

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042183**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.01.20

(21) Номер заявки
201690994

(22) Дата подачи заявки
2008.02.01

(51) Int. Cl. *A61K 38/16* (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АНТАГОНИСТЫ АКТИВИНА-ActRIIa И ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ РОСТА КОСТИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ

(31) 60/900,580; 60/932,762; 60/937,365;
61/000,528

(32) 2007.02.09; 2007.05.31; 2007.06.26;
2007.10.25

(33) US

(43) 2016.09.30

(62) 201300116; 2008.02.01

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

(72) Изобретатель:
**Нопф Джон, Сихра Джасбир, Кумар
Равиндра (US)**

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

(56) WO-A-2007062188
WO-A-2006012627
US-A1-2006068468
US-A1-2007249022
WO-A-2005094871

SAKAI R ET AL.: "Activin increases bone mass and mechanical strength of lumbar vertebrae in aged ovariectomized rats" BONE, PERGAMON PRESS., OXFORD, GB, vol. 27, no. 1, 1 July 2000 (2000-07-01), pages 91-96, XP002294252ISSN: 8756-3282 the whole document.

SAKAI ET AL.: "Activin release from bone coupled to bone resorption in organ culture of neonatal mouse calvaria" BONE, vol. 26, no. 3, 2000, pages 235-240, XP009105409 the whole document.

PEARSALL, R. SCOOTET AL.: "A soluble activin Type IIA receptor induces bone formation and improves skeletal integrity" PNAS, vol. 105, no. 19, 13 May 2008 (2008-05-13), pages 7082-7087, XP002494788, the whole document.

(57) В конкретных аспектах изобретение относится к композициям и способам для стимуляции роста кости и увеличения плотности кости, а также для лечения множественной миеломы.

B1**042183****042183****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительных заявок США с серийными No.: 60/900580, подана 9 февраля 2007 г.; 60/932762, подана 31 мая 2007 г.; 60/937365, подана 26 июня 2007 г.; и 61/000528, подана 25 октября 2007 г. Описания вышеуказанных заявок приведены в настоящее описание в качестве ссылки.

Предпосылки изобретения

Нарушения костной ткани, тяжесть которых колеблется от остеопороза до переломов, представляют собой набор патологических состояний, для которых существует лишь несколько эффективных фармацевтических средств. Вместо этого лечение сфокусировано на физические воздействия и изменение образа жизни, включая иммобилизацию, упражнения и изменение диеты. Лекарственные средства, которые стимулируют рост кости и повышают плотность кости, были бы полезны при лечении различных нарушений кости.

Рост и минерализация кости зависят от активности двух типов клеток, остеокластов и остеобластов, хотя хондроциты и клетки сосудистой сети также принимают участие в важных аспектах этих процессов. В ходе развития формирования кости происходит за счет двух механизмов, внутривещевого окостенения и окостенения в соединительно-тканной мембране, причем первое отвечает за формирование продольных костей, а последнее отвечает за формирование топологически плоских костей, таких как кости черепа. Для внутривещевого окостенения необходимо последовательное формирование и деградация хрящевых структур в пластинках роста, которые служат матрицами для образования остеобластов, остеокластов, сосудистой сети и последующей минерализации. Во время окостенения в соединительно-тканной мембране кость формируется непосредственно из соединительных тканей. Для обоих процессов необходима инфильтрация остеобластов и последующее накопление в матриксе.

Переломы и другие структурные нарушения кости заживают благодаря процессу, который по меньшей мере отчасти напоминает последовательность событий остеогенеза при развитии, включая формирование хрящевой ткани и последующую минерализацию. Процесс заживления перелома может происходить двумя путями. Непосредственное или первичное заживление кости происходит без образования костной мозоли. Непрямое или вторичное заживление кости происходит со стадией формирования предшественника костной мозоли. Первичное заживление переломов включает в себя восстановление механической целостности вокруг близко расположенного повреждения. В подходящих условиях резорбирующие костную ткань клетки, окружающие повреждение, оказывают туннельный резорбтивный ответ и образуют пути для проникновения кровеносных сосудов и последующего заживления. Вторичное заживление кости следует за процессом воспаления, образования мягкой костной мозоли, минерализации костной мозоли и перестройкой костной мозоли. На стадии воспаления происходит образование гематомы и кровоизлияния в результате нарушения периостальных и эндостальных кровеносных сосудов в участке повреждения. Воспалительные клетки проникают в эту область. На стадии образования мягкой костной мозоли клетки образуют новые сосуды, фибробласты, внутриклеточный материал и поддерживающие клетки, образуя грануляционную ткань в пространстве между фрагментами перелома. Клиническое срастание между краями повреждения образуется посредством фиброзной или хрящевой ткани (мягкая костная мозоль). Образуются остеобласты и опосредуют минерализацию мягкой костной мозоли, которая затем заменяется пластинчатой костью и подвергается нормальным процессам перестройки.

Кроме переломов и других физических повреждений структуры кости, потеря минерального содержания кости и костной массы может быть вызвана большим числом условий и может приводить к существенным медицинским проблемам. Изменения костной массы происходит относительно предсказуемым путем в течение жизни индивидуума. Приблизительно до 30 лет кости как мужчин, так и женщин растут до максимальной массы посредством линейного роста внутривещевых пластинок роста и радиального роста. Приблизительно после 30 лет (для губчатых костей, например, плоских костей, таких как позвоночник и таз) и 40 лет (для трубчатой кости, например, длинных костей, обнаруженных в конечностях), как у мужчин, так и у женщин происходит медленная потеря костной массы. У женщин происходит также конечная фаза существенной потери костной массы, вероятно, в результате постклимактерического дефицита эстрогена. Во время этой фазы женщина может потерять дополнительно 10% костной массы трубчатой кости и 25% губчатой части. Приведет ли прогрессирующая потеря костной массы к патологическому состоянию, такому как остеопороз, в значительной степени зависит от исходного состояния костной массы индивидуума и от наличия ухудшающих состояний.

Потерю костной массы иногда характеризуют как нарушение равновесия нормального процесса перестройки кости. Здоровая кость постоянно подвергается перестройке. Перестройка начинается с резорбции кости остеокластами. Затем резорбированная кость заменяется новой костной тканью, которая характеризуется образованием коллагена остеобластами и последующей кальцификацией. У здоровых индивидуумов скорость резорбции и формирования кости находятся в равновесии. Остеопороз представляет собой хроническое, прогрессирующее состояние с характерным сдвигом в сторону резорбции, что приводит к общему уменьшению костной массы и минерализации кости. Остеопорозу у человека предшествует клиническая остеопения (минеральная плотность кости, которая ниже среднего значения по сравнению с плотностью кости молодого организма более чем на одно стандартное отклонение, но ме-

нее, чем на 2,5 стандартных отклонения). Во всем мире приблизительно 75 миллионов людей подвержены риску остеопороза.

Таким образом, способы контроля равновесия между активностью остеокластов и остеобластов могут быть используемы для заживления переломов и другого повреждения кости, а также для лечения нарушений, таких как остеопороз, связанных с потерей костной массы и минерализации кости.

Для лечения остеопороза, использовали и эстроген, и кальцитонин, и остеокальцин с витамином К, и высокие дозы кальция в рационе. Другие способы лечения остеопороза включают бисфосфонаты, паратиреоидный гормон, кальцимитетики, статины, анаболические стероиды, соли лантана и стронция и фторид натрия. Однако указанные лекарственные средства часто вызывают нежелательные побочные эффекты.

Таким образом, объектом настоящего описания являются композиции и способы стимуляции роста и минерализации кости.

Краткое изложение сущности изобретения

Частично в описании показано, что молекулы, обладающие активностью антагониста активина или ActRIIa ("антагонисты активина" и "антагонисты ActRIIa", обобщенно "антагонисты активина-ActRIIa"), можно использовать для повышения плотности кости, стимуляции роста кости и/или увеличения прочности кости. В частности, в описании показано, что растворимая форма ActRIIa действует как ингибитор передачи сигнала активина-ActRIIa и стимулирует повышение плотности кости, рост кости и прочность кости *in vivo*. В то время как большинство фармацевтических средств, которые стимулируют рост кости или ингибируют потерю костной массы, действуют либо как антикатаболические средства (также обычно обозначаемые как "катаболические средства") (например, бисфосфонаты), либо как анаболические средства (например, паратиреоидный гормон, РТН, в соответствующей дозе), растворимый белок ActRIIa обладает двойной активностью, оказывая как антикатаболический, так и анаболический эффекты. Таким образом, в описании указано, что антагонисты пути передачи сигнала активина-ActRIIa можно использовать для увеличения плотности кости и стимуляции роста кости. В то время как растворимый ActRIIa может воздействовать на кость за счет механизма, отличного от антагонизма активина, в описании тем не менее показано, что желательные лекарственные средства могут быть выбраны на основе активности антагониста активина-ActRIIa. Таким образом, в конкретных вариантах осуществления в описании представлены способы использования антагонистов активина-ActRIIa, включая, например, связывающие активин полипептиды ActRIIa, антитела против активина, антитела против ActRIIa, нацеленные на активин или ActRIIa малые молекулы и аптамеры, и нуклеиновые кислоты, уменьшающие экспрессию активина и ActRIIa, для лечения нарушений, связанных с низкой плотностью кости или низкой прочностью кости, таких как остеопороз, или для стимуляции роста кости у пациентов, например, с переломом кости. Кроме того, в описании показано, что антагонисты активина-ActRIIa являются эффективными для профилактики и/или восстановления кости при повреждении, вызванном множественными миеломами и опухолями молочной железы, и, кроме того, что антагонисты активина-ActRIIa уменьшают воздействие опухоли при множественной миеломе. Растворимый полипептид ActRIIa стимулирует рост кости, не вызывая последовательного значительного увеличения мышечной массы.

В конкретных аспектах изобретение относится к полипептидам, содержащим растворимый, связывающий активин полипептид ActRIIa, который связывается с активином. Полипептиды ActRIIa можно вводить в состав фармацевтического препарата, содержащего связывающий активин полипептид ActRIIa и фармацевтически приемлемый носитель. Предпочтительно, связывающий активин полипептид ActRIIa связывает активин с K_D менее 1 микромолярной или менее 100, 10 или 1 наномолярной. Необязательно, связывающий активин полипептид ActRIIa селективно связывает активин по сравнению с GDF11 и/или GDF8, и предпочтительно, с K_D , по меньшей мере в 10 раз, 20 раз или 50 раз меньшей по отношению к активину, чем по отношению к GDF11 и/или GDF8. Без желания быть связанными с конкретным механизмом действия, предполагают, что такая степень селективности для ингибирования активина по сравнению с ингибированием GDF11/GDF8 является причиной селективного эффекта на кость без согласованного поддающегося измерению эффекта на мышцу. Во многих вариантах осуществления полипептид ActRIIa выбирают как вызывающий менее 15%, менее 10% или менее 5% увеличения мышцы в дозах, при которых достигается желательный эффект на кость. Предпочтительно, чистота композиции составляет по меньшей мере на 95% по сравнению с другим полипептидным компонентом, как оценено эксклюзионной хроматографией, и более предпочтительно, композиция является по меньшей мере на 98%. Связывающий активин полипептид ActRIIa для использования в таком препарате может представлять собой любой из описанных в настоящем описании, такой как полипептид, обладающий аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 2, 3, 7 или 12, или обладающий аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 99% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2, 3, 7, 12 или 13. Связывающий активин полипептид ActRIIa может включать функциональный фрагмент природного полипептида ActRIIa, такой как содержащий по меньшей мере 10, 20 или 30 аминокислот из последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-3 или последовательности SEQ ID NO: 2 с отсутствием от 10 до 15 С-концевых аминокислот ("хвоста").

