SEQ ID NO: 8) или лидерную последовательность активатора тканевого плазминогена (TPA) (SEQ ID NO: 9).

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

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

последовательность функционально активного варианта по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из последовательностей SEQ ID NO: 17 или 18.

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

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении рассматриваются специфические мутации полипептидов ActRII для изменения гликозилирования этого полипептида. Такие мутации могут быть выбраны для введения или элиминации одного или нескольких сайтов гликозилирования, таких как O-связанные или N-связанные сайты гликозилирования. Сайты распознавания аспарагин-связанного гликозилирования в основном содержат трипептидную последовательность, аспарагин-X-треонин или аспарагин-X-серин (где «X» представляет собой любую аминокислоту), которая специфически распознается

соответствующими клеточными ферментами гликозилирования. Изменение также может осуществляться путем добавления или заменой одного или нескольких остатков серина или треонина к последовательности полипептида ActRII дикого типа (для О-связанных сайтов гликозилирования). Целый ряд аминокислотных замен или делеций в одном или как в первом, так и в третьем положениях сайта распознавания гликозилирования (и/или аминокислотной делеции во втором положении) не приводит к гликозилированию в модифицированной трипептидой последовательности. Другим способом повышения количества углеводных частей на полипептиде ActRII является химическое или ферментативное соединение гликозидов с полипептидом ActRII. В зависимости от используемого способа соединения, сахар(а) могут быть присоединены к (а) аргинину и гистидину; (b) свободным карбоксильным группам; (с) свободным сульфгидрильным группам, таким как группы цистеина; (d) свободным гидроксильным группам, таким как группы серина, треонина или гидроксипролина; (е) ароматическим остаткам, таким как остатки фенилаланина, тирозина или триптофана; или (f) амидной группе глутамина. Удаление одной или нескольких углеводных частей, присутствующих на полипептиде ActRII, может осуществляться химически и/или ферментативно. Химическое гликозилирование включает, например, воздействие на полипептид ActRII соединением трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентным соединением. Эта обработка в результате приводит к расщеплению большинства или всех сахаров, за исключением связывающего сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), оставляя аминокислотную последовательность интактной. Ферментативное расщепление углеводных частей на полипептидах ActRII может достигаться благодаря использованию целого ряда эндо- и экзогликозидаз, описанных Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. Последовательность полипептида ActRII может быть скорректирована соответствующим образом, в зависимости от типа используемой системы экспрессии, поскольку клетки млекопитающих, дрожжей, насекомых и растений могут иметь различные профили гликозилирования, на которые может влиять

аминокислотная последовательность пептида. В основном белки ActRII для использования у людей могут быть экспрессированы в клеточных линиях млекопитающих, которые обеспечивают надлежащее гликозилирование, таких как клеточные линии HEK293 или CHO, хотя ожидается, что также подойдут и другие экспрессионные клеточные линии млекопитающих.

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

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

Могут быть получены варианты комбинаторного происхождения, которые имеют селективную или в целом повышенную эффективность в отношении природного полипептида ActRII. Аналогичным образом

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

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

Существует много способов, с помощью которых библиотека потенциальных гомологов может быть получена из вырожденной олигонуклеотидной последовательности. Химический синтез вырожденной генной последовательности можно проводить в автоматическом ДНК синтезаторе, и синтетические гены затем могут быть лигированы в соответствующий вектор экспрессии. Синтез вырожденных олигонуклеотидов хорошо известен из уровня техники (смотри, например, Narang, SA (1983) Tetrahedron 39:3;

Itakura et al., (1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura et al., (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al., (1983) Nucleic Acid Res. 11:477). Такие методики были использованы в направленной эволюции других белков (смотри, например, Scott et al., (1990) Science 249:386-390; Roberts et al., (1992) PNAS USA 89:2429-2433; Devlin et al., (1990) Science 249:404-406; Cwirla et al., (1990) PNAS USA 87:6378-6382; а также патенты США №№ 5223409, 5198346 и 5096815).

Альтернативно другие формы мутагенеза могут быть использованы для получения комбинаторной библиотеки. Например, варианты полипептида ActRII могут быть получены и выделены из библиотеки путем скрининга, с использованием, например, аланин-сканирующего мутагенеза и подобного (Ruf et al., (1994) Biochemistry 33:1565-1572; Wang et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099; Balint et al., (1993) Gene 137:109-118; Grodberg et al., (1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601; Nagashima et al., (1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892; Lowman et al., (1991) Biochemistry 30:10832-10838; и Cunningham et al., (1989) Science 244:1081-1085); с помощью сканирования линкером (Gustin et al., (1993) Virology 193:653-660; Brown et al., (1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652; McKnight et al., (1982) Science 232:316); с помощью насыщающего мутагенеза (Meyers et al., (1986) Science 232:613); с помощью ПЦР мутагенеза (Leung et al., (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19) или случайным мутагенезом, в том числе, химическим мутагенезом и тому подобным (Miller et al., (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; и Greener et al., (1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34). Сканирование линкером, в частности, в комбинаторных условиях, представляет собой эффективный способ идентификации процессированных (биологически активных) форм полипептидов ActRII.

Большое разнообразие методик известно из уровня техники для скрининга генных продуктов комбинаторных библиотек, созданных с помощью точковых мутаций и усечений, и, в этом

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

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

В некоторых аспектах функционально активные варианты

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

выведения почками или другого фармакокинетического эффекта. Слияния с частью Fc иммуноглобулина известны для придания желаемых фармакокинетических свойств широкому диапазону белков. Подобным образом, слияния с сывороточным альбумином человека могут придать желаемые свойства. Другие слитые домены, которые могут быть выбраны, включают в себя домены мультимеризации (например, димеризации, тетрамеризации) и функциональные домены (которые придают дополнительную биологическую функцию, такую как дополнительная стимуляция мышечного роста).

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

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD(A) VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A) VSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN(A) HYTKSLSLSPGK*

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

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSTGIELVKKG CWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTKSLSLSPGK

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

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

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

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

3. Нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды ActRII

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

В некоторых аспектах дополнительно подразумевается, что представленные нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды ActRIIa, включают нуклеиновые кислоты, которые являются вариантами последовательностей SEQ ID NO: 4 или 5. В некоторых аспектах дополнительно подразумевается, что представленные нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды ActRIIb, включают нуклеиновые кислоты, которые являются вариантами последовательностей SEQ ID NO: 18 или 19. Варианты нуклеиновых последовательностей включают последовательности, которые отличаются одной или несколькими нуклеотидными заменами, добавлениями или делециями, например, аллельные варианты.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к выделенным или рекомбинантным последовательностям нуклеиновых кислот, которые по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны последовательностям SEQ ID NO: 4, 5, 18 или 19. Специалисту в данной области будет понятно, что последовательности нуклеиновых кислот, комплементарные последовательностям SEQ ID NO: 4, 5, 18 или 19 и вариантам

последовательностей SEQ ID NO: 4, 5, 18 или 19, также входят в объем настоящего изобретения. В дополнительных вариантах осуществления последовательности нуклеиновых кислот по изобретению могут быть выделенными, рекомбинантными и/или слитыми с гетерологичной нуклеиновой последовательностью, или в библиотеке ДНК.

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

Выделенные нуклеиновые кислоты, которые отличаются от нуклеиновых кислот, представленных в последовательностях SEQ ID

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

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть функционально связаны с одной или несколькими регуляторными нуклеотидными последовательностями в экспрессионной конструкции. Регуляторные нуклеотидные последовательности в основном будут соответствовать клетке-хозяину, используемой для экспрессии. Большое число различных типов соответствующих векторов экспрессии и подходящих регуляторных последовательностей известно из уровня техники для целого ряда клеток-хозяев. В основном указанная одна или несколько регуляторных последовательностей могут включать, но ими не ограничиваться, промоторные последовательности, лидерные или сигнальные последовательности, сайты связывания с рибосомой, последовательности начала и терминации транскрипции, последовательности начала и терминации трансляции и энхансерные или активаторные последовательности. Конститутивные или индуцибельные промоторы, известные из уровня техники, входят в объем настоящего изобретения. Промоторы могут быть либо природными, либо гибридными промоторами, которые сочетают в

себе элементы более одного промотора. Экспрессионная конструкция может находиться в клетке на эписоме, такой как плаزمид, или экспрессионная конструкция может быть встроена в хромосому. В предпочтительном варианте осуществления вектор экспрессии содержит селектируемый маркерный ген для возможности селекции трансформированных клеток-хозяев. Селектируемые маркерные гены хорошо известны из уровня техники и будут изменяться вместе с используемой клеткой-хозяином.

В некоторых аспектах изобретения рассматриваемые нуклеиновые кислоты находятся в векторе экспрессии, содержащем нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид ActRII и функционально связанную по меньшей мере с одной регуляторной последовательностью. Регуляторные последовательности известны из уровня техники и их выбирают для направления экспрессии полипептида ActRII. Таким образом, термин регуляторная последовательность включает промоторы, энхансеры и другие элементы, контролирующие экспрессию. Примеры регуляторных последовательностей описаны у Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990). Например, любая из большого числа разнообразных последовательностей, контролирующих экспрессию, которые контролируют экспрессию ДНК последовательности в случае функционального связывания с ней, может быть использована в этих векторах для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих полипептид ActRII. Такие подходящие последовательности, контролирующие экспрессию, включают, например, ранний и поздний промоторы SV40, tet промотор, немедленно-ранний промотор аденовируса или цитомегаловируса, RSV промоторы, lac систему, trp систему, TAC или TRC систему, T7 промотор, экспрессия которого направляется T7 РНК полимеразой, основной оператор и промоторные области фага лямбда, контрольные участки для покровного белка fd, промотор для 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, промоторы кислой фосфатазы, например, Pho5, промоторы фактора спаривания дрожжей α , полигедронный промотор бакуловирусной системы и другие последовательности, известные для контроля

экспрессии генов прокариотических или эукариотических клеток или их вирусов и различные их сочетания. Должно быть понятно, что конструкция вектора экспрессии может зависеть от таких факторов, как выбор трансформируемой клетки-хозяина и/или типа белка, экспрессия которого желательна. Более того, число копий вектора, способность контролировать такое число копий и экспрессия любого другого белка, кодируемого этим вектором, например, маркеров антибиотиков, также должно рассматриваться.

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

Некоторые векторы экспрессии млекопитающих содержат как прокариотические последовательности для облегчения размножения вектора в бактериях, так и одну или несколько эукариотических транскрипционных единиц, которые экспрессируются в эукариотических клетках. Векторы, производные от pcDNAI/amp, pcDNAI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo и pHyg, являются примерами векторов экспрессии млекопитающих, подходящих для трансфекции эукариотических клеток. Некоторые из этих векторов модифицированы последовательностями бактериальных плазмид, например, pBR322, для облегчения репликации и отбора по резистентности к лекарственным средствам, как в прокариотических, так и в эукариотических клетках. Альтернативно производные вирусов, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота (BPV-1) или вирус Эпштейна-Барра (pHEBo, pREP-производные и p205), могут быть использованы для транзитной

экспрессии белков в эукариотических клетках. Примеры других вирусных (в том числе ретровирусных) экспрессионных систем можно найти далее в описании систем доставки для генной терапии. Различные способы, используемые в получении плазмид и в трансформации организмов-хозяев, хорошо известны из уровня техники. По другим подходящим экспрессионным системам как для прокариотических, так и для эукариотических клеток, а также общие рекомбинантные методики смотри *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3rd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). В некоторых случаях может быть желательно экспрессировать рекомбинантные полипептиды с помощью использования бакуловирусной экспрессионной системы. Примеры таких бакуловирусных экспрессионных систем включают pVL-производные векторы (такие как pVL1392, pVL1393 и pVL941), pAcUW-производные векторы (такие как pAcUW1) и pBlueBac-производные векторы (такие как pBlueBac III, содержащий β -gal).

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

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

млекопитающих. Другие подходящие клетки-хозяева известны специалистам в данной области.

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

желаемых результатов у мышей, крыс и нечеловекообразных приматов.

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

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

4. Альтернативные антагонисты активина и ActRII

Данные, представленные в настоящем описании, демонстрируют, что антагонисты сигнального пути активин-ActRII могут быть использованы для повышения уровня эритроцитов или гемоглобина. Хотя растворимые полипептиды ActRIIa и ActRIIb и,

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

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

Используя иммуногены, полученные из полипептида ActRIIa, полипептида ActRIIb или полипептида активина, антибелковые/антипептидные антисыворотки или моноклональные антитела могут быть получены с помощью стандартных протоколов (смотри, например, Antibodies: A Laboratory Manual ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Млекопитающее, такое как мышь, хомяк или кролик может быть иммунизировано иммуногенной формой полипептида активина, ActRIIa или ActRIIb, антигенным фрагментом, который способен вызывать антительный ответ, или слитым белком. Методики придания иммуногенности белку или пептиду включают

конъюгирование с носителями или другие методики, известные из уровня техники. Иммуногенную часть полипептида ActRII или активина можно вводить в присутствии адъюванта. Развитие иммунизации можно наблюдать путем определения титров антител в плазме или сыворотке. Стандартные ELISA или другие иммуноанализы могут быть использованы с иммуногеном в качестве антигена для оценки уровней антител.

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

Термин «антитело», используемый в настоящем описании, включает целые антитела, например, любого изотипа (IgG, IgA, IgM, IgE и тому подобное), и включает фрагменты или домены иммуноглобулинов, которые взаимодействуют с выбранным антигеном. Антитела могут быть фрагментированы с использованием общепринятых методик, и эти фрагменты подвергают скринингу на эффективность и/или взаимодействие со специфическим эпитопом, представляющим интерес. Таким образом, этот термин включает сегменты протеолитически расщепленных или полученных

рекомбинантными способами частей молекулы антитела, которые способны к селективному взаимодействию с конкретным белком. Неограничивающие примеры таких протеолитических и/или рекомбинантных фрагментов включают Fab, F(ab')₂, Fab', Fv и одноцепочечные антитела (scFv), содержащие домен V[L] и/или V[H], соединенные пептидным линкером. scFv могут быть ковалентно или нековалентно связаны с получением антител, имеющих два или несколько сайтов связывания. Термин антитело также включает поликлональные, моноклональные или другие очищенные препараты антител и рекомбинантные антитела. Термин «рекомбинантное антитело» означает антитело, или антиген-связывающий домен иммуноглобулина, экспрессируемое из нуклеиновой кислоты, которая была сконструирована с использованием технологий молекулярной биологии, например, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело, полученное из одноцепочечного антитела. Однодоменные и одноцепочечные антитела также включены в термин «рекомбинантное антитело».

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

продуцируют моноклональные антитела, которые специфически связываются с антигеном. Моноклональные антитела могут быть очищены из клеточной культуры.

Определение «специфически взаимодействующее с», используемое в отношении антитела, означает, как в основном принято в данной области, что антитело является достаточно селективным между интересующим антигеном (например, активином, ActRIIa или полипептидом ActRIIb) и другими антигенами, которые не представляют интерес, что это антитело подходит, как минимум, для выявления наличия интересующего антигена в конкретном типе биологического образца. В некоторых способах использования антитела, таких как терапевтическое применение, может потребоваться более высокая степень специфичности связывания. Моноклональные антитела в основном имеют более высокую тенденцию (по сравнению с поликлональными антителами) к эффективному распознаванию желаемых антигенов и перекрестно-реагирующих полипептидов. Одной характеристикой, которая влияет на специфичность взаимодействия антитело:антиген, является аффинность антитела к антигену. Хотя желаемая специфичность может достигаться с целым рядом различных аффинностей, главным образом, предпочтительные антитела будут иметь аффинность (константу диссоциации) примерно 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} М или менее.

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

Примеры категорий соединений нуклеиновых кислот, которые являются антагонистами активина или ActRII, включают антисмысловые нуклеиновые кислоты, конструкции РНКi и конструкции каталитических нуклеиновых кислот. Соединение нуклеиновой кислоты может быть односпиральным или двухспиральным. Двухспиральное соединение также может включать «липкие» участки или некомплементарности, где одна или другие цепи являются односпиральными. Односпиральное соединение может содержать участки самокомплементарности, означая, что это соединение образует так называемую «шпильчатую» структуру или структуру «стебель-петля», с областью двухспиральной структуры. Соединение нуклеиновой кислоты может содержать нуклеотидную последовательность, которая комплементарна области, состоящей не более чем из 1000, не более чем из 500, не более чем из 250, не более чем из 100 или не более чем из 50, 35, 25, 22, 20, 18 или 15 нуклеотидов полноразмерной последовательности нуклеиновых кислот ActRII или последовательности нуклеиновой кислоты активина β_A , β_B , β_C , или β_E . Область комплементарности предпочтительно будет составлять по меньшей мере 8 нуклеотидов, и, необязательно, примерно от 18 до 35 нуклеотидов. Область комплементарности может оказаться в интроне, кодирующей последовательности или не кодирующей последовательности целевого транскрипта, например, часть кодирующей последовательности. В основном соединение нуклеиновой кислоты будет иметь длину примерно от 8 примерно до 500 нуклеотидов или пар оснований в длину, и, необязательно, длина будет составлять примерно от 14 до 50 нуклеотидов. Нуклеиновая кислота может быть ДНК (в частности, для использования в качестве антисмысловой), РНК или гибридом РНК:ДНК. Любая одна цепь может содержать смесь ДНК и РНК, а также модифицированные формы, которые трудно классифицировать, либо как ДНК, либо как РНК. Подобным образом, двухспиральное соединение может представлять собой ДНК:ДНК, ДНК:РНК или РНК:РНК, и любая одна цепь также может содержать смесь ДНК и РНК, а также модифицированные формы, которые трудно классифицировать либо как ДНК, либо как РНК. Соединение нуклеиновой кислоты может содержать любую из целого ряда

модификаций, в том числе одну или модификации скелета (сахар-фосфатной части в природной нуклеиновой кислоты, содержащей межнуклеотидные связи) или основной части (пуриновой или пиримидиновой части природной нуклеиновой кислоты). Длина соединения антисмысловой нуклеиновой кислоты предпочтительно составляет примерно от 15 примерно до 30 нуклеотидов и, как правило, содержит одну или несколько модификаций, улучшающих характеристики, такие как стабильность в сыворотке, в клетке или в том месте, куда доставляют соединение, например, в желудке в случае пероральной доставки соединений и в легких для ингалируемых соединений. В случае конструкции РНКi, комплементарная цепь мишеневого транскрипта в основном будет представлять собой РНК или ее модификации. Другая цепь может представлять собой РНК, ДНК или любой другой вариант. Часть дуплекса двухспиральной или односпиральной «шпилечной» конструкции РНКi в основном будет иметь длину от 18 до 40 нуклеотидов и, необязательно, примерно от 21 до 23 нуклеотидов в длину, при условии, что она служит в качестве субстрата Дайсера. Каталитические или ферментативные нуклеиновые кислоты могут представлять собой рибозимы или ДНК-ферменты и также могут содержать модифицированные формы. Соединения нуклеиновых кислот могут ингибировать экспрессию мишени примерно на 50%, 75%, 90% или более при контактировании с клетками в физиологических условиях и при концентрации, при которой несмысловой или смысловой контроль оказывает небольшой эффект или вовсе не оказывает эффекта. Предпочтительные концентрации для тестирования эффекта соединений нуклеиновых кислот составляют 1, 5 и 10 микромоль. Соединения нуклеиновых кислот также могут быть протестированы, например, на воздействие на уровни эритроцитов.

5. Скрининговые исследования

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к применению пептидов ActRII (например, растворимых полипептидов ActRIIa или ActRIIb) и полипептидов активина для идентификации соединений (средств), которые являются агонистами или антагонистами пути передачи сигнала активин-ActRIIa и/или

активин ActRIIb. Соединения, идентифицированные с помощью этого скрининга, могут быть протестированы для оценки их способности модулировать уровни эритроцитов, гемоглобина и/или ретикулоцитов *in vivo* или *in vitro*. Эти соединения могут быть протестированы, например, на моделях животных.

Существует целый ряд подходов для скрининга терапевтических средств, повышающих уровень эритроцитов или гемоглобина нацеливанием на путь передачи сигнала активина и ActRII. В некоторых вариантах осуществления высокопроизводительный скрининг соединений может проводиться для идентификации средств, которые нарушают активин или ActRII-опосредованные эффекты на выбранной клеточной линии. В некоторых вариантах осуществления такое исследование проводят для скрининга и идентификации соединений, которые специфически ингибируют или уменьшают связывание полипептида ActRIIa или ActRIIb с активином. Альтернативно исследование может быть использовано для идентификации соединений, которые усиливают связывание полипептида ActRIIa или ActRIIb с активином. Еще в одном варианте осуществления соединения могут быть идентифицированы по их способности взаимодействовать с активином, полипептидом ActRIIb или полипептидом ActRIIa.

Подходит целый ряд исследований различного формата и в свете настоящего описания, те исследования, которые не представлены в описании конкретно, тем не менее, будут понятны специалисту в данной области. Описанные в настоящем изобретении тестируемые соединения (средства) по изобретению могут быть получены любым комбинаторным химическим способом. Альтернативно рассматриваемые соединения могут быть природными биомолекулами, синтезированными *in vivo* или *in vitro*. Соединения (средства), тестируемые на их способность действовать в качестве модуляторов тканевого роста, могут быть получены, например, с помощью бактерий, дрожжей, растений или других организмов (например, природные продукты), получены химически (например, малые молекулы, в том числе пептидомиметики) или получены рекомбинантно. Тестируемые соединения, рассматриваемые в настоящем изобретении, включают непептидные органические

молекулы, пептиды, полипептиды, пептидомиметики, сахара, гормоны и молекулы нуклеиновых кислот. В конкретном варианте осуществления тестируемое средство представляет собой малую органическую молекулу с молекулярной массой примерно менее 2000 Дальтон.

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

Во многих программах скрининга, в которых тестируемые библиотеки соединений и природных экстрактов, исследования с высокой пропускной способностью желательны для максимально высокого количества соединений, проанализированы в заданный период времени. Исследования, проводимые в бесклеточных системах, те, которые могут быть получены с использованием очищенных или получищенных белков, зачастую являются предпочтительными в качестве «первичных» скринингов, в который они могут быть получены для быстрой разработки и относительного легкого выявления изменения в молекулярной мишени, которое опосредовано тестируемым соединением. Более того, эффекты клеточной токсичности или биодоступности тестируемого соединения в основном могут остаться незамеченными в *in vitro* системе, это исследование вместо фокусирования главным образом

на действии лекарственного средства на молекулярную мишень как может проявляться в изменении аффинности связывания между полипептидом ActRIIa и активином и/или между полипептидом ActRIIb и активином.

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

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

(например, FITC) или ферментативно меченных полипептидов ActRIIa или ActRIIb или активина, с помощью иммуноанализа или с помощью хроматографического определения.

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

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

В некоторых вариантах осуществления рассматриваемые соединения идентифицируют по их способности взаимодействовать с полипептидом ActRII или активина в соответствии с изобретением. Взаимодействие соединения и полипептида ActRIIa, ActRIIb или активина может быть ковалентным или нековалентным. Например,

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

6. Примеры терапевтического применения

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

активин-ActRIIb, например, полипептида ActRIIb. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам стимуляции формирования эритроцитов у индивидуума путем введения этому индивидууму терапевтически эффективного количества антагониста активин-ActRII, в частности, полипептида ActRII. Эти способы могут быть использованы для терапевтического и профилактического лечения млекопитающих и, в частности, людей.