Растворимый связывающий активин полипептид ActRIIa может включать одно или несколько из-

менений в аминокислотной последовательности (например, в связывающем лиганд домене) по сравнению с природным полипептидом ActRIIa. Примеры измененных полипептидов ActRIIa представлены в WO 2006/012627, стр. 59-60, содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Изменение аминокислотной последовательности может, например, изменять гликозилирование полипептида при продукции клетками млекопитающих, насекомых или в других эукариотических клетках или изменять протеолитическое расщепление полипептида по сравнению с природным полипептидом ActRIIa.

Связывающий активин полипептид ActRIIa может представлять собой слитый белок, который имеет, в качестве одного домена, полипептид ActRIIa (например, связывающую лиганд часть ActRIIa) и один или несколько дополнительных доменов, которые придают желаемое свойство, такое как улучшенную фармакокинетику, упрощенную очистку, нацеливание на конкретные ткани и тому подобное. Например, домен слитого белка может улучшать стабильность *in vivo*, время полужизни *in vivo*, поглощения/введения, локализацию или распределение в ткани, формирование комплексов белка, мультимеризацию слитого белка и/или очистку, или одновременно несколько из этих параметров. Димеризация или мультимеризация может приводить к увеличению аффинности связывания лиганда. Связывающий активин слитый белок ActRIIa может включать домен Fc иммуноглобулина (дикого типа или мутантный) или часть сывороточного альбумина или другого полипептида, которые придают желательные свойства, такие как улучшенную фармакокинетику, улучшенную растворимость или улучшенную стабильность. Как правило, слитый белок ActRIIa-Fc продуцируется в виде гомодимерного комплекса. Необязательно, слитый белок ActRIIa-Fc содержит относительно неструктурированный линкер, расположенный между доменом Fc и внеклеточным доменом ActRIIa. Этот неструктурированный линкер может соответствовать неструктурированной области приблизительно из 15 аминокислот на С-конце внеклеточного домена ActRIIa ("хвосте"), или может представлять собой искусственную последовательность из 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот, или отрезок длиной между 5 и 15, 20, 30, 50 или более аминокислот, относительно свободных от вторичной структуры, или смесь из обоих. Линкер может быть богат остатками глицина и пролина и может, например, содержать единственную последовательность треонина/серина и глицинов или повторяющиеся последовательности треонина/серина и глицинов (например, синглеты или повторы TG₄ или SG₄). Слитый белок может включать субпоследовательность для очистки, такую как эпитоп-метка, метка FLAG, полигистидиновая последовательность и слитый GST. Необязательно, растворимый полипептид ActRIIa 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 дериватирующим средством. Фармацевтический препарат может также включать одно или несколько дополнительных соединений, таких как соединение, которое используют для лечения нарушения кости.

Предпочтительно, фармацевтический препарат является по существу апиогенным. Как правило, предпочтительно, белок ActRIIa является экспрессированным в линии клеток млекопитающего, которая опосредует соответствующее природное гликозилирование белка ActRIIa, уменьшая вероятность неблагоприятного иммунного ответа у пациента. Линии клеток человека и CHO успешно использовали, что говорит о том, что другие экспрессирующие системы млекопитающих будут используемыми.

Как описано в настоящем описании белки ActRIIa, обозначенные как ActRIIa-Fc, обладают желательными свойствами, включая селективное связывание с активином по сравнению с GDF8 и/или GDF11, высокоаффинное связывание лиганда и время полужизни в сыворотке более двух недель на моделях животных. В конкретных вариантах осуществления изобретение относится к полипептидам ActRIIa-Fc и фармацевтическим препаратам, содержащим такие полипептиды и фармацевтически приемлемый наполнитель.

В конкретных аспектах изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим растворимый связывающий активин полипептид ActRIIa. Выделенный полинуклеотид может содержать кодирующую последовательность растворимого связывающего активин полипептида ActRIIa, такого, как описано выше. Например, выделенная нуклеиновая кислота может включать последовательность, кодирующую внеклеточный домен (например, связывающий лиганд домен) ActRIIa, и последовательность, которая будет кодировать часть или весь трансмембранный домен и/или цитоплазматический домен ActRIIa, кроме стоп-кодона, расположенного внутри трансмембранного домена или цитоплазматического домена, или расположенного 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 частично усеченный вариант, где указанный выделенный полинуклеотид дополнительно содержит кодон терминации транскрипции по меньшей мере за шестьсот нуклеотидов до 3'-конца или расположенного другим образом, так чтобы трансляция полинуклеотида приводила к внеклеточному домену, необязательно, слитому с усеченной частью полноразмерного ActRIIa. Предпочтительная последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой SEQ ID NO: 14. Нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем описании, могут быть функционально связанными с промотором экспрессии, и изобретение относится к клеткам, транс-

формированным такими рекомбинантными полинуклеотидами. Предпочтительно, клетка представляет собой клетку млекопитающего, такую как клетка CHO.

В конкретных аспектах описание относится к способам получения растворимого связывающего активин полипептида ActRIIa. Такой способ может включать в себя экспрессию любой нуклеиновой кислоты (например, SEQ ID NO: 4, 5 или 14), описанных в настоящем описании, в подходящей клетке, такой как клетка яичника китайского хомячка (CHO). Такой способ может включать в себя: а) культивирование клетки в условиях, подходящих для экспрессии растворимого полипептида ActRIIa, где указанную клетку трансформируют растворимой экспрессирующей конструкцией ActRIIa; и б) выделение экспрессированного таким образом растворимого полипептида ActRIIa. Растворимые полипептиды ActRIIa можно выделять в виде неочищенных, частично очищенных или высоко очищенных фракций. Очистку можно проводить серией стадий очистки, включая, например, одно, два или три или более из следующего, в любом порядке: хроматография с белком А, анионообменная хроматография (например, на Q-сефарозе), хроматография гидрофобного взаимодействия (например, на фенилсефарозе), эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография.

В конкретных аспектах антагонист активина-ActRIIa, описанный в настоящем описании, такой как растворимый, связывающий активин полипептид ActRIIa, можно использовать в способе стимуляции роста кости или увеличения плотности кости у индивида. В конкретных вариантах осуществления описание относится к способам лечения нарушения, связанного с низкой плотностью кости, или стимуляции роста кости у пациентов. Способ может включать введение индивиду эффективного количества антагониста активина-ActRIIa. В конкретных аспектах описание относится к применению антагониста активина-ActRIIa для получения лекарственного средства для лечения нарушения или состояния, как описано в настоящем описании.

В конкретных аспектах описание относится к способу идентификации средства, стимулирующего рост или увеличивающего минерализацию кости. Способ включает: а) идентификацию тестируемого средства, которое связывается с активином или со связывающим лиганд доменом полипептида ActRIIa; и б) оценку эффекта средства на рост или минерализацию кости.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показана очистка ActRIIa-hFc, экспрессированного в клетках CHO. Белок очищают в виде одиночного, четко выраженного пика.

На фиг. 2 показано связывание ActRIIa-hFc с активином и GDF-11, как измерено анализом BiaCore™.

На фиг. 3 показана схема анализа репортерного гена A-204. На фиг. показан репортерный вектор: pGL3(CAGA)12 (описанный в Dennler et al., 1998, EMBO 17: 3091- 3100.) Повтор CAGA12 присутствует в генах, отвечающих на TGF-бета (ген PAI-1), так что этот вектор имеет основное применение для факторов, передающих сигнал через Smad 2 и 3.

На фиг. 4 показаны эффекты ActRIIa-hFc (ромбы) и ActRIIa-mFc (квадраты) на передачу сигнала GDF-8 в анализе репортерного гена в A-204. Для обоих белков показали существенное ингибирование опосредованной GDF-8 передачи сигналов в пикомолярных концентрациях.

На фиг. 5 показаны эффекты трех различных препаратов ActRIIa-hFc на передачу сигнала GDF-11 в анализе репортерного гена в A-204.

На фиг. 6 показаны примеры изображений DEXA контрольных и обработанных ActRIIa-mFc мышей BALB/c, до (верхние панели) и после (нижние панели) 12-недельного периода обработки. Светлое окрашивание указывает на увеличенную плотность кости.

На фиг. 7 показано количественное определение эффектов ActRIIa-mFc на минеральную плотность кости у мышей BALB/c в течение 12-недельного периода. Обработки представляли собой контроль (ромбы), 2 мг/кг дозирование ActRIIa-mFc (квадраты), 6 мг/кг дозирование ActRIIa-mFc (треугольники) и 10 мг/кг дозирование ActRIIa-mFc (круги).

На фиг. 8 показано количественное определение эффектов ActRIIa-mFc на минеральное содержание кости у мышей BALB/c в течение 12-недельного периода. Обработки представляли собой контроль (ромбы), 2 мг/кг дозирование ActRIIa-mFc (квадраты), 6 мг/кг дозирование ActRIIa-mFc (треугольники) и 10 мг/кг дозирование ActRIIa-mFc (круги).

На фиг. 9 показано количественное определение эффектов ActRIIa-mFc на минеральную плотность кости для губчатой кости у мышей C57BL6 после овариэктомии (OVX) или ложной операции (SHAM) после 6-недельного периода. Обработки представляли собой контроль (PBS) или 10 мг/кг дозирование ActRIIa-mFc (ActRIIa).

На фиг. 10 показано количественное определение эффектов ActRIIa-mFc на губчатую кость у мышей C57BL6 после овариэктомии (OVX) в течение 12-недельного периода. Обработки представляли собой контроль (PBS; светлые столбцы) или 10 мг/кг дозирование ActRIIa-mFc (ActRIIa; темные столбцы).

На фиг. 11 показано количественное определение эффектов ActRIIa-mFc на губчатую кость у мышей C57BL6 после ложной операции после периода обработки 6 или 12 недель. Обработки представляли собой контроль (PBS; светлые столбцы) или 10 мг/кг дозирование ActRIIa-mFc (ActRIIa; темные столбцы).

На фиг. 12 показаны результаты анализа pQCT плотности кости у мышей после овариэктомии в течение 12 недель обработки. Обработки представляли собой контроль (PBS; светлые столбцы) или ActRIIa-mFc (темные столбцы), у-ось: мг/см³.

На фиг. 13 показаны результаты анализа pQCT плотности кости у мышей после ложной операции в течение 12 недель обработки. Обработки представляли собой контроль (PBS; светлые столбцы) или ActRIIa-mFc (темные столбцы), у-ось: мг/см³.

На фиг. 14А и 14В показан анализ DEXA всего организма после 12 недель обработки (А) и анализ ex vivo бедренной кости (В). Светлые области показывают области высокой плотности кости.

На фиг. 15 показан анализ pQCT ex vivo середины диафиза бедренной кости после двенадцати недель обработки. Обработки представляли собой контроль - носитель (PBS, темные столбцы) и ActRIIa-mFc (светлые столбцы). Четыре столбца слева показывают общую плотность кости, тогда как четыре столбца справа показывают плотность трубчатой кости. Первая пара столбцов в каждом наборе из четырех столбцов представляет данные для мышей после овариэктомии, тогда как вторая пара столбцов представляет данные для мышей после ложной операции.