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

Как показано в настоящем изобретении, антагонисты активин-ActRIIa и антагонисты активин-ActRIIb могут быть использованы для повышения уровней эритроцитов, гемоглобина или ретикулоцитов у здоровых людей, и такие антагонисты могут быть использованы для выбранных групп пациентов. Примеры соответствующих групп пациентов включают группы с нежелательно низкими уровнями эритроцитов или гемоглобина, например, пациентов с анемией и тех, у которых имеется риск развития нежелательно низких уровней эритроцитов или гемоглобина, например, пациентов, которых готовят к обширному функциональному вмешательству или другим процедурам, в результате которых может происходить значительная потеря крови. В одном из вариантов осуществления пациенту с достаточными

уровнями эритроцитов проводят лечение антагонистом активин-ActRIIa для повышения уровней эритроцитов, а затем берут кровь и хранят для последующего использования при трансфузиях. В одном из вариантов осуществления пациенту с достаточными уровнями эритроцитов проводят лечение антагонистом активин-ActRIIb для повышения уровней эритроцитов, а затем берут кровь и хранят для последующего использования при трансфузиях.

Описанные в настоящем изобретении антагонисты активин-ActRII, и, в частности, белки ActRIIa-Fc и ActRIIb, могут быть использованы для повышения уровней эритроцитов у пациентов с анемией. При наблюдении уровней гемоглобина у людей, уровень ниже нормального для соответствующего возраста и пола может быть показателем анемии, хотя во внимание принимаются индивидуальные отличия. Например, уровень гемоглобина 12 г/дл в основном считается нижней границей нормы для всей популяции взрослых людей. Возможные причины включают потерю крови, недостаток питательных веществ, воздействие лекарственной терапии, различные нарушения работы костного мозга и различные заболевания. Более конкретно, анемия была связана с целым рядом нарушений, которые включают, например, хроническую почечную недостаточность, миелодиспластический синдром, ревматоидный артрит, трансплантацию костного мозга. Анемия также может быть связана со следующими состояниями: солидными опухолями (например, раком груди, раком легких, раком кишечника); опухолями лимфатической системы (например, хроническим лимфолейкозом, неходжкинскими и ходжкинскими лимфомами); опухолями гематопоетической системы (например, лейкозом, миелодиспластическим синдромом, множественной миеломой); лучевой терапией; химиотерапией (например, схемы лечения, предусматривающие введение платины); воспалительными и аутоиммунными заболеваниями, в том числе, но ими не ограничиваясь, ревматоидным артритом, другими воспалительными артритами, системной красной волчанкой (СКВ), острыми или хроническими заболеваниями кожи (например, псориазом), воспалительным заболеванием кишечника (например, болезнью Крона и язвенным колитом); острым или хроническим заболеванием почек

или недостаточностью, в том числе идиопатическими или конгенитальными состояниями; острым или хроническим заболеванием печени; острым или хроническим кровотечением; ситуации, при которых трансфузия эритроцитов невозможна из-за алло- или аутоантител пациента и/или по религиозным причинам (например, некоторые Свидетели Иеговы); инфекциями (например, малярия, остеомиелит); гемоглобинопатиями, в том числе, например, серповидно-клеточная анемия, талассемии; применение или злоупотребление лекарственными препаратами, например, злоупотребление алкоголем; дети с анемией любого генеза во избежание трансфузии; и пожилые пациенты или пациенты с лежащим в основе сердечно-легочным заболеванием с анемией, которые не могут получать трансфузии в связи с беспокойством по поводу перегрузки кровообращения.

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

Быстрое воздействие на уровни эритроцитов антагонистов активин-ActRIIa, описанных в настоящем изобретении, свидетельствует о том, что механизм действия этих средств отличается от Epo. Соответственно, эти антагонисты могут быть использованы для повышения уровней эритроцитов и гемоглобина у пациентов, у которых отсутствует хороший ответ на Epo. Например,

антагонист активин-ActRIIa может быть эффективен для пациентов, у которых введения нормальной – повышенной (>300 МЕ/кг/неделя) дозы Еро не приводит в результате к повышению уровня гемоглобина до заданного уровня. Пациенты с неадекватным ответом на Еро отмечены при всех типах анемии, но более высокое число пациентов, не отвечающих на Еро, наблюдалось особенно часто среди больных раком и у пациентов с терминальной стадией заболевания почек. Неадекватный ответ на Еро может быть либо конститутивным (т.е. наблюдаемым при первом лечении с использованием Еро), либо приобретенным (например, наблюдаемым при повторном лечении с использованием Еро).

Антагонисты активин-ActRII также могут быть использованы для лечения пациентов, которые подвержены побочным действиям Еро. Наиболее серьезными побочными эффектами Еро являются чрезмерное повышение уровней гематокрита или гемоглобина и полицитемия. Повышенные уровни гематокрита могут приводить к гипертензии (более конкретно, к обострению гипертензии) и сосудистому тромбозу. Другими побочными эффектами Еро, о которых сообщалось, некоторые из которых относятся к гипертензии, являются головные боли, гриппоподобный синдром, обструкция шунтов, инфаркты миокарда и церебральные судороги вследствие тромбоза, гипертензивная энцефалопатия и аплазия эритроцитов (Singibarti, (1994) J. Clin Invest 72(suppl 6), S36-S43; Horl et al. (2000) Nephrol Dial Transplant 15(suppl 4), 51-56; Delanty et al. (1997) Neurology 49, 686-689; Bunn (2002) N Engl J. Med. 346(7), 522-523).

7. Фармацевтические композиции

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

В некоторых вариантах осуществления терапевтический способ

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

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

Дополнительно композиция может быть инкапсулирована или инъектирована в форме для доставки в участок ткани-мишени (например, костный мозг). В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению могут включать матрицу,

способную доставлять одно или несколько терапевтических соединений (например, полипептиды ActRIIa или ActRIIb) в участок ткани-мишени (например, костный мозг), обеспечивая структуру для развития ткани и оптимально способную к резорбции в организме. Например, матрица может обеспечивать медленное высвобождение полипептидов ActRII. Такие матрицы могут быть сформированы из материалов, используемых в настоящее время для других имплантируемых медицинских применений.

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

В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению могут предусматривать пероральное введение, например, в форме капсул, саше, пилюль, таблеток, леденцов (используя вкусо-ароматическую основу, обычно сахарозу и акацию или трагакант), порошков, гранул, или в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости, или в виде жидкой эмульсии масло-в-воде или вода-в-масле, или в виде эликсира или сиропа, или в виде

пастилок (используя инертную основу, такую как желатин и глицерин или сахароза и акация) и/или в виде полосканий для полости рта и подобного, каждое содержит заранее определенное количество средства в качестве активного ингредиента. Средство также можно вводить в виде болюса, электуария или пасты.

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

Жидкие лекарственные формы для перорального введения включают фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. Кроме активного

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

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

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

Понятно, что режим дозирования будет определяться лечащим врачом с учетом различных факторов, которые модифицируют действие рассматриваемых соединений по изобретению (например, полипептидов ActRIIa и ActRIIb). Различные факторы включают, но ими не ограничиваются, количество эритроцитов у пациента, уровень гемоглобина или другие диагностические показатели, желаемое заданное количество эритроцитов, возраст пациента, пол

и рацион питания, тяжесть любого заболевания, которое может вносить вклад в снижение уровня эритроцитов, время введения и другие клинические факторы. Добавление других известных факторов роста к конечной композиции также может влиять на дозу. Прогресс можно контролировать путем периодической оценки уровней эритроцитов и гемоглобина, а также путем оценки уровней ретикулоцитов и других показателей процесса гемопоэза.

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

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

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

Альтернативно клетки тканевой культуры могут быть непосредственно трансфектированы плазмидами, кодирующими

структурные гены ретровирусов *gag*, *pol* и *env*, посредством общепринятой трансфекции с использованием фосфата кальция. Эти клетки затем трансфектируют векторной плазмидой, содержащей интересующие гены. Полученные в результате клетки высвобождают ретровирусный вектор в культуральную среду.

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

Примеры липидов, используемых в получении липосом, включают соединения фосфатидила, такие как фосфатидилглицерин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, сфинголипиды, цереброзиды и ганглиозиды. Иллюстративные фосфолипиды включают яичный фосфатидилхолин, дипальмитоилфосфатидилхолин и дистеароилфосфатидилхолин. Нацеливание липосом также возможно, например, исходя из органной специфичности, клеточной специфичности и специфичности органелл, и известно из уровня техники.

ПРИМЕРЫ

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

Пример 1: слитые белки ActRIIa-Fc

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

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

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGC
WLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVTTQPTSNPVT PKPPTGGGTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

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

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

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

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

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

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGD
KDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSY
FPMEVTTQPTSNPVT PKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPVPPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO:13) .

Этот полипептид кодируется следующей последовательностью нуклеиновых кислот:

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCG
TTTCGCCCCGGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTTTTAATGCTAA
TTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGTAACCGTGTTATGGTGACAAAGATAAACG
GCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCATTGAATAGTGAAACAAGGTGT
TGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAAGACAGCCCTGAA
GTATATTTCTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCGGAGATG
GAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGGAACTCAC
ACATGCCCCACCGTGCCCGAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCA
AAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG
AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC
CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA
GTCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC
CTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAG
ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGAC
AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC
CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGAATTC (SEQ ID
NO:14) .

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

ActRIIa-hFc и ActRIIa-mFc демонстрировали высокую

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

ActRIIa-hFc был очень стабильным в фармакокинетических исследованиях. Крысам вводили дозу 1 мг/кг, 3 мг/кг или 10 мг/кг белка ActRIIa-hFc, и плазменные уровни этого белка измеряли на 24, 48, 72, 144 и 168 час. В отдельном исследовании крысам вводили дозу 1 мг/кг, 10 мг/кг или 30 мг/кг. У крыс период полужизни в сыворотке ActRIIa-hFc составил 11-14 дней, и уровни в кровотоке лекарственного средства были достаточно высокими через две недели (11 мкг/мл, 110 мкг/мл или 304 мкг/мл для начальных введений 1 мг/кг, 10 мг/кг или 30 мг/кг, соответственно.) У яванских макак период полужизни в плазме значительно превышал 14 дней, и уровни в кровотоке этого лекарственного средства составили 25 мкг/мл, 304 мкг/мл или 1440 мкг/мл для начальных введений 1 мг/кг, 10 мг/кг или 30 мг/кг, соответственно.

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

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

ActRIIa-hFc вызывает статистически значимые повышения параметров эритроцитов в среднем (количество эритроцитов [RBC],

гемоглобин [HGB] и гематокрит [HCT]) у самцов и самок, на всех уровнях доз и во всех моментах времени на протяжении всего исследования, что сопровождалось повышениями абсолютного и относительного количества ретикулоцитов (ARTC; RTC). Смотри фиг.3–6.

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

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

Аналогичные результаты наблюдались у крыс и мышей.

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

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

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

PK анализ ActRIIa-hFc показал линейный профиль в зависимости от дозы, и средний период полужизни составил приблизительно 25-32 дня. Площадь под кривой (AUC) для ActRIIa-hFc была линейнозависима от дозы, и абсорбция после SC введения дозы по существу была полной (смотри фиг.7 и 8). Эти данные указывают на то, что SC является желательным подходом для введения дозы, поскольку обеспечивает эквивалентную биодоступность и период полужизни в сыворотке для этого лекарственного средства, избегая пиков сывороточных концентраций лекарственного средства, связанных с первыми несколькими днями введения дозы внутривенно (IV) (смотри фиг.8). ActRIIa-hFc вызывал быстрое, длительное дозозависимое повышение сывороточных уровней щелочной фосфатазы, специфичной к костной ткани (BAP), которая является маркером анаболического роста кости, и дозозависимое снижение уровней С-концевого телопептида коллагена 1 типа и тартрат-резистентной кислой фосфатазы 5b, которые являются маркерами резорбции кости. Другие маркеры, такие как P1NP, показали результаты, не позволяющие сделать окончательные выводы. Уровни BAP показали почти насыщающие эффекты при наивысших дозах лекарственного средства, указывая на то, что половина максимального воздействия на этот анаболический костный биомаркер может достигаться при дозе 0,3 мг/кг, с повышением диапазона вплоть до 3 мг/кг. Рассчитанная как отношение фармакодинамического эффекта к AUC для лекарственного средства, EC50 составляет 51,465 (день*нг/мл). Смотри фиг.9. Эти изменения костного биомаркера были непрерывными на протяжении приблизительно 120 дней при наивысших тестируемых уровнях доз. Также было дозозависимое снижение сывороточных уровней FSH, соответствующее ингибированию активина.