На фиг. 16 показан анализ pQCT ex vivo и диафизарное содержание кости середины диафиза бедренной кости после двенадцати недель обработки. Обработки представляли собой контроль - носитель (PBS, темные столбцы) или ActRIIa-mFc (светлые столбцы). Четыре столбца слева показывают общее содержание кости, тогда как четыре столбца справа показывают содержание трубчатой кости. Первая пара столбцов в каждом наборе из четырех столбцов представляет данные для мышей после овариэктомии, тогда как вторая пара столбцов представляет данные для мышей после ложной операции.

На фиг. 17 показан анализ pQCT ex vivo толщины середины диафиза бедренной кости и толщины кортикального слоя бедренной кости. Обработки представляли собой контроль (PBS, темные столбцы) и ActRIIa-mFc (светлые столбцы). Четыре столбца слева показывают эндостальную окружность, тогда как четыре столбца справа показывают периостальную окружность. Первая пара столбцов в каждом наборе из четырех столбцов представляет данные для мышей после овариэктомии, тогда как вторая пара столбцов представляет данные для мышей после ложной операции.

На фиг. 18 показаны результаты механического тестирования бедренной кости после двенадцати недель обработки. Обработки представляли собой контроль (PBS, темные столбцы) и ActRIIa-mFc (светлые столбцы). Два столбца слева представляют данные для мышей после овариэктомии, тогда как остальные два столбца представляют данные для мышей после ложной операции.

На фиг. 19 показаны эффекты ActRIIa-mFc на объем губчатой кости.

На фиг. 20 показаны эффекты ActRIIa-mFc на губчатую архитектуру в дистальной части бедренной кости.

На фиг. 21 показаны эффекты ActRIIa-mFc на трубчатую кость.

На фиг. 22 показаны эффекты ActRIIa-mFc на механическую прочность кости.

На фиг. 23 показаны эффекты различных доз ActRIIa-mFc на характеристики кости при трех различных дозах.

На фиг. 24 показана гистоморфометрия кости, показывающая, что ActRIIa-mFc обладает двойной анаболической и антирезорбтивной активностью.

На фиг. 25 показаны дополнительные гистоморфометрические данные.

На фиг. 26 показаны изображения бедренной кости мыши от наивных и несущих опухоль мышей, и эффекты обработки ActRIIa-mFc на морфологию костей на модели множественной миеломы. Для мышей, несущих опухоли - множественные миеломы (5T2) показали заметное выкрашивание и деградацию кости по сравнению с нормальными мышами (наивными). Обработка ActRIIa-mFc прекращает этот эффект.

На фиг. 27 показаны результаты клинического испытания на людях, описанного в примере 5, где площадь под кривой (AUC) и введенная доза ActRIIa-hFc обладали линейной корреляцией, независимо от того, вводили ли ActRIIa-hFc внутривенно (IV) или подкожно (SC).

На фиг. 28 показано сравнение уровней ActRIIa-hFc в сыворотке у пациентов после введения IV или SC.

На фиг. 29 показаны уровни костной щелочной фосфатазы кости (BAP) в ответ на различные уровни дозы ActRIIa-hFc. BAP является маркером анаболического роста кости.

На фиг. 30 показаны суммарные эффекты ActRIIa-mFc (RAP-011) и бисфосфонатного средства (золедроната) у мышей.

Подробное описание изобретения

1. Обзор

Суперсемейство трансформирующего фактора роста-бета (TGF-бета) содержит множество факторов роста, разделяющих общие элементы последовательности и структурные повторы. Известно, что эти белки оказывают биологические эффекты на большое множество типов клеток как позвоночных, так и беспозвоночных. Члены суперсемейства выполняют важные функции в процессе эмбрионального развития для образования структур и спецификации тканей и могут влиять на множество процессов дифференцировки, включая адипогенез, миогенез, хондрогенез, кардиоогенез, гемопоэз, нейрогенез и диффе-

ренцировку эпителиальных клеток. Семейство разделено на две основные ветви: ветви BMP/GDF и TGF-бета/активина/BMP10, члены которых оказывают разнообразные, часто комплементарные эффекты. Путем манипуляции активностью члена семейства TGF-бета, часто возможно значительные физиологические изменения в организме. Например, породы крупного рогатого скота Пьемонтская и Бельгийская голубая несут мутацию с потерей функции в гене GDF8 (называемом также миостатином), которая вызывает заметное увеличение мышечной массы. Grobet et al., *Nat Genet.* 1997, 17(1):71-4. Более того, у человека, неактивные аллели GDF8 связаны с увеличенной мышечной массой и, по имеющимся сообщениям, исключительной силой. Schuelke et al., *N Engl J Med* 2004, 350:2682-8.

Активины представляют собой димерные полипептидные факторы роста, относящиеся к суперсемейству TGF-бета. Существует три главных формы активина (A, B, и AB), которые представляют собой гомо/гетеродимеры из двух близкородственных β -субъединиц ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$, и $\beta_A\beta_B$). Геном человека кодирует также активин С и активин Е, которые в первую очередь экспрессируются в печени. В суперсемействе TGF-бета активины представляют собой уникальные и многофункциональные факторы, которые могут стимулировать продукцию гормонов в клетках яичника и плаценты, поддерживать жизнеспособность нейрональных клеток, влиять на прогрессирование клеточного цикла, положительно или отрицательно, в зависимости от типа клеток, и индуцировать мезодермальную дифференцировку по крайней мере у эмбрионов земноводных (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 фактор эритроидной дифференцировки (EDF), выделенный из стимулированных моноцитарных лейкозных клеток человека, идентичен активину А (Murata et al., 1988, *PNAS*, 85:2434). Было сделано предположение, что активин А действует как природный, положительный регулятор эритропоэза в костном мозге. В некоторых тканях передачу сигнала от активина ингибирует родственный ему гетеродимер, ингибин. Например, во время высвобождения фолликулостимулирующего гормона (FSH) из гипофиза, активин стимулирует секрецию и синтез FSH, тогда как ингибин предотвращает секрецию и синтез FSH. К другим белкам, которые могут регулировать биоактивность активина и/или связывать активин, относятся фоллистатин (FS), родственный фоллистатину белок (FSRP) и α_2 -макроглобулин.

Сигналы TGF- β опосредованы гетеромерными комплексами рецепторов серин/треонинкиназы типа I и типа II, которые фосфорилируют и активируют нижележащие белки Smad при стимуляции лигандом (Massague, 2000, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:169-178). Эти рецепторы типа I и типа II представляют собой трансмембранные белки, состоящие из связывающего лиганд внеклеточного домена с богатой цистеином областью, трансмембранного домена и цитоплазматического домена с рассчитанной специфичностью к серину/треонину. Рецепторы типа I необходимы для передачи сигнала; и рецепторы типа II необходимы для связывания лигандов и экспрессии рецепторов типа I. Рецепторы активина типа I и II образуют стабильный комплекс после связывания лиганда, что приводит к фосфорилированию рецепторов типа I рецепторами типа II.

Два родственных рецептора типа II, ActRIIa и ActRIIb, были идентифицированы как рецепторы типа II для активинов (Mathews and Vale, 1991, *Cell* 65:973-982; Attisano et al., 1992, *Cell* 68: 97-108). Помимо активинов, ActRIIa и ActRIIb могут биохимически взаимодействовать с несколькими другими белками семейства TGF-J3, включая 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). ALK4 представляет собой первичный рецептор типа I активинов, в частности, активина А, и ALK-7 может также служить рецептором активинов, в частности, активина В.

Как показано в настоящем описании, растворимый полипептид ActRIIa (sActRIIa), для которого продемонстрирована значительная предпочтительность связывания с активином А в отличие от других членов семейства TGF-бета, таких как GDF8 или GDF11, является эффективным для стимуляции роста кости и увеличения плотности кости *in vivo*. Не ограничиваясь каким-либо конкретным механизмом, предполагают, что эффект sActRIIa вызван в первую очередь эффектом антагониста активина, принимая во внимание крайне сильное связывание активина (пикомолярная константа диссоциации), показанное для конкретной конструкции sActRIIa, используемой в этих исследованиях. Независимо от механизма, из представленных в настоящем описании данных очевидно, что антагонисты ActRIIa-активина действительно повышают плотность кости у нормальных мышей, на моделях остеопороза у мышей и модели множественной миеломы у мышей. Следует отметить, что кость является динамической тканью, растущей или уменьшающейся, с увеличивающейся или уменьшающейся плотностью в зависимости от равновесия факторов, образующих кость и стимулирующих минерализацию (в первую очередь, остеобластов), и факторов, разрушающих и деминерализующих кость (в первую очередь, остеокластов). Рост и минерализацию кости можно усилить увеличивая количество образующих факторов, уменьшая количество разрушающих факторов, или и тем, и другим. Термины "стимулировать рост кости" и "увеличивать минерализацию кости" относятся к наблюдаемым физическим изменениям в кости и эти термины являются нейтральными по отношению к механизму, благодаря которому происходят изменения в кости.

Считается, что модели остеопороза у мышей и модели роста/плотности кости, которые использова-

ли в описанных в настоящем описании исследованиях, имеют высокую прогностическую способность в отношении эффективности у человека, и таким образом, это описание относится к способам использования полипептидов ActRIIa и других антагонистов активина-ActRIIa для стимуляции роста кости и увеличения плотности кости у человека. Антагонисты активина-ActRIIa включают, например, связывающие активин растворимые полипептиды ActRIIa, антитела, которые связывают активин (в частности, субъединицы А или В активина, обозначаемые также как (3А или (3В) и нарушают связывание ActRIIa, антитела, которые связывают ActRIIa и нарушают связывание активина, не относящиеся к антителу белки, выбранные по связыванию активина или ActRIIa (см., например, в WO/2002/088171, WO/2006/055689 и WO/2002/032925 примеры таких белков и способы для конструирования и отбора таких реагентов со связыванием, не относящимся к аффинности антитела), и случайные пептиды, выбранные по связыванию активина или ActRIIa, часто прикрепленные к домену Fc. Два различных белка (или другие молекулы) с активностью связывания активина или ActRIIa, особенно связывающие активин вещества, которые блокируют участки связывания типа I (например, растворимый рецептор активина типа I) и типа II (например, растворимый рецептор активина типа II), соответственно, можно соединять вместе для создания бифункциональной связывающей молекулы. Аптамеры нуклеиновой кислоты, малые молекулы и другие средства, которые ингибируют ось передачи сигнала активина-ActRIIa. Различные белки обладают активностью антагониста активина-ActRIIa, включая ингибин (т.е., альфа-субъединицу ингибина), хотя ингибин не является универсальным антагонистом активина во всех тканях, фоллистатин (например, фоллистатин-288 и фоллистатин-315), FSRP, активин С, α_2 -макроглобулин, и мутантный активин А M108A (с заменой метионина на аланин в положении 108). Как правило, альтернативные формы активина, в частности, формы с изменениями в связывающем рецептор типа I домене, могут связывать рецепторы типа II и не могут образовывать активный трехкомпонентный комплекс, таким образом, действуя как антагонисты. Кроме того, нуклеиновые кислоты, такие как антисмысловые молекулы, мРНК или рибозимы, ингибирующие экспрессию активина А, В, С или Е, или, в частности, ActRIIa, можно использовать в качестве антагонистов активина-ActRIIa. Предпочтительно, следует использовать антагонист активина-ActRIIa, обладающий селективностью для ингибирования опосредованной активином передачи сигнала по сравнению с другими членами семейства TGF- β , и в частности, по отношению к GDF8 и GDF11. Растворимые белки ActRIIb действительно связывают активин, однако, белок дикого типа не обладает значительной селективностью для связывания активина по сравнению с GDF8/11, и предварительные эксперименты позволяют предполагать, что этот белок не обеспечивает желательные эффекты на кость, тогда как вызывает также существенный рост мышц. Однако, идентифицировали измененные формы ActRIIb с различными связывающими свойствами (см., например, WO 2006/012627, стр. 55-59, содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки), и с этими белками можно достигать желательных эффектов на кость. Природному или измененному ActRIIb можно придавать дополнительную специфичность в отношении активина благодаря присоединению второго селективного для активина связывающего вещества.

Термины, используемые в описании, как правило имеют обычное в данной области значение, в контексте этого изобретения и в конкретном контексте, где используют каждый термин. Конкретные термины описаны ниже или в другом месте описания, чтобы обеспечить дополнительное руководство специалисту в данной области в описании композиций и способов по изобретению и того, как их получать и использовать. Объем или значение любого использования термина очевидны из конкретного контекста, в котором используют термин.

"Около" и "приблизительно", как правило, означают приемлемую степень ошибки для количественного измерения с учетом характера или точности измерений. Как правило, примерные степени ошибки лежат в пределах 20 процентов (%), предпочтительно, в пределах 10%, и более предпочтительно, в пределах 5% данного значения или диапазона значений.

Альтернативно, и особенно в биологических системах, термины "около" и "приблизительно" могут обозначать значения, находящиеся в пределах порядка величины, предпочтительно, в пределах 5-кратной и более предпочтительно, в пределах 2-кратной данной величины. Числовые количества, приведенные в настоящем описании, являются приблизительными, если не указано иначе, что означает, что термин "около" или "приблизительно" можно подразумевать, когда он не указан прямо.

Способы по изобретению могут включать в себя стадии сравнения последовательностей друг с другом, включая сравнение последовательности дикого типа с одним или несколькими мутантами (вариантами последовательности). Такие сравнения, как правило, включают сравнение последовательностей полимеров, например, с использованием программ и/или алгоритмов выравнивания последовательности, которые хорошо известны в данной области (например, BLAST, FASTA и MEGALIGN, чтобы указать немногие). Специалисту в данной области ясно понятно, что, при таких выравниваниях, где мутация содержит вставку или делецию остатка, в выравнивание последовательности будут вносить "пропуск" (как правило, представленный штрихом, или "A") в последовательности полимера, не содержащей вставленного или делетированного остатка.

"Гомологичный", во всех его грамматических формах и вариантах написания, относится к родству

между двумя белками, обладающими "общим эволюционным происхождением", включая белки из суперсемейств одних и тех же организмов, а также гомологичные белки из различных видов организмов. Такие белки (и кодирующие их нуклеиновые кислоты) обладают гомологией последовательности, как отражено сходством их последовательности, по отношению к процентной идентичности или по присутствию специфических остатков или повторов и консервативных положений.

Термин "сходство последовательности", во всех его грамматических формах, относится к степени идентичности или соответствия между последовательностями нуклеиновой кислоты или аминокислот, которые могут разделять или не разделять общее эволюционное происхождение.

Однако, как принято, и в настоящей заявке, термин "гомологичный", при модификации наречиями, такими как "высоко", может относиться к сходству последовательности и может относиться или не относиться к общему эволюционному происхождению.

2. Полипептиды ActRIIa

В конкретных аспектах настоящее изобретение относится к полипептидам ActRIIa. Как используется в настоящем описании, термин "ActRIIa" относится к белкам семейства рецепторов активина типа IIa (ActRIIa) любых видов и к вариантам, полученным из таких белков ActRIIa посредством мутагенеза или другой модификации. Ссылку на ActRIIa в настоящем описании следует понимать как ссылку на любую из идентифицированных в настоящее время форм. Члены семейства ActRIIa, как правило, представляют собой трансмембранные белки, состоящие из связывающего лиганд внеклеточного домена с богатой цистеином областью, трансмембранного домена и цитоплазматического домена с предсказанной активностью серина/треонинкиназы.

Термин "полипептид ActRIIa" включает в себя полипептиды, содержащие любой природный полипептид из членов семейства ActRIIa, а также из любых их вариантов (включая формы мутантов, фрагментов, слитых белков и пептидомиметиков), которые сохраняют применимую активность. Например, полипептиды ActRIIa включают полипептиды, полученные из последовательности любого известного ActRIIa, обладающего последовательностью, по меньшей мере приблизительно на 80% идентичной последовательности полипептида ActRIIa, и предпочтительно, идентичной по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или более. Например, полипептид ActRIIa по изобретению может связывать белок ActRIIa и/или активин и ингибировать его функцию. Предпочтительно, полипептид ActRIIa стимулирует рост кости и минерализацию кости. Примеры полипептидов ActRIIa включают в себя 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 является следующей:

**MGAAAKLAFVFLISCSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEP
CYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD D INCYDR TDCVEKKDSP
EVYFCCCEGNMCNEKFSYFP**EMEVTQPTSNPVTPKPPYYNILLYSVLPL
MLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLVPTQDPGPPPPSPLLGLKPLQLLE
VKARGRFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKHEN
ILQFIGAEKRGTSVDVDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVVS WNELCHIAE
TMARGLAYLHEDI PGLKDG HKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFGL
ALKFEAGKSAGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGL
VLWELASRCTAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEDMQEVVVHKKKRPVL
RDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMQRLTNIIT
TEDIVTVVTMVTNVDFPPKESL (SEQ ID NO: 1)

Сигнальный пептид подчеркнут одной линией; внеклеточный домен отмечен жирным, и потенциальные участки N-связанного гликозилирования подчеркнуты дважды.

Последовательность растворимого (внеклеточного) полипептида ActRIIa человека после процессинга является следующей:

**ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISG
SIEIVKQGCWLD D INCYDR TDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP
EMEVTQPTSNPVTPKPP (SEQ ID NO: 2)**

С-концевой "хвост" внеклеточного домена подчеркнут. Последовательность с делетированным "хвостом" (последовательность Δ15) является следующей:

**ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISG
SIEIVKQGCWLD D INCYDR TDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP
EM (SEQ ID NO: 3)**

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-предшественник ActRIIa человека, является следующей (нуклеотиды 164-1705 из записи NM_001616 в Genbank):

ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGCCGTCTTTCTTATCTCCTGTTCTTCAGGTGC
TATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAG
ACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCAT
TGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCCATTGAAATAGTGAAACAAGGTTGTTG
GCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAAAGACAGCCCTG
AAGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCA
GAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCTATTACAA
CATCCTGCTCTATTCCCTGGTGCCACTTATGTTAATTGCGGGGATTGTCATTTGTGCAT
TTTGGGTGTACAGGCATCACAAGATGGCCTACCCCTCCTGTACTTGTTCCAACTCAAGAC
CCAGGACCACCCCCACCTTCTCCATTACTAGGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAAGT
GAAAGCAAGGGGAAGATTTGGTTGTGTCTGGAAAGCCCAGTTGCTTAACGAATATGTGG
CTGTCAAAATATTTCCAATACAGGACAAACAGTCATGGCAAAATGAATACGAAGTCTAC
AGTTTGCCTGGAATGAAGCATGAGAACATATTACAGTTCATTGGTGAGAAAAACGAGG
CACCAGTGTGATGTGGATCTTTGGCTGATCACAGCATTTTCATGAAAAGGGTTCACTAT
CAGACTTTCTTAAGGCTAATGTGGTCTCTTGGAAATGAACTGTGTCATATTGCAGAAACC
ATGGCTAGAGGATTGGCATATTTACATGAGGATATACCTGGCCTAAAAAGATGGCCACAA
ACCTGCCATATCTCACAGGGACATCAAAAGTAAAAATGTGCTGTGAAAAACAACCTGA
CAGCTTGCAATTGCTGACTTTGGGTTGGCCTTAAAATTTGAGGCTGGCAAGTCTGCAGGC
GATACCCATGGACAGGTTGGTACCCGGAGGTACATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTGC
TATAAACTTCCAAAGGGATGCATTTTTGAGGATAGATATGTATGCCATGGGATTAGTCC
TATGGGAAGTGGCTTCTCGCTGTACTGCTGCAGATGGACCTGTAGATGAATACATGTTG
CCATTTGAGGAGGAAATTGGCCAGCATCCATCTCTTGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGT
GCATAAAAAAAGAGGCCGTGTTTAAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGAATGGCAA
TGCTCTGTGAAACCATGAAGAATGTTGGGATCACGACGCAGAAGCCAGGTTATCAGCT
GGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCAGAGACTAACAAATATTATTACCACAGA
GGACATTGTAACAGTGGTCACAATGGTGACAAATGTTGACTTTCCCTCCCAAAGAATCTA
GTCTATGA (SEQ ID NO: 4)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей растворимый (внеклеточный) полипептид ActRIIa человека, является следующей:

ATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGA
CAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATT
GTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCCATTGAAATAGTGAAACAAGGTTGTTGG
CTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAAAGACAGCCCTGA
AGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCAG
AGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCC (SEQ ID
NO: 5)

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к растворимым полипептидам ActRIIa. Как описано в настоящем описании, термин "растворимые полипептиды ActRIIa", как правило, относится к полипептидам, содержащим внеклеточный домен белка ActRIIa. Термин "растворимый полипептид ActRIIa", как используется в настоящем описании, включает любой природный внеклеточный домен белка ActRIIa, а также любые его варианты (включая формы мутантов, фрагментов и пептидометиков).

Связывающий активин полипептид ActRIIa представляет собой полипептид, который сохраняет способность связывать активин, в частности, активин AA, АВ или ВВ. Предпочтительно, связывающий активин полипептид ActRIIa будет связывать активин AA с константой диссоциации 1 нМ или менее. Аминокислотные последовательности белка-предшественника ActRIIa человека представлены ниже. Внеклеточный домен белка ActRIIa связывает активин и, как правило, является растворимым, и таким

образом, его можно обозначать как растворимый связывающий активин полипептид ActRIIa. Примеры растворимых связывающих активин полипептидов ActRIIa включают растворимый полипептид, проиллюстрированный на SEQ ID NO: 2, 3, 7, 12 и 13. SEQ ID NO: 7 обозначен ActRIIa-hFc и дополнительно описан в примерах. Другие примеры растворимых связывающих активин полипептидов ActRIIa кроме внеклеточного домена белка ActRIIa содержат сигнальную последовательность, например, лидерную последовательность меллитина пчелы медоносной (SEQ ID NO: 8), лидер тканевого активатора плазминогена (TPA) (SEQ ID NO: 9) или лидер природного ActRIIa (SEQ ID NO: 10). В полипептиде ActRIIa-hFc, проиллюстрированном на SEQ ID NO: 13, использован лидер TPA.

Функционально активные фрагменты полипептидов ActRIIa могут быть получены скринингом полипептидов после рекомбинантной продукции с соответствующего фрагмента нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид ActRIIa. Кроме того, фрагменты можно химически синтезировать с использованием известных в данной области способов, таких как общепринятый твердофазный химический способ синтеза полипептидов по Меррифилду с f-Мос или t-Вос. Фрагменты могут быть получены (рекомбинантно или химическим синтезом) и тестированы для идентификации тех пептидных фрагментов, которые могут функционировать как антагонисты (ингибиторы) белка ActRIIa или передачи сигнала, опосредованной активинном.