В целом было очень небольшое, не связанное с лекарственным средством снижение гемоглобина на протяжении первой недели исследования, возможно связанное с исследованием флеботомии в группах получающих 0,01 и 0,03 мг/кг внутривенно или подкожно. Результаты по гемоглобину в группе, получающей 0,1 мг/кг SC и IV, были стабильными или демонстрировали умеренные повышения к

8-15 дню. При уровне дозы 0,3 мг/кг, введенной внутривенно (IV), было очевидное повышение уровней HGB, видимое уже на 2 день и зачастую достигающее максимума на 15-29 день, что не наблюдалось у пациентов, получающих плацебо. В этот момент исследования это изменение не достигло статистической значимости.

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

Пример 4: Альтернативные белки ActRIIa-Fc

Целый ряд вариантов ActRIIa, которые могут быть использованы в соответствии со способами, описанными в настоящем изобретении, описаны в международной патентной заявке, опубликованной как WO2006/012627 (смотри, например, стр. 55-58), приведенной в описании в качестве ссылки в полном объеме. Альтернативная конструкция может иметь делецию С-концевого фрагмента (последние 15 аминокислот внеклеточного домена ActRIIa. Эта последовательность для такой конструкции представлена ниже (Fc часть подчеркнута) (SEQ ID NO: 12):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGC
WLDDINCYDRITDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP^{EMTGGGTHTCPPCPAPELLGGPS}
VFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVP^{IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL}
TCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV^{FSCSV}
HEALHNHYTQKSLSLSPGK.

Пример 5: Слитые белки ActRIIb-Fc

Заявители сконструировали растворимый слитый белок ActRIIb, который имеет внеклеточный домен ActRIIb человека, слитый с Fc-доменом человека. Совместная кристаллическая структура активина и внеклеточного ActRIIb не продемонстрировала какой-либо роли концевых (С-концевых) 15 аминокислот (называемых здесь «концевым фрагментом») внеклеточного домена в лигандном связывании. Эта последовательность не образует кристаллическую структуру, что дает возможность предположить, что эти остатки находятся в

гибкой петле, которая не упакована однородно в кристалле. Thompson et al. EMBO J. 2003 Apr 1; 22(7):1555-66. Эта последовательность также мало консервативна между ActRIIb и ActRIIa. Соответственно, эти остатки были пропущены в основной, или исходной, слитой конструкции ActRIIb-Fc. Дополнительно положение 64 в исходной форме занято аланином, который в основном считается формой «дикого типа», хотя аллель A64R встречается в природе. Таким образом, исходное слияние ActRIIb-Fc имеет последовательность (Fc часть подчеркнута) (SEQ ID NO:20):

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKG
CWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGGTHTCPPCPAPPELLGGPS
VFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK.

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

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKG
CWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTH
TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

Целый ряд вариантов ActRIIb, которые могут быть использованы в соответствии с описанными здесь способами, описан в международной патентной заявке, опубликованной как WO2006/012627 (смотри, например, стр. 59-60), приведенной в описании в качестве ссылки в полном объеме.

Пример 6: ActRIIb-hFc стимулирует эритропоэз у нечеловекообразных приматов

ActRIIb-hFc (IgG1) вводили один раз в неделю в течение 1 месяца самцам и самкам яванских макаков путем подкожной инъекции. Сорок восемь яванских макаков (24/на пол) распределяли на 4

испытуемые группы (6 животных/пол/группа), и им вводили подкожно либо носитель, либо ActRIIb-hFc в дозе 3, 10 или 30 мг/кг раз в неделю в течение 4 недель (всего 5 доз). Оцениваемые параметры включали общую клиническую патологию (гематологию, клиническую химию, коагуляцию и анализ мочи). ActRIIb-hFc вызывал статистически значимое повышение абсолютных средних величин ретикулоцитов к 15 дню у животных, получающих лечение. К 36 дню ActRIIb-hFc вызывал некоторые гематологические изменения, в том числе повышенное среднее абсолютное количество ретикулоцитов и распределение эритроцитов в широких значениях, и более низкую среднюю концентрацию корпускулярного гемоглобина. Были затронуты все испытуемые группы обоих полов. Эти эффекты совпадают с положительным действием ActRIIb-hFc на высвобождение незрелых ретикулоцитов из костного мозга. Этот эффект был обратимым после вымывания лекарственного средства из организма испытуемых животных (к 56 дню исследования). В соответствии с этим, авторы изобретения делают вывод о том, что ActRIIb-hFc стимулирует эритропоэз.

ВКЛЮЧЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ ССЫЛКИ

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

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антагонист активин-AcrRIII для применения в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики анемии у больного человека, где антагонист активин-AcrRIII представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

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

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

с) полипептида, содержащего по меньшей мере 50 последовательных аминокислот, выбранных из SEQ ID NO:2;

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

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

ф) полипептида, содержащего по меньшей мере 50 последовательных аминокислот, выбранных из SEQ ID NO:16;

г) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:7 или аминокислотной последовательности, которая по крайней мере на 95% идентична SEQ ID NO:7;

h) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12 или аминокислотной последовательности, которая по крайней мере на 95% идентична SEQ ID NO:12;

i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO:20 или аминокислотной последовательности, которая по крайней мере на 95% идентична SEQ ID NO:20; и

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

2. Антагонист для применения по п.1, где указанный полипептид состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID

NO:7.

3. Антагонист для применения п.1 или п.2, где указанный полипептид антагониста активина-ActRII представляет собой слитый белок, включая в дополнение к указанному полипептиду антагониста активина-ActRII один или более полипептидных фрагментов, которые улучшают одно или несколько из: стабильность *in vivo*, период полураспада *in vivo*, захват/введение, тканевую локализацию или распределение, формирование белковых комплексов и/или очистку.

4. Антагонист для применения по п.3, где указанный слитый белок включает полипептидный фрагмент, выбранный из группы, состоящей из: иммуноглобулинового Fc-домена и сывороточного альбумина.

5. Антагонист для применения по любому из предыдущих пунктов, где указанный активин или полипептид антагониста ActRII включает один или несколько модифицированных аминокислотных остатков, выбранных из: гликозилированной аминокислоты, пэгилированной аминокислоты, фарнезилированной аминокислоты, ацетилированной аминокислоты, биотинилированной аминокислоты, аминокислоты, конъюгированной с липидной группой, и аминокислоты, конъюгированной с органическим агентом для получения производных.

6. Антагонист для применения по любому из предшествующих пунктов, где анемия представляет собой (a) анемию, связанную с множественной миеломой, (b) связанной с хроническим заболеванием почек у пациента, (c) связанной с химиотерапевтическим лечением пациента, (d) связанной с миелодиспластическим синдромом или (e) связанной с талассемией.

7. Антагонист активина-ActRII для применения в производстве лекарственного средства для лечения расстройства, выбранного из группы, состоящей из миелодиспластического синдрома, талассемии и серповидноклеточной болезни у больного человека, где антагонист активина-ActRII выбран из группы, состоящей из антитела против активина, анти-ActRII антитела, полипептида ActRII, фоллистатина и ингибина.

8. Антагонист активина-ActRII для применения по п.7, где антитело против активина представляет собой антитело, которое

связывается с активином и нарушает связывание ActRIIa.

9. Антагонист активина-ActRII для применения по п.7, где антитело против активина представляет собой антитело, которое связывается с активином и нарушает связывание ActRIIb.

10. Антагонист активина-ActRII для применения по п.7, где антитело против активина выбрано из группы, состоящей из: антитела против активина-А, антитела против активина-В, антитела против активина-С и антитела против активина-Е.

11. Антагонист активина-ActRII для применения по п.7, где анти-ActRII антитело представляет собой анти-ActRIIa антитело или анти-ActRIIb антитело.

12. Антагонист активина-ActRII для применения по п.7, где полипептид ActRII выбран из:

a) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO:3;

b) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:17;

c) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO:2;

d) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:16;

e) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO:7;

f) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO:12;

g) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO:20; и

h) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ

ID NO:21.

13. Антагонист активина-AcR11 для применения по п.12, где указанный полипептид представляет собой слитый белок, содержащий в дополнение к указанному полипептидному домену AcR11 один или более полипептидных доменов, которые улучшают одно или несколько из: стабильность *in vivo*, период полураспада *in vivo*, захват/введение, тканевую локализацию или распределение, формирование белковых комплексов и/или очистку.

14. Антагонист активина-AcR11 для применения по п.13, где указанный слитый белок содержит полипептидный домен, выбранный из: иммуноглобулинового Fc-домена и сывороточного альбумина.

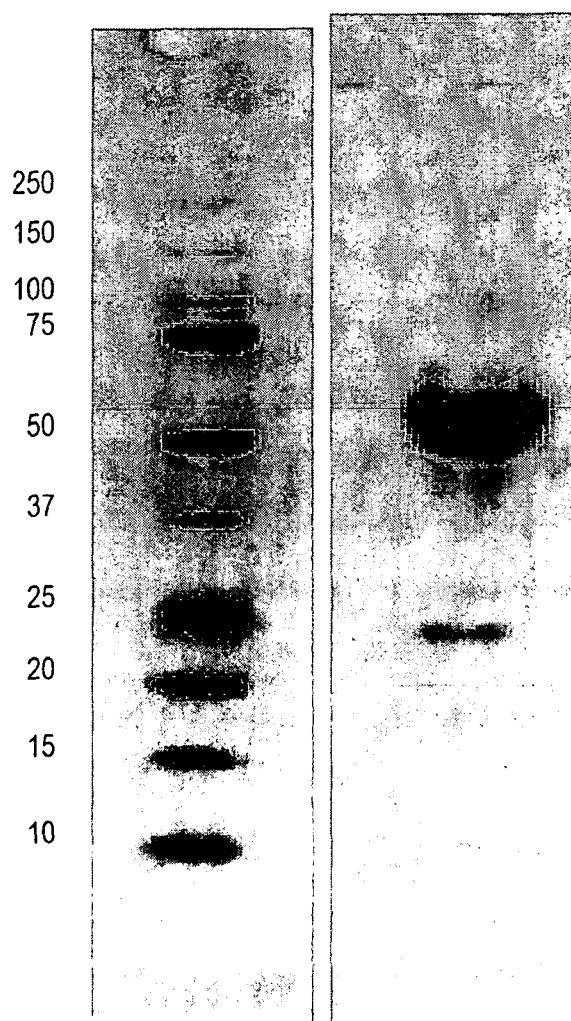
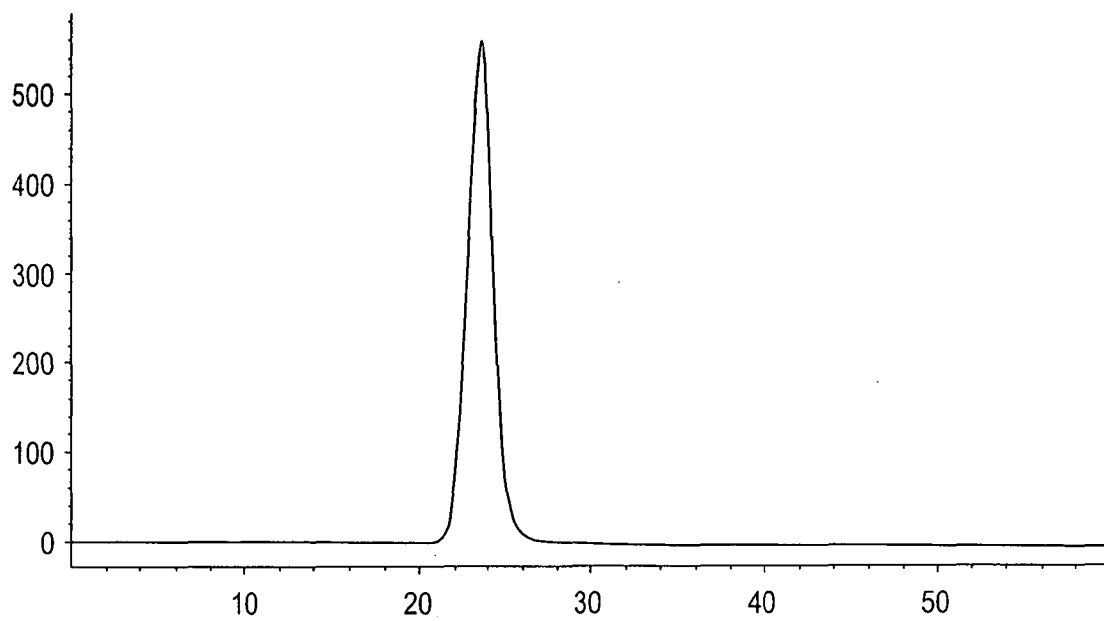
15. Антагонист активина-AcR11 для применения по любому из пп.12-14, где полипептид связывается с активином.

16. Антагонист активина-AcR11 для применения по п.15, где полипептид связывается с активином А, активином В или с ними обоими.

17. Антагонист активина-AcR11 для применения по любому из пп.12-16, где полипептид связывается с GDF11.

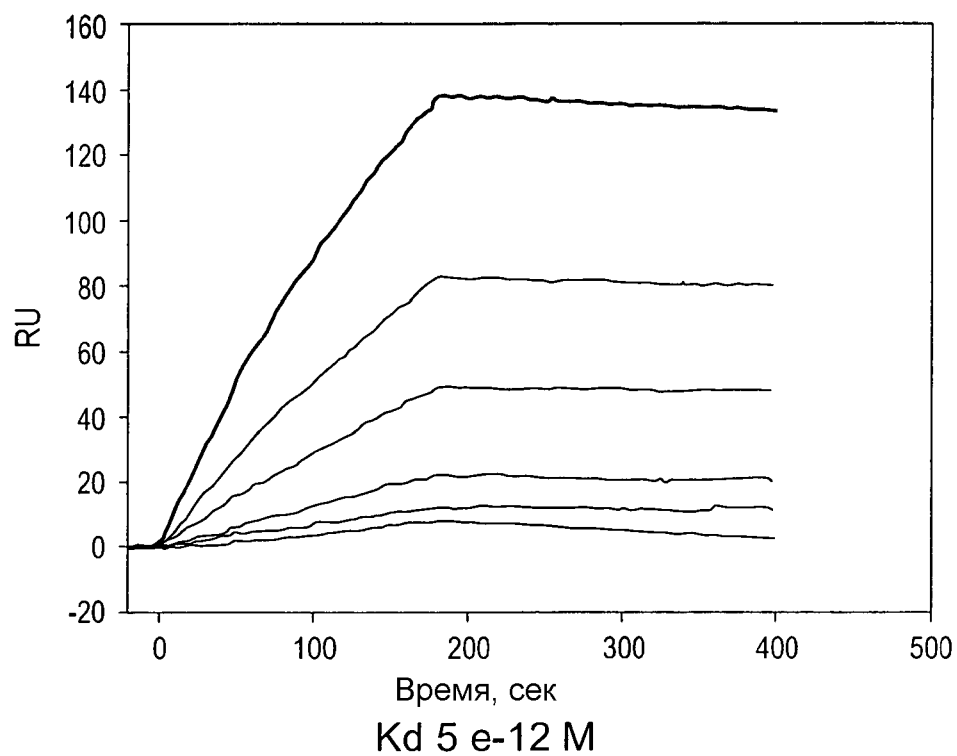
18. Антагонист активина-AcR11 для применения по любому из пп.12-17, где полипептид ингибирует передачу сигналов AcR11.

По доверенности

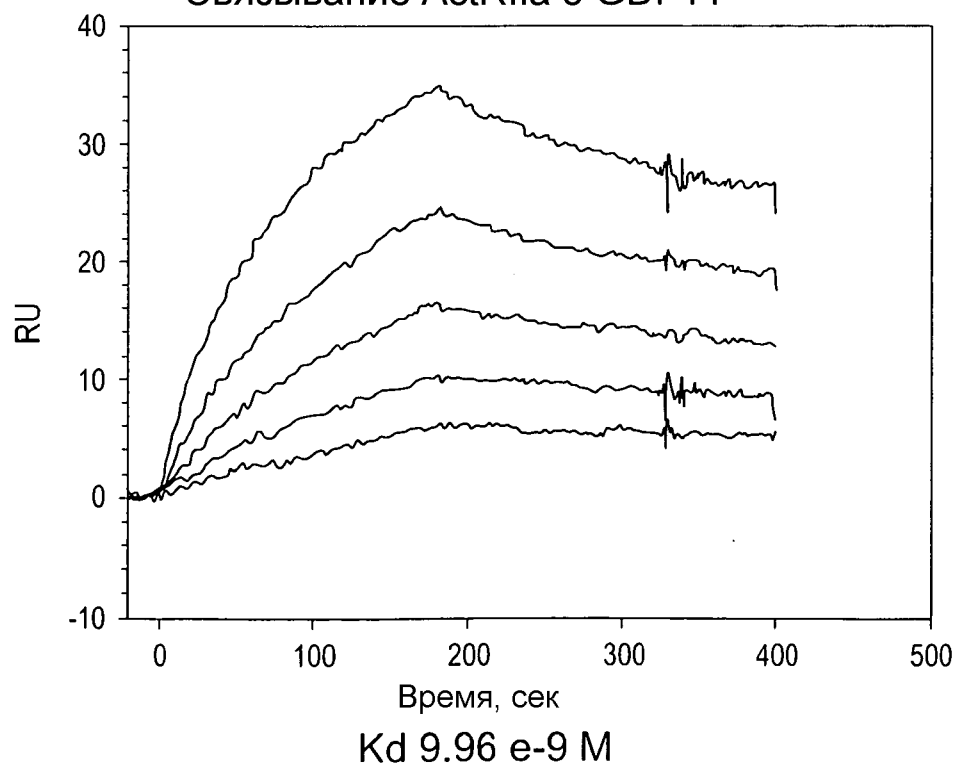


Фиг. 1

Связывание ActR1a с активином

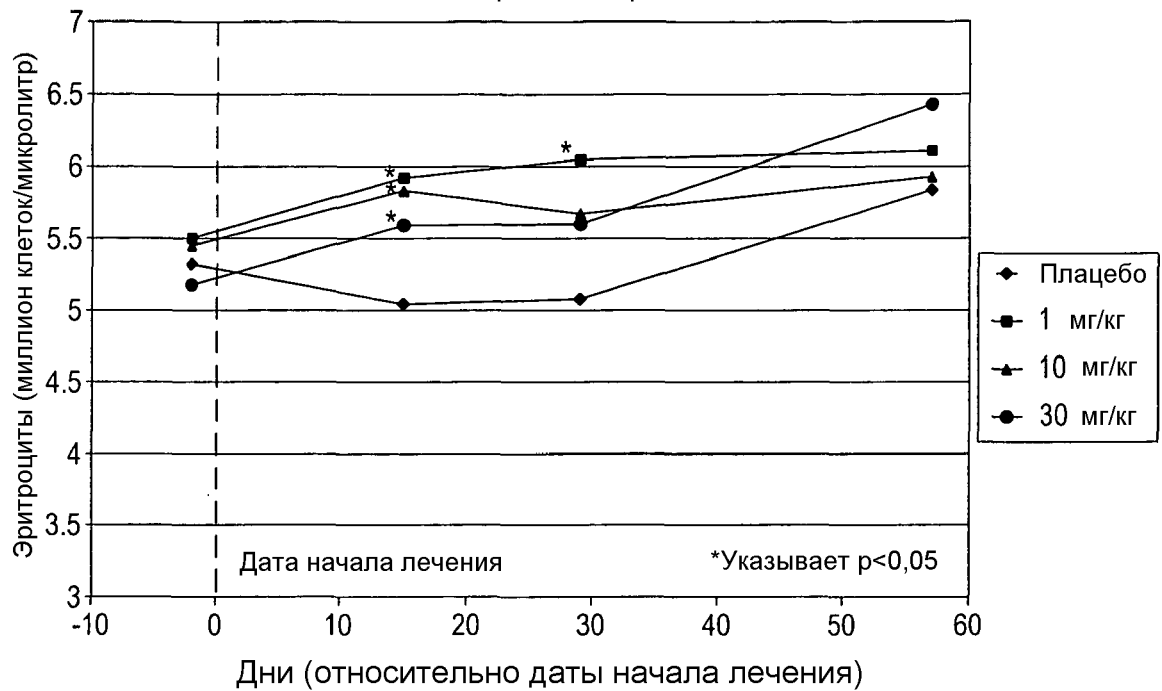


Связывание ActR1a с GDF11



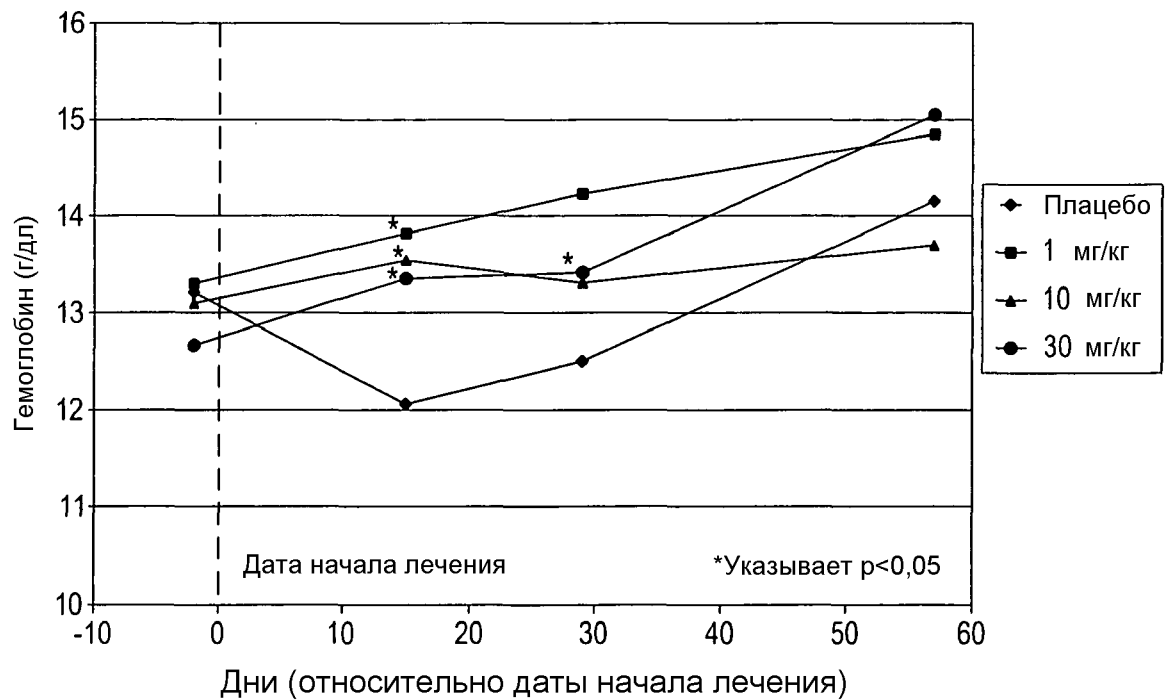
Фиг. 2

Действие ActRIIA-Fc на количество эритроцитов у самок
нечеловекообразных приматов