Функционально активные варианты полипептидов ActRIIa могут быть получены скринингом библиотек модифицированных полипептидов после рекомбинантной продукции с соответствующих подвергнутых мутагенезу нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид ActRIIa. Варианты могут быть получены и тестированы для идентификации тех, которые могут функционировать как антагонисты (ингибиторы) белка ActRIIa или передачи сигнала, опосредованной активинном. В конкретных вариантах осуществления функциональный вариант полипептидов ActRIIa содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2 или 3. В конкретных случаях функциональный вариант обладает аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2 или 3.

Функциональные варианты могут быть получены модификацией структуры полипептида ActRIIa для таких целей, как увеличение терапевтической эффективности или стабильности (например, срока хранения *ex vivo* и устойчивости к протеолитической деградации *in vivo*). Такие модифицированные полипептиды ActRIIa при отборе по сохранению связывания активина считают функциональными эквивалентами природных полипептидов ActRIIa. Модифицированные полипептиды ActRIIa могут также быть получены, например, посредством замены, делеции или добавления аминокислоты. Например, можно предположить, что отдельная замена лейцина на изолейцин или валин, аспартата на глутамат, треонина на серин, или подобной замены аминокислоты на структурно родственную аминокислоту (например, консервативные мутации) не оказывают основного эффекта на биологическую активность полученной молекулы. Консервативные замены представляют собой такие замены, которые имеют место внутри семейства аминокислот, являющихся родственными по их боковым цепям. Приводит ли изменение в аминокислотной последовательности полипептида ActRIIa к функциональному гомологу, можно легко определить оценкой способности варианта полипептида ActRIIa вызывать ответ клеток сходным образом с полипептидом ActRIIa дикого типа.

В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к конкретным мутациям полипептидов ActRIIa, изменяющим гликозилирование полипептида. Такие мутации могут быть выбраны так, чтобы вводить или исключать один или несколько участков гликозилирования, таких как участки О-связанного или N-связанного гликозилирования. Участки распознавания аспарагин-связанного гликозилирования, как правило, содержат трипептидную последовательность, аспарагин-Х-треонин (или аспарагины-Х-серин) (где "Х" представляет собой любую аминокислоту), которую специфически распознают соответствующие клеточные ферменты гликозилирования. Изменение можно осуществлять также добавлением или заменой одного или нескольких остатков серина или треонина в последовательности полипептида ActRIIa дикого типа (в случае участков О-связанного гликозилирования). Множество замен или делеций аминокислот в одном или обоих из первого или третьего положений аминокислот участка распознавания для гликозилирования (и/или делеция аминокислоты во втором положении) приводит к отсутствию гликозилирования в модифицированной трипептидной последовательности. Другими способами увеличения числа углеводных групп на полипептиде ActRIIa являются химическое или ферментативное присоединение гликозидов к полипептиду ActRIIa. В зависимости от используемого способа присоединения, сахар(а) можно присоединять к (а) аргинину и гистидину; (b) свободным карбоксильным группам; (c) свободным сульфгидрильным группам, таким как группы цистеина; (d) свободным гидроксильным группам, таким как группы серина, треонина или гидроксипролина; (e) ароматическим остаткам, таким как остатки фенилаланина, тирозина или триптофана; или (f) амидной группе глутамина. Такие способы описаны в WO 87/05330, опубликованном 11 сентября 1987 г., и в статье Aplin and Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306, содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Удаление одного или нескольких углеводных групп, присутствующих на полипептиде ActRIIa, можно осуществлять химически и/или ферментативно. Химическое дегликозилирование может

включать, например, воздействие на полипептид ActRIIa соединением трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентным соединением. Эта обработка приводит к отщеплению большинства или всех Сахаров, за исключением связывающего сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), в то же время оставляя аминокислотную последовательность интактной. Химическое дегликозилирование дополнительно описано в статье Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 и Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131. Ферментативное отщепление групп углевода на полипептидах ActRIIa можно осуществлять использованием множества эндо- и экзогликозидаз, как описано в статье Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350.

Последовательность полипептида ActRIIa можно регулировать, по необходимости, в зависимости от типа используемой экспрессирующей системы, поскольку клетки млекопитающих, дрожжей, насекомых и растений все могут вводить различающиеся типы гликозилирования, на которые может влиять аминокислотная последовательность пептида. Как правило, белки ActRIIa для использования у человека, экспрессируют в линии клеток млекопитающего, которая обеспечивает подходящее гликозилирование, такой как линии клеток HEK293 или CHO, хотя предполагают, что другие экспрессирующие линии клеток млекопитающих, линии клеток дрожжей с модифицированными ферментами гликозилирования и клетки насекомых также можно использовать.

Кроме того, описание относится к способу получения мутантов, в частности, наборов комбинаторных мутантов полипептида ActRIIa, а также усеченных мутантов; пулы комбинаторных мутантов являются особенно эффективны для идентификации функциональных вариантов последовательности. Целью скрининга таких комбинаторных библиотек может быть получение, например, вариантов полипептида ActRIIa, которые могут действовать либо как агонисты, либо как антагонист, или альтернативно, которые обладают всеми вместе новыми активностями. Множество анализов скрининга представлены ниже, и такие анализы можно использовать для оценки вариантов. Например, можно проводить скрининг вариантов полипептида ActRIIa по способности связывать лиганд ActRIIa для предотвращения связывания лиганда ActRIIa с полипептидом ActRIIa или чтобы помешать передаче сигнала, вызванной лигандом ActRIIa.

Активность полипептида ActRIIa или его вариантов также можно тестировать в анализе на основе клеток или в анализе *in vivo*. Например, можно оценить эффект варианта полипептида ActRIIa на экспрессию генов, вовлеченных в образование кости или разрушение кости. Можно по необходимости проводить в присутствии одного или нескольких белков - лигандов рекомбинантного ActRIIa (например, активина), и клетки можно трансфицировать для получения полипептида ActRIIa и/или его вариантов, и необязательно, лиганда ActRIIa. Подобным образом, полипептид ActRIIa можно вводить мышам или другому животному, и можно оценивать одно или несколько свойств кости, таких как плотность или объем. Можно оценивать также скорость заживления для переломов кости. Двухэнергетическая рентгеновская абсорбциометрия (DEXA) представляет собой хорошо разработанный, неинвазивный, количественный способ оценки плотности кости у животного. У человека системы центральной DEXA можно использовать для оценки плотности костей в позвоночнике и тазе. Они являются наилучшим прогностическим параметром общей плотности костей. Системы периферической DEXA можно использовать для оценки плотности костей в периферических костях, включая, например, кости кисти, запястья, голеностопа и ступни. Традиционные системы рентгеновского изображения, включая сканирования САТ, можно использовать для оценки роста костей и заживления переломов. Можно оценивать также механическую прочность кости.

Могут быть получены варианты комбинаторного происхождения, обладающие селективной или в целом увеличенной активностью по сравнению с природным полипептидом ActRIIa. Подобным образом, мутагенез может приводить к вариантам, обладающим временем полужизни внутри клетки, существенно отличающимся от соответствующего полипептида ActRIIa дикого типа. Например, измененному белку можно придавать либо большую стабильность, либо меньшую стабильность к протеолитической деградации или другим клеточным процессам, приводящим к разрушению или инактивации другим образом природного полипептида ActRIIa. Такие варианты и кодирующие их гены можно использовать для изменения уровней полипептида ActRIIa модуляцией времени полужизни полипептидов ActRIIa. Например, короткое время полужизни может приводить к более временным биологическим эффектам и может позволять более жесткий контроль уровней рекомбинантного полипептида ActRIIa у пациента. В слитом с Fc белке мутации можно вводить или в линкер (при его наличии), и/или в Fc часть для изменения времени полужизни белка.

Комбинаторная библиотека может быть получена посредством вырожденной библиотеки генов, кодирующих библиотеку полипептидов, каждый из которых включает по меньшей мере часть потенциальных последовательностей полипептида ActRIIa.

Например, смесь синтетических олигонуклеотидов можно ферментативно лигировать в последовательности генов, так что вырожденный набор нуклеотидных последовательностей потенциальных полипептидов ActRIIa можно экспрессировать в виде отдельных полипептидов, или альтернативно, в виде набора более крупных слитых белков (например, для фагового дисплея).

Существует много способов, которыми библиотека потенциальных гомологов может быть получена

из вырожденной олигонуклеотидной последовательности. Можно проводить химический синтез вырожденной последовательности гена на автоматическом синтезаторе ДНК, и затем синтетические гены лигировать в подходящий вектор для экспрессии. Синтез вырожденных олигонуклеотидов хорошо известен в данной области (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 способы применяли для 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 No: 5223409, 5198346 и 5096815).

Альтернативно, другие формы мутагенеза можно использовать для получения комбинаторной библиотеки. Например, варианты полипептида ActRIIa могут быть получены и выделены из библиотеки посредством скрининга с использованием, например, мутагенеза со сканированием аланином и т.п. (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), мутагенеза со сканированием 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); насыщающего мутагенеза (Meyers et al., (1986) *Science* 232:613); ПЦР-мутагенеза (Leung et al. (1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19); случайного мутагенеза, включая химический мутагенез и тому подобное (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). Мутагенез со сканированием линкером, в частности, при комбинаторных параметрах, представляет собой привлекательный способ для идентификации усеченных (биоактивных) форм полипептидов ActRIIa.

Широкий диапазон способов известен в данной области для скрининга продуктов генов из комбинаторных библиотек, полученных посредством точечных мутаций и усечений, и, в связи с этим, для скрининга библиотек кДНК по продуктам генов, обладающим конкретными свойствами. Такие способы можно будет в основном адаптировать для быстрого скрининга библиотек генов, полученных комбинаторным мутагенезом полипептидов ActRIIa. Наиболее широко используемые способы скрининга больших библиотек генов, как правило, включают клонирование библиотеки генов в реплицирующихся экспрессирующих векторах, трансформацию подходящих клеток полученной библиотекой векторов и экспрессию комбинаторных генов в условиях, при которых детекция желательной активности облегчает относительно простое выделение вектора, кодирующего ген, продукт которого детектировали. Предпочтительные анализы включают анализы связывания активина и анализы опосредованной активинном передачи сигнала клеток.

В конкретных вариантах осуществления полипептиды ActRIIa по изобретению могут дополнительно содержать посттрансляционные модификации в дополнение к любым, которые естественным образом присутствуют в полипептидах ActRIIa. Такие модификации включают в качестве неограничивающих примеров ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, присоединение липидов и ацилирование. В результате модифицированные полипептиды ActRIIa могут содержать не относящиеся к аминокислотам элементы, такие как полиэтиленгликоли, липиды, поли- или моносахариды и фосфаты. Эффекты таких не относящихся к аминокислотам элементов на функциональность полипептида ActRIIa можно тестировать, как описано в настоящем описании для других вариантов полипептида ActRIIa. Когда полипептид ActRIIa продуцируют в клетках посредством расщепления растущей формы полипептида ActRIIa, посттрансляционный процессинг также может быть важным для правильного сворачивания и/или функционирования белка. Различные клетки (такие как CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 или HEK293) обладают специфическими клеточными аппаратами и характерными механизмами для таких посттрансляционных видов активности, и их можно выбирать, чтобы убедиться в правильной модификации и процессинге полипептидов ActRIIa.