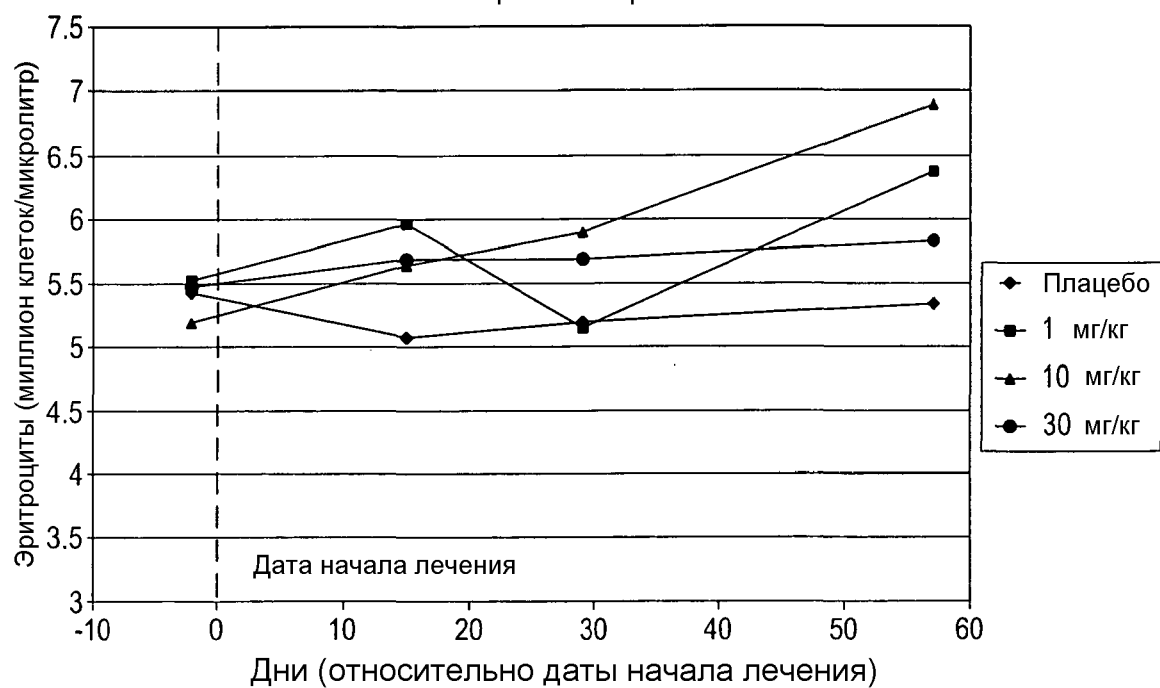
Фиг. 3А

Действие ActRIIA-Fc на гемоглобин у самок
нечеловекообразных обезьян



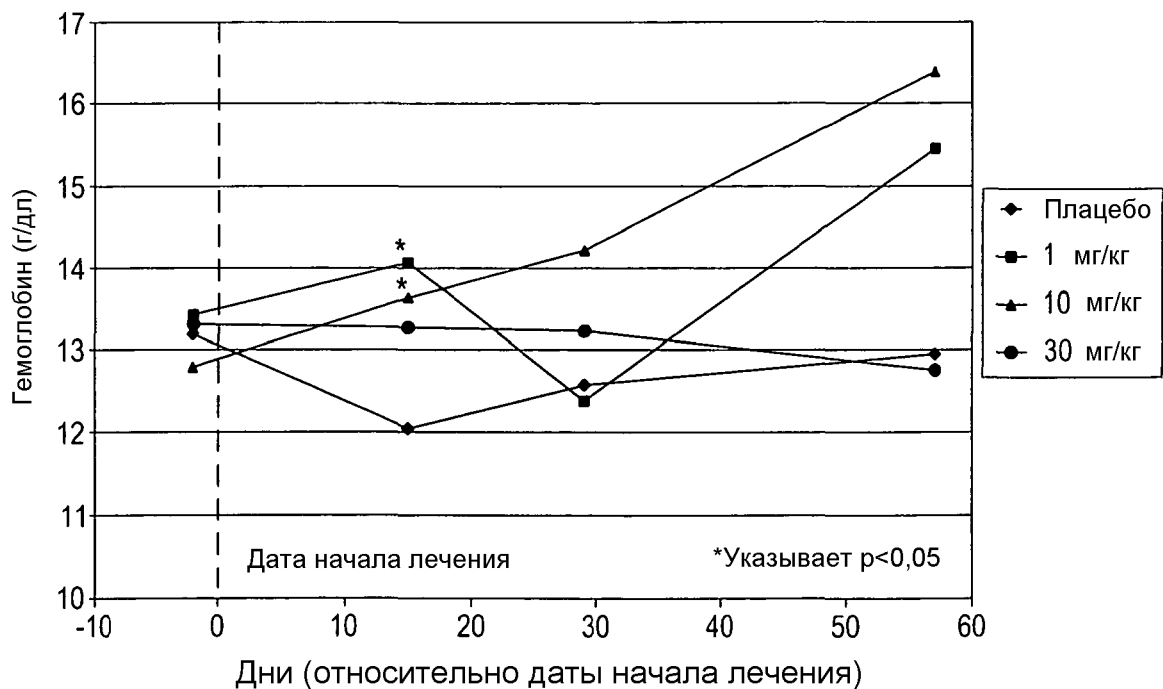
Фиг. 3В

Действие ActRIIA-Fc на количество эритроцитов у самцов
нечеловекообразных приматов



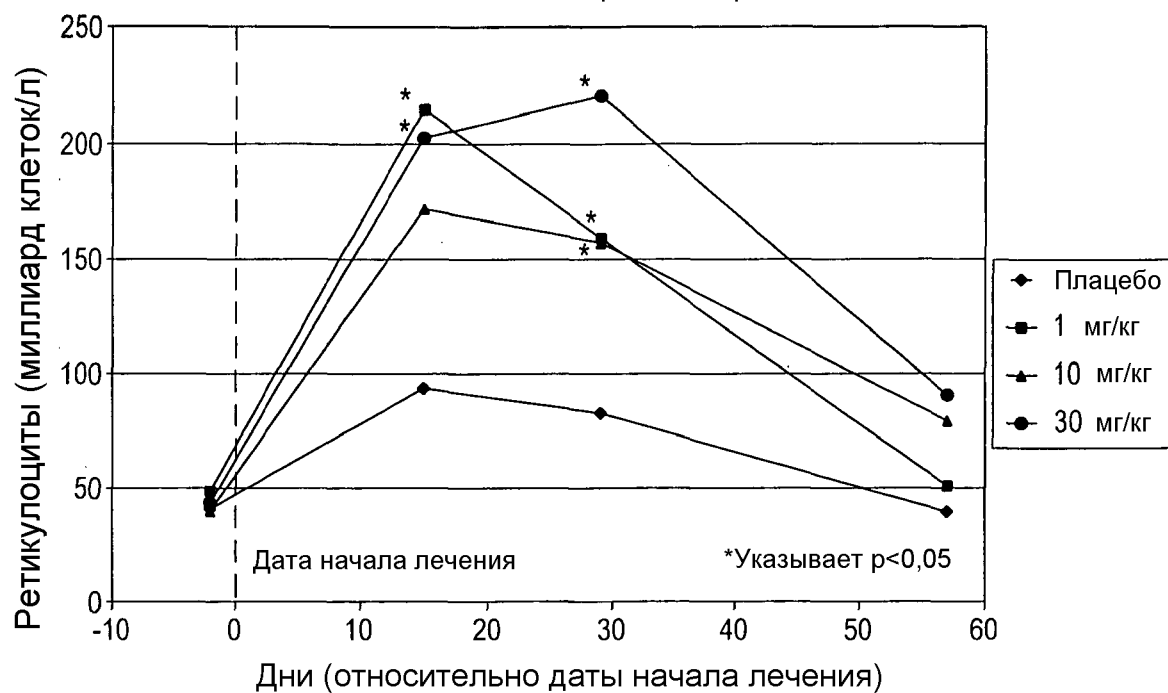
Фиг. 4А

Действие ActRIIA-Fc на гемоглобин у самцов
нечеловекообразных обезьян



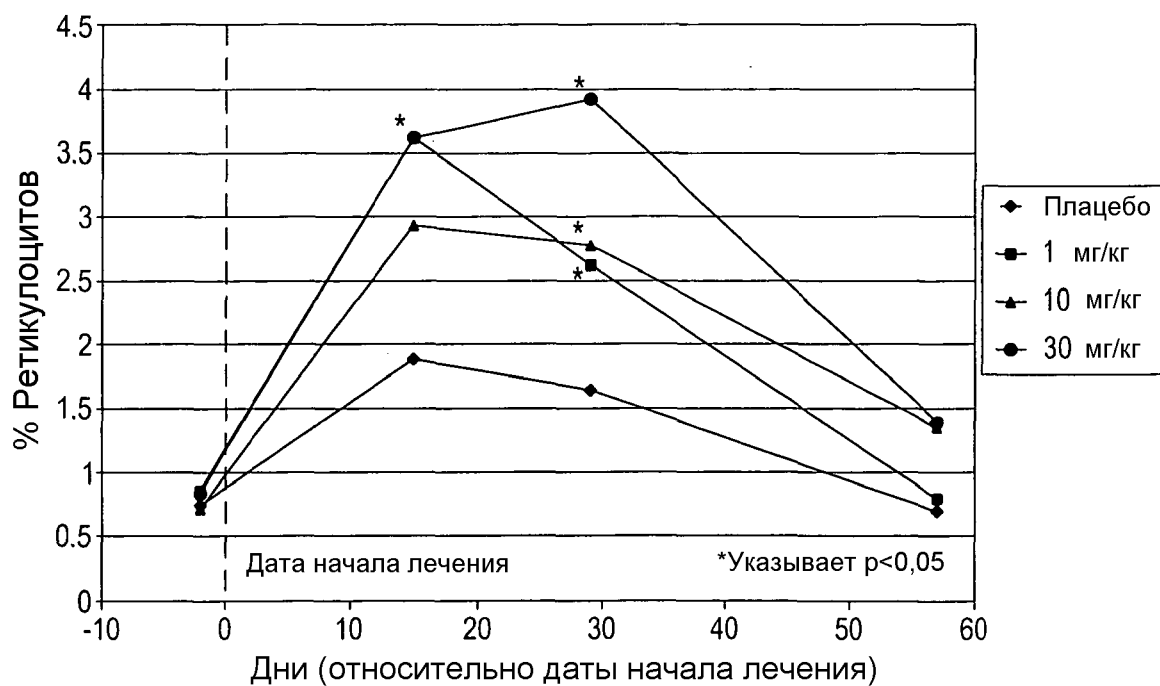
Фиг. 4В

Действие ActRIIA-Fc на количество ретикулоцитов у самок нечеловекообразных приматов