В конкретных аспектах функциональные варианты или модифицированные формы полипептидов ActRIIa включают слитые белки, обладающие по меньшей мере частью полипептидов ActRIIa и одним или несколькими слитыми доменами. Хорошо известные примеры таких слитых доменов включают в качестве неограничивающих примеров полигистидин, Glu-Glu, глутатион-S-трансферазу (GST), тиоредоксин, белок А, белок G, константную область тяжелой цепи иммуноглобулина (Fc), связывающий мальтозу белок (MBP) или человеческий сывороточный альбумин. Слитый домен может быть выбран так, чтобы придавать желательное свойство. Например, некоторые слитые домены являются особенно эффективными для выделения слитых белков аффинной хроматографией. Для цели аффинной очистки используют соответствующие матрицы для аффинной хроматографии, такие как конъюгированные с глутатионом, амилазой и никелем или кобальтом смолы. Многие из таких матриц доступны в форме "набора", такого как система очистки GST Pharmacia и система QIAexpress™ (Qiagen), используемые с партнерами для сливания (HIS₆). В качестве другого примера, слитый домен может быть выбран так, чтобы облегчать детекцию полипептидов ActRIIa. Примеры таких доменов для детекции включают различные

флуоресцентные белки (например, GFP), а также "эпитопы-метки", которые обычно представляют собой короткие пептидные последовательности, для которых доступно специфическое антитело. Хорошо известные эпитопы-метки, для которых легко доступны специфические моноклональные антитела, включают в себя метки FLAG, гемагглютинин (HA) вируса гриппа и с-тус. В некоторых случаях слитые домены имеют участок расщепления протеазой, такой как фактор Ха или тромбин, который позволяет соответствующей протеазе частично расщеплять слитые белки и таким образом высвобождать из них рекомбинантные белки. Затем высвобожденные белки можно отделять от слитого домена последующим хроматографическим разделением. В конкретных предпочтительных вариантах осуществления полипептид ActRIIa сливают с доменом, который стабилизирует полипептид ActRIIa *in vivo* ("стабилизирующий" домен). Под "стабилизацией" обозначают все, что увеличивает время полужизни в сыворотке, независимо от того, происходит ли это из-за уменьшения разрушения, уменьшения клиренса почками или другого фармакокинетического эффекта. Известно, что слияние с частью Fc иммуноглобулина сообщает желательные фармакокинетические свойства широкому диапазону белков. Подобным образом, слияние с сывороточным альбумином может придавать желательные свойства. Другие типы слитых доменов, которые могут быть выбраны, включают мультимеризующие (например, димеризующие, тетрамеризующие) домены и функциональные домены (придающие биологическую функцию, такую как стимуляция роста костей или роста мышц, как желательное).

В качестве конкретного примера настоящее изобретение относится к слитому белку, содержащему растворимый внеклеточный домен ActRIIa, слитый с доменом Fc (например, SEQ ID NO: 6).

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD (A) VSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVP IEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
PFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK *

Необязательно, домен Fc обладает одной или несколькими мутациями в таких остатках, как Asp-265, лизин 322 и Asn-434. В конкретных случаях, мутантный домен Fc, обладающий одной или несколькими из этих мутаций (например, мутацией Asp-265), обладает уменьшенной способностью связывания с рецептором Fcγ относительно домена Fc дикого типа. В других случаях мутантный домен Fc, обладающий одной или несколькими из этих мутаций (например, мутацией Asn-434), обладает увеличенной способностью связывания родственного MHC класса I Fc-рецептора (FcRN) по сравнению с доменом Fc дикого типа.

Понятно, что различные элементы слитых белков могут быть расположены любым образом, согласующимся с желательной функциональностью. Например, полипептид ActRIIa можно располагать на С-конце от гетерологичного домена, или, альтернативно, гетерологичный домен можно помещать на С-конце от полипептида ActRIIa. Домен полипептида ActRIIa и гетерологичный домен не обязательно являются соседними в слитом белке, и дополнительные домены или аминокислотные последовательности можно включать с С- или N-конца от любого домена или между доменами.

В конкретных вариантах осуществления полипептиды ActRIIa по настоящему изобретению содержат одну или несколько модификаций, способных стабилизировать полипептиды ActRIIa. Например, такие модификации увеличивают время полужизни полипептидов ActRIIa *in vitro*, увеличивают время полужизни в кровотоке полипептидов ActRIIa или уменьшают протеолитическую деградацию полипептидов ActRIIa. Такие стабилизирующие модификации включают, в качестве неограничивающих примеров, слитые белки (включая, например, слитые белки, содержащие полипептид ActRIIa и стабилизирующий домен), модификации участка гликозилирования (включая, например, добавление участка гликозилирования к полипептиду ActRIIa) и модификации углеводной группы (включая, например, удаление углеводных групп из полипептида ActRIIa). В случае слитых белков, полипептид ActRIIa сливают с стабилизирующим доменом, таким как молекула IgG (например, домен Fc). Как используется в настоящем описании, под термином "стабилизирующий домен" понимают не только слитый домен (например, Fc), как в случае слитых белков, но также понимают небелковые модификации, такие как углеводородная группа, или небелковый полимер, такой как полиэтиленгликоль.

В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение делает доступными выделенные и/или очищенные формы полипептидов ActRIIa, которые являются отделенными от других белков, или иным образом по существу свободными от них. Полипептиды ActRIIa, как правило, получают экспрессией с рекомбинантных нуклеиновых кислот.

3. Нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды ActRIIa

В конкретных аспектах изобретение относится к выделенным и/или рекомбинантным нуклеиновым кислотам, кодирующим любой полипептид ActRIIa (например, растворимых полипептидов ActRIIa), включая фрагменты, функциональные варианты и слитые белки, описанные в настоящем описании. Например, SEQ ID NO: 4 кодирует природный полипептид-предшественник ActRIIa человека, в то время как SEQ ID NO: 5 кодирует внеклеточный домен ActRIIa после процессинга. Рассматриваемые нуклеи-

новые кислоты могут являться одноцепочечными или двухцепочечными. Такие нуклеиновые кислоты могут представлять собой молекулы ДНК или РНК. Эти нуклеиновые кислоты можно использовать, например, в способах получения полипептидов ActRIIa или в качестве непосредственных лекарственных средств (например, в способе генотерапии).

В конкретных аспектах под рассматриваемыми нуклеиновыми кислотами, кодирующими полипептиды ActRIIa, дополнительно понимают как включающие нуклеиновые кислоты, являющиеся вариантами SEQ ID NO: 4 или 5. Варианты нуклеотидных последовательностей включают последовательности, отличающиеся одной или несколькими заменами, добавлениями или делениями нуклеотидов, такие как аллельные варианты.

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

В других вариантах осуществления нуклеиновые кислоты по изобретению включают в себя также нуклеотидные последовательности, которые гибридизуются в условиях высокой жесткости с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 4 или 5, последовательностью, комплементарной SEQ ID NO: 4 или 5, или их фрагментами. Как обсуждают выше, специалисту в данной области ясно понятно, что подходящие условия жесткости, способствующие гибридизации ДНК, можно изменять. Например, можно проводить гибридизацию в 6,0×хлориде натрия/цитрате натрия (SSC) при приблизительно 45°C, с последующей отмывкой 2,0×SSC при 50°C. Например, концентрация соли на стадии отмывки может быть выбрана от низкой жесткости приблизительно 2,0×SSC при 50°C до высокой жесткости приблизительно 0,2×SSC при 50°C. Кроме того, температуру на стадии отмывки можно увеличивать от условий низкой жесткости при комнатной температуре, приблизительно 22°C, до условий высокой жесткости при приблизительно 65°C. Как температуру, так и соль можно изменять, или температуру или концентрацию соли можно поддерживать постоянными, в то время как другую переменную изменяют. В одном из вариантов осуществления изобретение относится к нуклеиновым кислотам, гибридизующимся в условиях низкой жесткости при 6×SSC при комнатной температуре с последующей промывкой при 2×SSC при комнатной температуре.

Выделенные нуклеиновые кислоты, которые отличаются от нуклеиновых кислот с последовательностями SEQ ID NO: 4 или 5 в результате вырожденности генетического кода, также входят в объем изобретения. Например, ряд аминокислот определяется более чем одним триплетом. Кодоны, которые задают ту же аминокислоту, или синонимы (например, CAU и CAC являются синонимами для гистидина), могут приводить к "молчащим" мутациям, которые не влияют на аминокислотную последовательность белка. Однако предполагают, что полиморфизмы последовательности ДНК, которые действительно приводят к изменениям аминокислотных последовательностей рассматриваемых белков, будут существовать в клетках млекопитающих. Специалисту в данной области будет известно, что эти варианты одного или нескольких нуклеотидов (вплоть до приблизительно 3-5% нуклеотидов) нуклеиновых кислот, кодирующих конкретный белок, могут существовать у индивидуумов данного вида из-за естественной аллельной изменчивости. Все и любые такие варианты нуклеотидов и полученные полиморфизмы аминокислот входят в объем этого изобретения.

В конкретных вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты по изобретению могут являться функционально связанными с одной или несколькими регуляторными нуклеотидными последовательностями в экспрессирующей конструкции.

Регуляторные нуклеотидные последовательности, как правило, являются подходящими для клетки-хозяина, используемой для экспрессии. Многочисленные типы подходящих экспрессирующих векторов и подходящих регуляторных последовательностей известны в данной области для множества клеток-хозяев. Как правило, указанные одна или несколько регуляторных нуклеотидных последовательностей могут включать, в качестве неограничивающих примеров, промоторные последовательности, лидерные или сигнальные последовательности, участки связывания рибосомы, последовательности старта и терминирования транскрипции, последовательности старта и терминирования трансляции, и последовательности энхансера или активатора. Конститутивные или индуцибельные промоторы, как известно в данной области, относятся к изобретению. Промоторы могут представлять собой либо природные промоторы, либо гибридные промоторы, сочетающие элементы более одного промотора. Экспрессирующая конструкция может присутствовать в клетке на эписоме, такой как плаزمид, или экспрессирующую конструкцию можно вставлять в хромосому. В предпочтительном варианте осуществления экспрессирующий вектор содержит ген селективного маркера, чтобы обеспечить отбор трансформированных клеток-хозяев. Гены селективных маркеров хорошо известны в данной области и могут меняться с используемой клеткой-

хозяином.

В конкретных аспектах изобретения рассматриваемая нуклеиновая кислота представлена в экспрессирующем векторе, содержащем нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид ActRIIa и функционально связанную по меньшей мере с одной регуляторной последовательностью. Регуляторные последовательности известны в данной области, и их выбирают, чтобы управлять экспрессией полипептида ActRIIa.

Соответственно, термин регуляторная последовательность включает промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии. Примерные регуляторные последовательности описаны в Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Например, любую из широкого множества последовательностей для контроля экспрессии, которые контролируют экспрессию последовательности ДНК, когда функционально связаны с ней, можно использовать в этих векторах для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих полипептид ActRIIa. Такие используемые последовательности для контроля экспрессии включают, например, ранний и поздний промоторы SV40, промотор tet, немедленный ранний промотор аденовируса или цитомегаловируса, промоторы RSV, систему lac, систему trp, систему TAC или TRC, промотор T7, экспрессией с которого управляет T7 РНК-полимераза, главные области промотора и оператора фага лямбда, контрольные области для белка оболочки fd, промотор для 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, промоторы кислой фосфатазы, например, Pho5, промоторы факторов α -скреживания дрожжей, промотор многогранника бакуловирусной системы и другие последовательности, известные для контроля экспрессии генов прокариотических или эукариотических клеток или их вирусов, и различные их комбинации. Следует понимать, что конструирование экспрессирующего вектора может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, и/или типа белка, желательного для экспрессии. Более того, следует учитывать также число копий вектора, способность контролировать это число копий и экспрессию любых других белков, кодируемых вектором, таких как маркерные антибиотики.

Рекомбинантная нуклеиновая кислота по изобретению может быть получена лигированием клонированного гена или его части в вектор, подходящий для экспрессии либо в прокариотических клетках, либо в эукариотических клетках (дрожжей, птиц, насекомых или млекопитающих), либо и в тех, и в других. Экспрессирующие носители для получения рекомбинантного полипептида ActRIIa включают плазмиды и другие векторы. Например, подходящие векторы включают плазмиды типов: полученные из pBR322 плазмиды, полученные из pEMBL плазмиды, полученные из pEX плазмиды, полученные из pBTac плазмиды и полученные из pUC плазмиды для экспрессии в прокариотических клетках, таких как *E. coli*.

Некоторые экспрессирующие векторы для 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, полученные из pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo и pHyg, являются примерами экспрессирующих векторов для млекопитающих, подходящих для трансфекции эукариотических клеток. Некоторые из этих векторов модифицируют последовательностями из бактериальных плазмид, таких как pBR322, для облегчения репликации и отбора по устойчивости к лекарственным средствам как в прокариотических, так и в эукариотических клетках. Альтернативно, производные вирусов, таких как вирус бычьей папилломы (BPV-1), или вирус Эпштейна-Барр (pHEBo, полученный из pREP и p205), можно использовать для временной экспрессии белков в эукариотических клетках. Примеры других вирусных (включая ретровирусные) систем экспрессии можно обнаружить ниже в описании систем доставки для генотерапии. Различные способы, применяемые в получении плазмид и в трансформации организмов-хозяев, хорошо известны в данной области. Другие подходящие экспрессирующие системы как для прокариотических, так и для эукариотических клеток, а также общие рекомбинантные способы, см. в Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). В некоторых случаях желательно экспрессировать рекомбинантные полипептиды посредством использования бакуловирусной экспрессирующей системы. Примеры таких бакуловирусных экспрессирующих систем включают в себя полученные из pVL векторы (такие как pVL1392, pVL1393 и pVL941), полученные из pAcUW векторы (такие как pAcUW1) и полученные из pBlueBac векторы (такие как содержащий β -gal pBlueBac III).

В предпочтительном варианте осуществления конструируют вектор для получения рассматриваемых полипептидов ActRIIa в клетках CHO, такой как вектор Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif), векторы pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) и векторы pCI-neo (Promega, Madison, Wise). Как будет очевидно, рассматриваемые генные конструкции можно использовать, для индукции экспрессии рассматриваемых полипептидов ActRIIa в клетках, размножаемых в культуре, например, для получения белков, включая слитые белки или варианты белков, для очистки.

Изобретение также относится к клетке-хозяину, трансфицированной рекомбинантным геном, включая кодирующую последовательность (например, SEQ ID NO: 4 или 5) для одного или нескольких из рассматриваемых полипептидов ActRIIa. Клетка-хозяин может представлять собой любую прокариоти-

ческую или эукариотическую клетку. Например, полипептид ActRIIa по изобретению можно экспрессировать в бактериальных клетках, таких как *E. coli*, клетках насекомых (например, с использованием бакуловирусной экспрессирующей системы), дрожжах или клетках млекопитающих. Другие подходящие клетки-хозяева известны специалистам в данной области.

Соответственно, настоящее изобретение, кроме того относится к способам получения рассматриваемых полипептидов ActRIIa. Например, клетку-хозяина, трансфицированную экспрессирующим вектором, кодирующим полипептид ActRIIa, можно культивировать в соответствующих условиях, делающих возможной экспрессию полипептида ActRIIa. Полипептид ActRIIa можно секретировать и выделять из смеси клеток и среды, содержащей полипептид ActRIIa. Альтернативно, полипептид ActRIIa может оставаться в цитоплазматической или в мембранной фракции, а клетки собирают, лизируют и выделяют белок. Культура клеток включает клетки-хозяева, среду и другие побочные продукты. Подходящие среды для культивирования клеток хорошо известны в данной области. Рассматриваемые полипептиды ActRIIa можно выделять из среды для культивирования клеток, клеток-хозяев, или и того и другого, с использованием способов, известных в данной области для очистки белков, включая ионообменную хроматографию, гель-фильтрационную хроматографию, ультрафильтрацию, электрофорез, иммуноаффинную очистку с помощью антител, специфических для конкретных эпитопов полипептидов ActRIIa, и аффинную очистку с помощью средства, связывающего домен, слитый с полипептидом ActRIIa (например, колонку с белком А можно использовать для очистки слитого белка ActRIIa-Fc). В предпочтительном варианте осуществления полипептид ActRIIa представляет собой слитый белок, содержащий домен, облегчающий очистку. В предпочтительном варианте осуществления очистки достигают сериями стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующего, в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография на Q-сефарозе, хроматография на фенилсефарозе, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать фильтрацией вирусов и заменой буфера. Как показано в настоящем описании, белок ActRIIa-hFc очищали до чистоты >98%, как определяли эксклюзионной хроматографией, и >95%, как определяли посредством SDS PAGE. Этот уровень чистоты являлся достаточным для достижения желательных эффектов на кость у мышей и приемлемого профиля безопасности у мышей, крыс и не относящихся к человеку приматов.

В другом варианте осуществления слитый ген, кодирующий лидерную последовательность для очистки, такую как поли-(His)/последовательность участка расщепления энтерокиназой на N-конце желательной части рекомбинантного полипептида ActRIIa, может позволять очистку экспрессированного слитого белка аффинной хроматографией с использованием смолы с металлом Ni^{2+} . Лидерную последовательность для очистки можно затем удалять обработкой энтерокиназой для получения очищенного полипептида ActRIIa (например, см. Hochuli et al. (1987) *J. Chromatography* 411:177; и Janknecht et al., *PNAS USA* 88:8972).

Способы получения слитых генов хорошо известны. По существу, соединение различных фрагментов ДНК, кодирующих различные полипептидные последовательности, проводят согласно общепринятым способам, применяя тупые или выступающие концы для лигирования, расщепление ферментом рестрикции для получения подходящих концов, достраивание липких концов по необходимости, обработку щелочной фосфатазой для избегания нежелательного соединения и ферментативное лигирование. В другом варианте осуществления слитый ген можно синтезировать общепринятыми способами, включая использование автоматических синтезаторов ДНК. Альтернативно, можно проводить ПЦР-амплификацию фрагментов генов с использованием якорных праймеров, образующих комплементарные выступающие концы между двумя последовательными фрагментами гена, которые затем можно гибридизовать для получения последовательности химерного гена, (см., например, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

4. Альтернативные антагонисты активина и ActRIIa

Данные, представленные в настоящем описании, показывают, что антагонисты передачи сигнала активин-ActRIIa можно использовать для стимуляции роста кости и минерализации кости. Хотя растворимые полипептиды ActRIIa, и в частности, ActRIIa-Fc, являются предпочтительными антагонистами, и хотя такие антагонисты могут влиять на кость посредством механизма, отличного от антагонизма активина (например, ингибирование активина может быть показателем тенденции средства ингибировать активность спектра молекул, включая, возможно, другие члены суперсемейства TGF- β , и такое совместное ингибирование может приводить к желательному эффекту на кость), предполагают, что другие типы антагонистов активина-ActRIIa будут используемыми, включая антитела против активина (например, А, В, С или Е), антитела против ActRIIa, нуклеиновые кислоты: антисмысловые, РНКи или рибозимы, ингибирующие продукцию ActRIIa, и другие ингибиторы активина или ActRIIa, в частности те, которые нарушают связывание активина-ActRIIa.

Антитело, которое специфически реагирует с полипептидом ActRIIa (например, растворимым полипептидом ActRIIa), и которое либо конкурирует с лигандом за связывание с полипептидом ActRIIa, либо другим способом ингибирует опосредованную ActRIIa передачу сигнала, можно использовать в качестве антагониста активности полипептида ActRIIa. Подобным образом, антитело, которое специфически реагирует с полипептидом активина А и которое нарушает связывание ActRIIa, можно использо-

вать в качестве антагониста.

С использованием иммуногенов, полученных из полипептида ActRIIa или полипептида активина, антисыворотки или моноклональные антитела против белка/против пептида можно получить общепринятыми способами (см., например, *Antibodies: A Laboratory Manual* ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Млекопитающее, такое как мышь, хомяк или кролик, можно иммунизировать иммуногенной формой полипептида ActRIIa, антигенным фрагментом, способным вызывать ответ антитела, или слитым белком. Способы придания иммуногенности белку или пептиду включают в себя конъюгацию с носителями или другие способы, хорошо известные в данной области. Иммуногенную часть полипептида ActRIIa или активина можно вводить в присутствии адъюванта. Прогрессирование иммунизации можно мониторировать детекцией титров антитела в плазме или сыворотке. Общепринятый ELISA или другие иммуноанализы можно использовать с иммуногеном в качестве антигена для оценки уровней антител.

После иммунизации животного антигенным препаратом полипептида ActRIIa может быть получена антисыворотка и, если желательно, поликлональные антитела можно выделить из сыворотки. Для получения моноклональных антител продуцирующие антитело клетки (лимфоциты) можно собирать из иммунизированного животного и сливать общепринятыми способами слияния с иммортализованными клетками, такими как клетки миеломы, чтобы получить клетки гибридомы. Такие способы хорошо известны в данной области и включают в себя, например, способ гибридомы (исходно разработанный Kohler and Milstein, (1975) *Nature*, 256: 495-497), способ гибридомы В-клеток человека (Kozbar et al. (1983) *Immunology Today*, 4:72), и способ EBV-гибридомы для получения моноклональных антител человека (Cole et al. (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pp.77-96). Можно проводить иммунохимический скрининг клеток гибридомы для получения антител, специфически реагирующих с полипептидом ActRIIa, и выделять моноклональные антитела из культуры, содержащей такие клетки гибридомы.

Под термином "антитело", как используется в настоящем описании, понимают его фрагменты, которые также специфически реагируют с рассматриваемым полипептидом. Антитела можно фрагментировать с использованием общепринятых способов и проводить скрининг фрагментов по эффективности таким же образом, как описано выше для полноразмерных антител. Например, F(ab)₂-фрагменты могут быть получены обработкой антитела пепсином. Полученный F(ab)₂-фрагмент можно обработать для восстановления дисульфидных мостиков для получения Fab-фрагментов. Кроме того, антитело по настоящему изобретению включает биспецифические, одноцепочечные, химерные, гуманизированные и полностью человеческие молекулы, обладающие аффинностью для полипептида ActRIIa или активина, придаваемой по меньшей мере одной областью CDR антитела. Кроме того, антитело может содержать присоединенную к нему метку и обладать способностью к детекции (например, метка может представлять собой радиоактивный изотоп, флуоресцентное соединение, фермент или кофактор фермента).