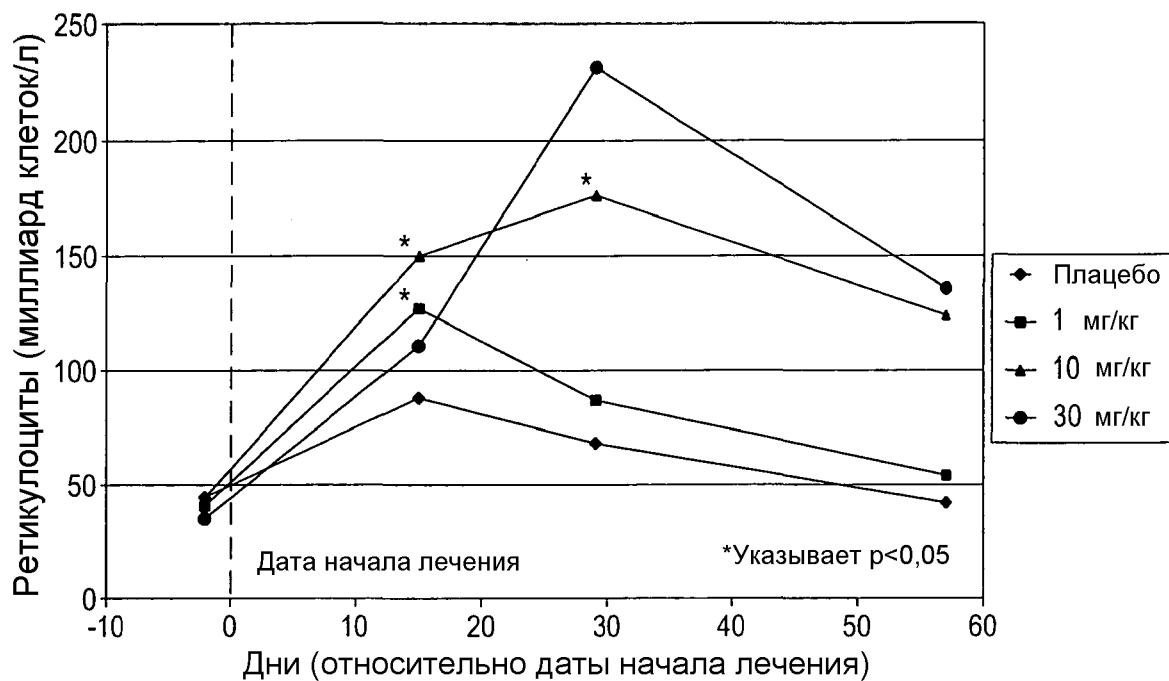
Фиг. 5А

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



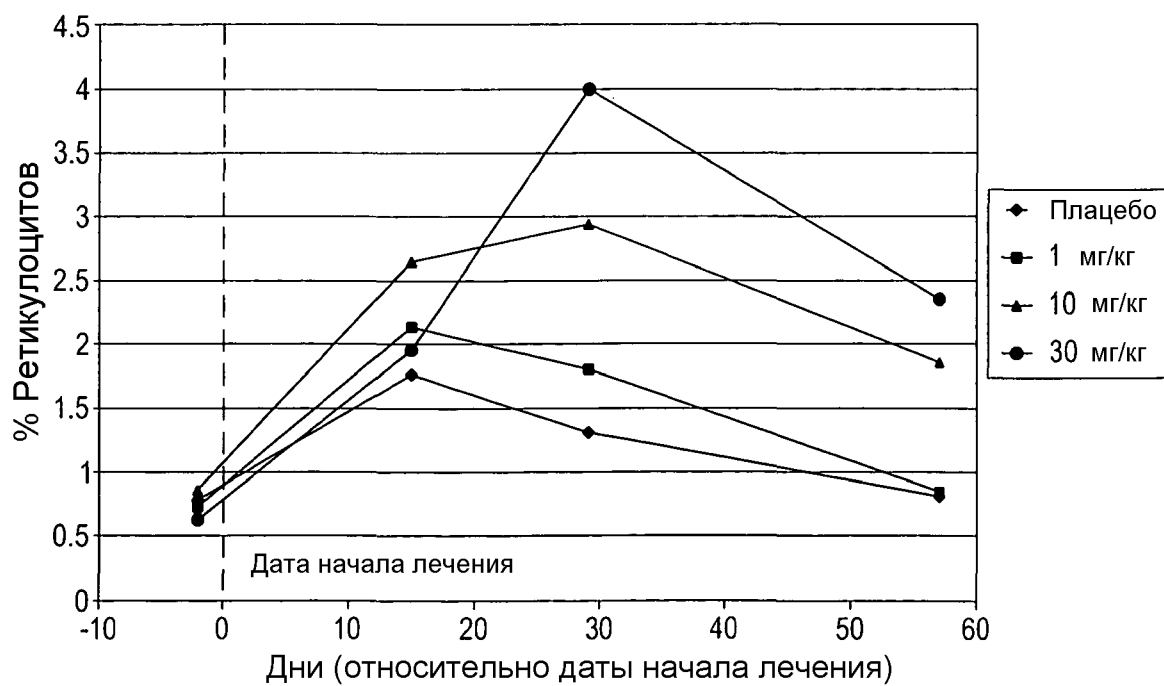
Фиг. 5В

Действие ActRIIA-Fc на количество ретикулоцитов у самцов нечеловекообразных приматов

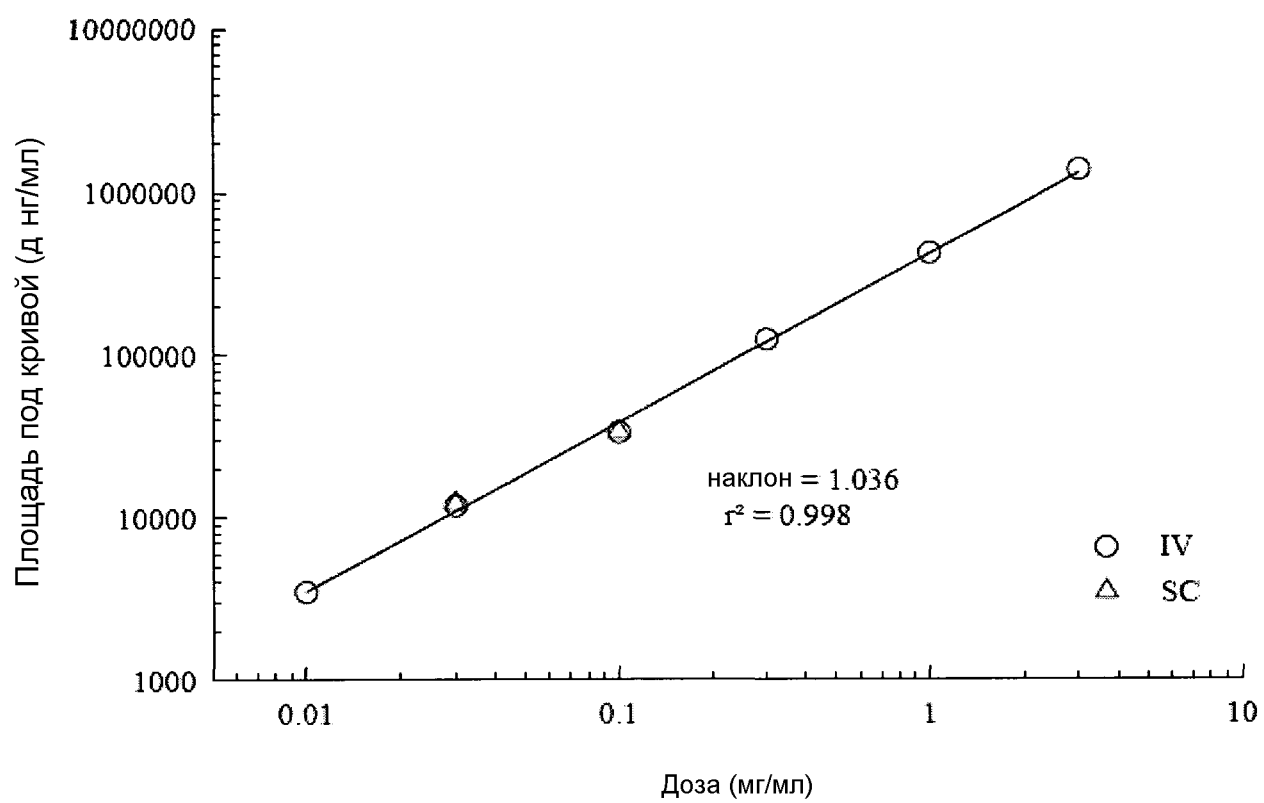


Фиг. 6А

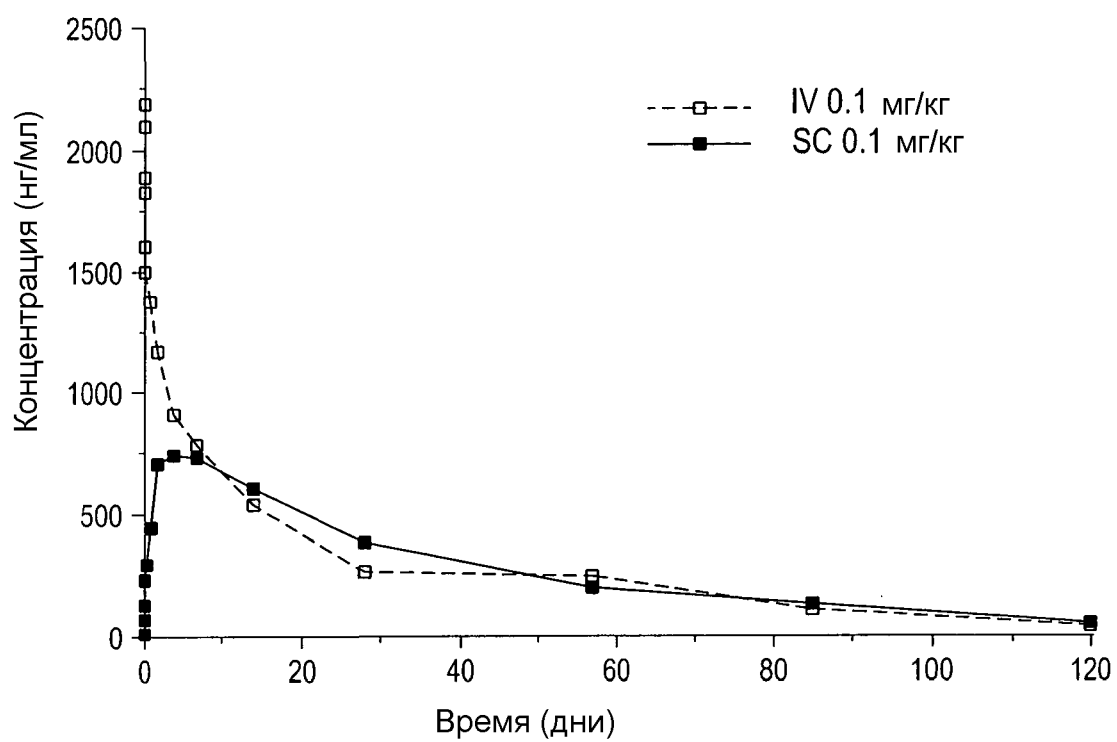
Действие ActRIIA-Fc на процентное содержание ретикулоцитов у самцов нечеловекообразных приматов



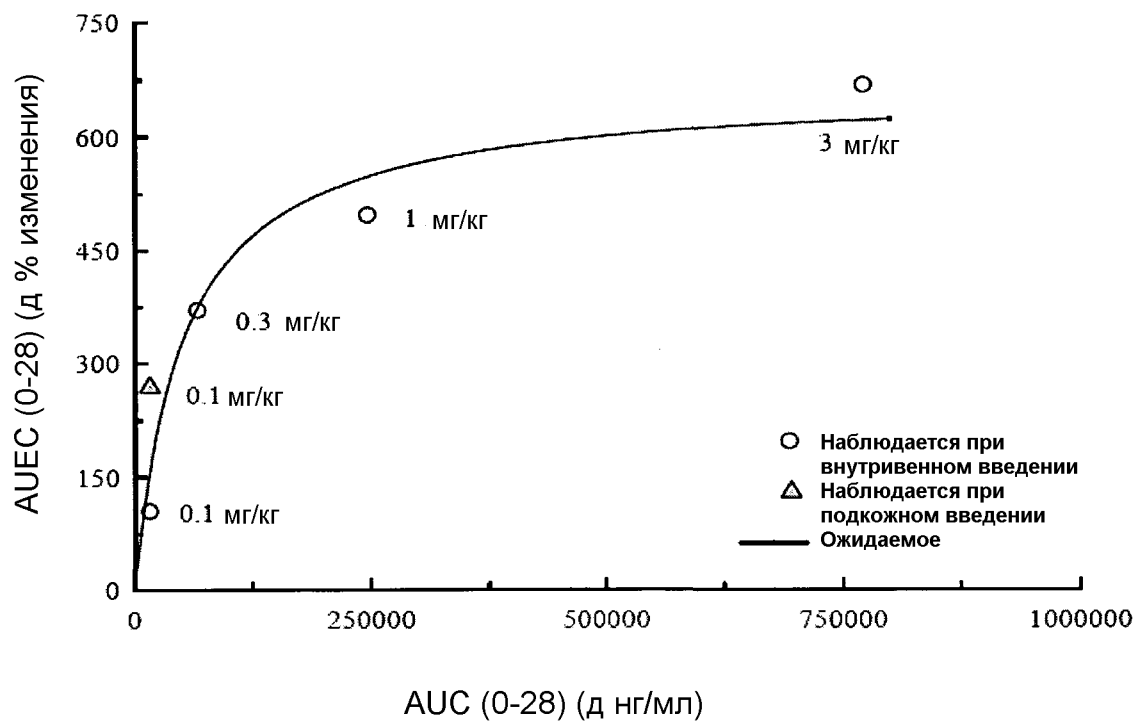
Фиг. 6В



Фиг. 7



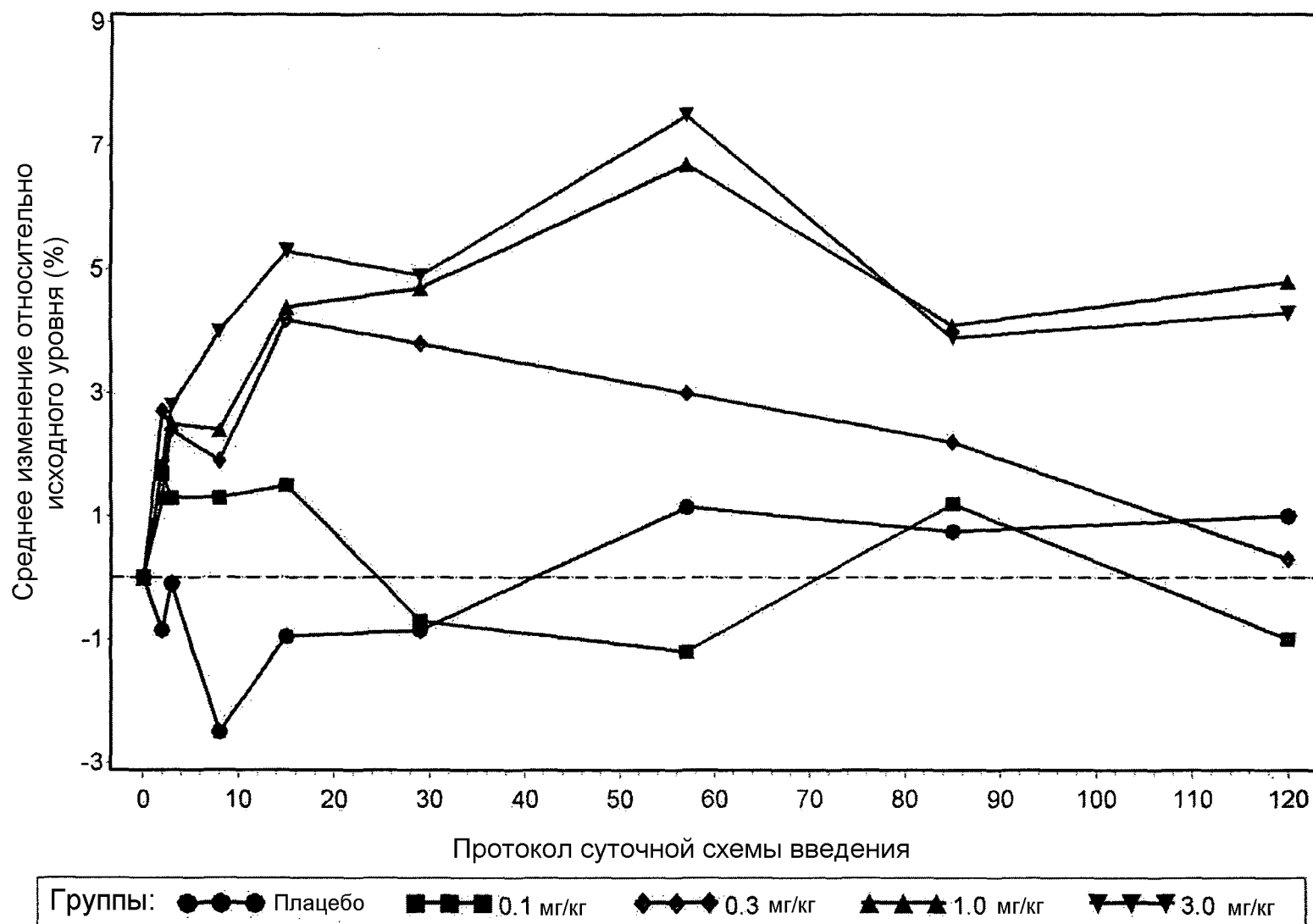
Фиг. 8



Фиг. 9

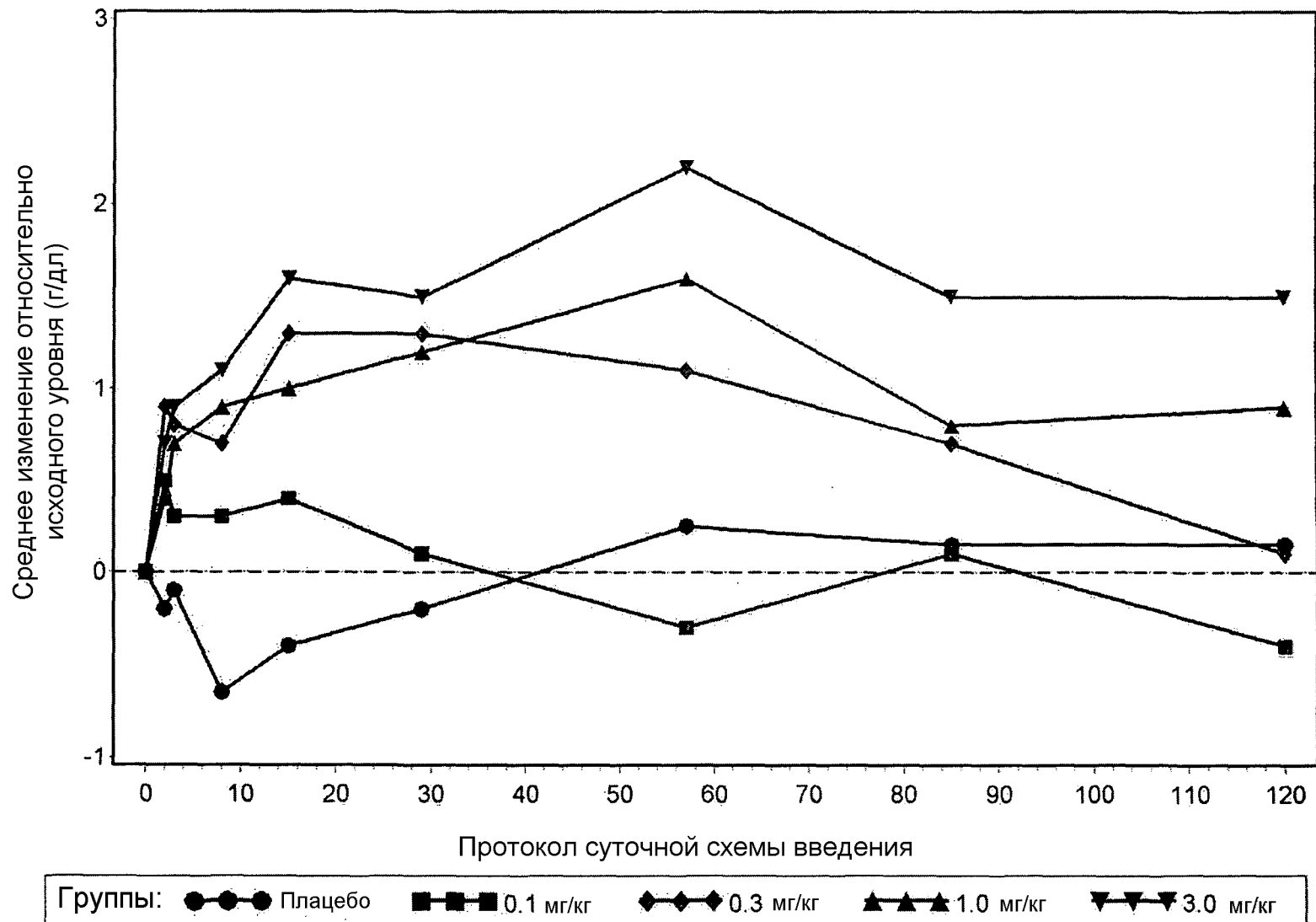
Среднее изменение и диапазон изменений относительно исходного уровня
при внутривенном введении – гематокрит

Фиг. 10



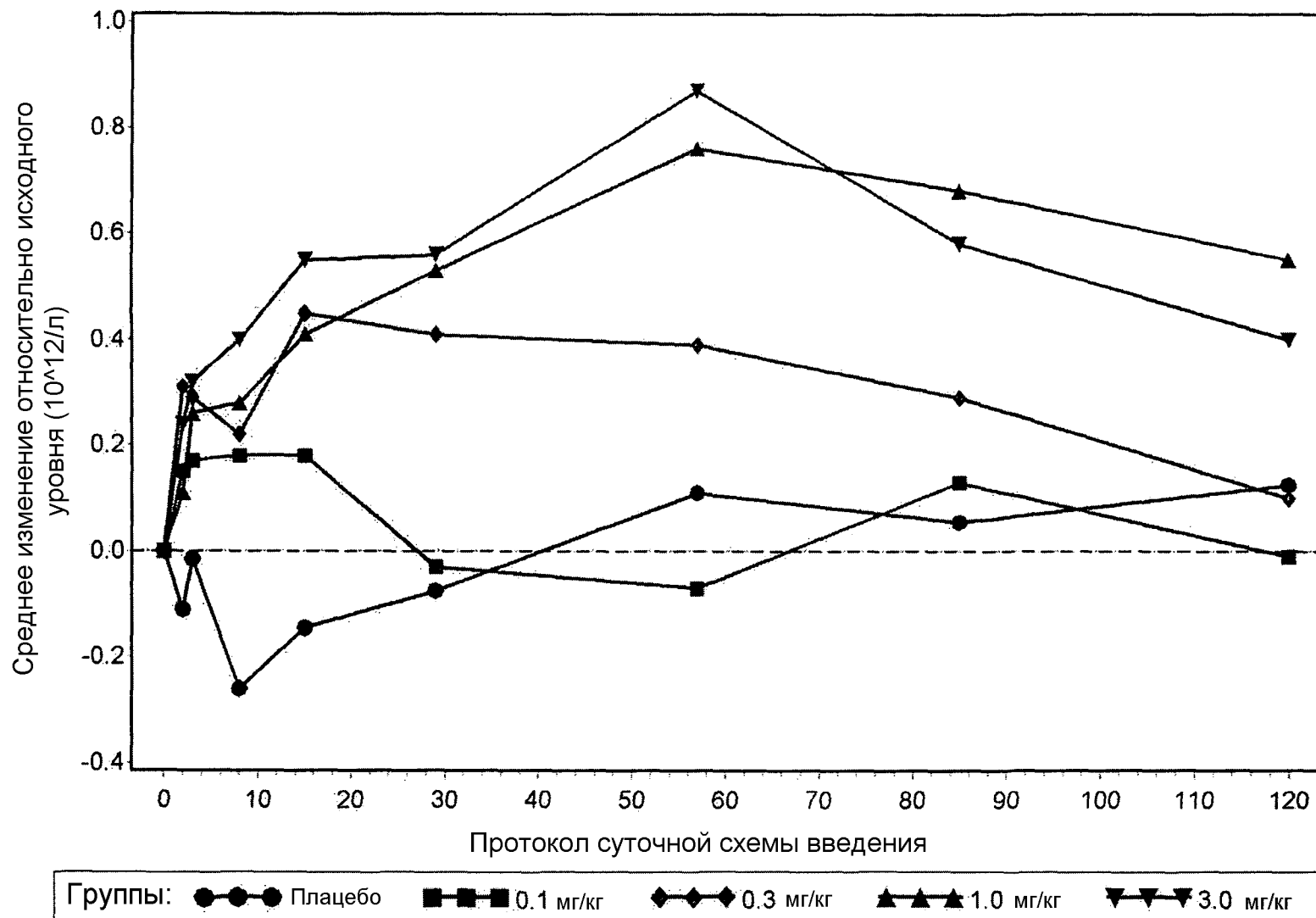
Среднее изменение и диапазон изменений относительно исходного уровня при внутривенном введении – гемоглобин

Фиг. 11



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

Фиг. 12



Среднее изменение относительно исходного
уровня – количество ретикулоцитов (%)

Фиг. 13