В конкретных вариантах осуществления антитело представляет собой рекомбинантное антитело, причем термин охватывает любое антитело, частично полученное способами молекулярной биологии, включая CDR-привитые или химерные антитела, человеческие или другие антитела, собранные из отобранных из библиотеки доменов антитела, одноцепочечные антитела и однодоменные антитела (например, белки V_H человека или белки V_H верблюжьих). В конкретных вариантах осуществления антитело по изобретению представляет собой моноклональное антитело, и в конкретных вариантах осуществления изобретение делает доступными способы получения новых антител. Например, способ получения моноклонального антитела, которое специфически связывается с полипептидом ActRIIa или полипептидом активина, может включать в себя введение мыши количества иммуногенной композиции, содержащей антигенный полипептид, эффективного для стимуляции подающегося детекции иммунного ответа, получение продуцирующих антитело клеток (например, клеток из селезенки) из мыши и слияние продуцирующих антитело клеток с клетками миеломы для получения продуцирующих антитело гибридом, и тестирование продуцирующих антитело гибридом для идентификации гибридомы, продуцирующей моноклональное антитело, специфически связывающееся с антигеном. После получения гибридомы можно размножить в культуре клеток, необязательно, в условиях культивирования, где происходящие из гибридомы клетки продуцируют моноклональное антитело, специфически связывающееся с антигеном. Моноклональное антитело можно очищать из культуры клеток.

Определение "специфически реагирующий с", как используют по отношению к антителу, обозначает, как это в основном понимают в данной области, что антитело является достаточно селективным между интересующим антигеном (например, полипептидом ActRIIa) и другими антигенами, не представляющими интерес, чтобы антитело являлось используемым, как минимум, для детекции присутствия интересующего антигена в конкретном типе биологического образца. В конкретных способах, использующих антитело, таких как терапевтические применения, может быть желательна более высокая степень специфичности связывания. Моноклональные антитела, как правило, проявляют более сильную тенденцию (по сравнению с поликлональными антителами) к эффективной дискриминации между желательными антигенами и перекрестно реагирующими полипептидами. Одной из характеристик, влияющих на специфичность взаимодействия антитело:антиген, является аффинность антитела для антигена.

Хотя желаемой специфичности можно достигать в диапазоне различных аффинностей, предпочтительные в основном антитела будут обладать аффинностью (константой диссоциации) приблизительно 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} или менее. Принимая во внимание чрезвычайно тесное связывание между активинном и ActRIIa, предполагают, что нейтрализующее антитело против активина или ActRIIa будет, как правило, обладать константой диссоциации 10^{-10} или менее.

Кроме того, способы, используемые для скрининга антител, чтобы идентифицировать желательное антитело, могут влиять на свойства полученного антитела. Например, если антитело предназначено для использования для связывания антигена в растворе, может быть желательно протестировать связывание в растворе. Множество различных способов доступно для тестирования взаимодействия между антителами и антигенами для идентификации особенно желательных антител. Такие способы включают ELISA, анализы связывания поверхностным плазмонным резонансом (например, анализ связывания Biacore™, Biacore AB, Uppsala, Sweden), сэндвич-анализы (например, система парамагнитных бусин из IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), вестерн-блоттинг, анализы иммунопреципитации и иммуногистохимию.

Примеры категорий соединений нуклеиновой кислоты, которые являются антагонистами активина или ActRIIa, включают антисмысловые нуклеиновые кислоты, конструкции для РНКи и каталитические конструкции нуклеиновой кислоты. Соединение нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечным или двухцепочечным. Двухцепочечное соединение может также включать области выступания или некомплементарности, где одна или другая из нитей является одноцепочечной. Одноцепочечное соединение может включать области самокомплементарности, что означает, что соединение формирует структуру так называемой "шпильки" или "стебля-петли", с областью двухспиральной структуры. Соединение нуклеиновой кислоты может содержать нуклеотидную последовательность, комплементарную области, состоящей из не более 1000, не более 500, не более 250, не более 100 или не более 50, 35, 30, 25, 22, 20 или 18 нуклеотидов из последовательности нуклеиновой кислоты полноразмерного ActRIIa или последовательности нуклеиновой кислоты активина βA или активина βB . Область комплементарности будет предпочтительно составлять по меньшей мере 8 нуклеотидов, и необязательно по меньшей мере 10 или по меньшей мере 15 нуклеотидов, и необязательно, между 15 и 25 нуклеотидами. Область комплементарности может попадать внутрь интрона, кодирующей последовательности или не кодирующей последовательности намеченного транскрипта, например, части кодирующей последовательности. Как правило, соединение нуклеиновой кислоты будет обладать длиной от приблизительно 8 до приблизительно 500 нуклеотидов или пар оснований, и необязательно, длина будет составлять от приблизительно 14 до приблизительно 50 нуклеотидов. Нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК (в частности, для применения в качестве антисмысловой), РНК или гибрид РНК:ДНК. Любая одна цепь может включать смесь ДНК и РНК, а также модифицированные формы, которые нельзя легко классифицировать как ДНК или РНК. Подобным образом, двухцепочечное соединение может представлять собой ДНК:ДНК, ДНК:РНК или РНК:РНК, и любая одна цепь также может включать смесь ДНК и РНК, а также модифицированные формы, которые нельзя легко классифицировать как ДНК или РНК. Соединение нуклеиновой кислоты может включать любую из множества модификаций, включая одну из модификаций части остова (сахаро-фосфатной части природной нуклеиновой кислоты, включая межнуклеотидные связи) или основания (пуриновой или пиримидиновой части природной нуклеиновой кислоты). Соединение антисмысловой нуклеиновой кислоты будет предпочтительно обладать длиной от приблизительно 15 до приблизительно 30 нуклеотидов и часто будет содержать одну или несколько модификаций для улучшения таких характеристик как стабильность в сыворотке, в клетке или на месте, куда соединение, вероятно, будут доставлять, таком как желудок в случае перорально доставляемых соединений и легкое для вдыхаемых соединений. В случае конструкции для РНКи, цепь, комплементарная намеченному транскрипту, будет, как правило, представлять собой РНК или ее модификации. Другая цепь может представлять собой РНК, ДНК или любой другой вариант. Дуплексная часть двухцепочечной или одноцепочечной "шпильчатой" конструкции РНКи предпочтительно будет иметь длину 18-40 нуклеотидов и необязательно, приблизительно 21-23 нуклеотидов, пока она служит субстратом для Dicer. Каталитические или ферментативные нуклеиновые кислоты могут представлять собой рибозимы или ДНК-ферменты и могут также содержать модифицированные формы. Соединения нуклеиновых кислот могут ингибировать экспрессию мишени приблизительно на 50%, 75%, 90% или более при контакте с клетками в физиологических условиях и при концентрации, когда антисмысловой или смысловой контроль оказывает малый эффект или не оказывает эффекта. Предпочтительными концентрациями для тестирования эффекта соединений нуклеиновой кислоты являются 1, 5 и 10 микромолярные. Соединения нуклеиновой кислоты можно также тестировать по эффектам, например, на рост и минерализацию кости.

5. Анализы скрининга.

В конкретном аспекте настоящее изобретение относится к использованию полипептидов ActRIIa (например, растворимых полипептидов ActRIIa) и полипептидов активина для идентификации соединений (средств), которые являются агонистами или антагонистами пути передачи сигнала активина-ActRIIa. Соединения, идентифицированные посредством этого скрининга, можно тестировать для оценки

их способности модулировать рост или минерализацию кости *in vitro*. Необязательно, эти соединения можно дополнительно тестировать на моделях животных для оценки их способности модулировать рост тканей *in vivo*.

Существуют многочисленные способы скрининга лекарственных средств для модуляции роста тканей посредством нацеливания на полипептиды активина и ActRIIa. В конкретных вариантах осуществления высокопроизводительный скрининг соединений можно проводить для идентификации средств, которые мешают опосредованным активин или ActRIIa эффектам на кость. В конкретных вариантах осуществления анализ проводят для скрининга и идентификации соединений, которые специфически ингибируют или уменьшают связывание полипептида ActRIIa с активин. Альтернативно, анализ можно использовать для идентификации соединений, усиливающих связывание полипептида ActRIIa с активин. В следующем варианте осуществления соединения можно идентифицировать по их способности взаимодействовать с полипептидом активина или ActRIIa.

Множество форматов анализа будут подходящими и, в свете настоящего описания, те, которые не описаны в настоящем описании явно, тем не менее будут понятны специалисту в данной области. Как описано в настоящем описании, тестируемые соединения (средства) по изобретению могут быть получены любым комбинаторным химическим способом. Альтернативно, рассматриваемые соединения могут представлять собой встречающиеся в природе биомолекулы, синтезированные *in vivo* или *in vitro*. Соединения (средства), подлежащие тестированию по их способности действовать как модуляторы роста тканей, могут быть получены, например, посредством бактерий, дрожжей, растений или других организмов (например, природные продукты), получать химически (например, малые молекулы, включая пептидомиметики), или получать рекомбинантным образом. Тестируемые соединения, предусматриваемые по настоящему изобретению, включают в себя непептидные органические молекулы, пептиды, полипептиды, пептидомиметики, сахара, гормоны и молекулы нуклеиновой кислоты. В конкретном варианте осуществления тестируемое средство представляет собой малую органическую молекулу, обладающую молекулярной массой менее приблизительно 2000 дальтон.

Тестируемые соединения по изобретению могут быть получены как одиночные, отдельные объекты, или получать в библиотеках большей сложности, таких как полученные комбинаторной химией. Эти библиотеки могут содержать, например, спирты, алкилгалиты, амины, амиды, сложные эфиры, альдегиды, простые эфиры и другие классы органических соединений. Представление тестируемых соединений тестовой системе может происходить либо в выделенной форме, либо в виде смесей соединений, особенно на начальных стадиях скрининга. Необязательно, соединения могут являться, необязательно, дериватизированными с помощью других соединений и обладать дериватизирующими группами, облегчающими выделение соединений. Дериватизирующие группы включают в себя, в качестве неограничивающих примеров, биотин, флуоресцеин, дигоксигенин, зеленый флуоресцентный белок, изотопы, полигистидин, магнитные бусины, глутатион-S-трансферазу (GST), фотоактивируемые перекрестно-сшивающие средства или любые их сочетания.

Во многих программах скрининга лекарственных средств, в которых тестируют библиотеки соединений и природных экстрактов, являются желательными высокопроизводительные анализы, чтобы максимизировать число соединений, исследованных в данный период времени. Анализы, которые проводят в бесклеточных системах, таких, какие можно получить с помощью очищенных или полуочищенных белков, часто являются предпочтительными в качестве "первичных" скринингов, поскольку их можно получать, чтобы позволять быстрое развитие и относительно простую детекцию изменения в молекулярной мишени, опосредованного тестируемым соединением. Более того, эффекты клеточной токсичности или биодоступности тестируемого соединения, как правило, можно игнорировать в системе *in vitro*, вместо этого анализ в первую очередь сфокусирован на эффекте лекарственного средства на молекулярную мишень, что может проявляться в изменении аффинности связывания между полипептидом ActRIIa и активин.

Просто для иллюстрации, в примерном анализе скрининга по настоящему изобретению, интересующее соединение приводят в контакт с выделенным и очищенным полипептидом ActRIIa, который обычно способен связывать активин. Затем к смеси соединения и полипептида ActRIIa добавляют композицию, содержащую лиганд ActRIIa. Детекция и количественное определение комплексов ActRIIa/активин обеспечивает средства для определения эффективности соединения для ингибирования (или стимуляции) формирования комплекса между полипептидом ActRIIa и активин. Эффективность соединения можно оценивать получением кривых зависимости эффекта от дозы по данным, полученным с использованием различных концентраций тестируемого соединения. Более того, можно проводить также контрольный анализ для предоставления фона для сравнения. Например, в контрольном анализе выделенный и очищенный активин добавляют к композиции, содержащей полипептид ActRIIa, и формирование комплекса ActRIIa/активин количественно оценивают в отсутствие тестируемого соединения. Как правило, порядок, в котором можно смешивать реагенты, можно изменять, и их можно смешивать одновременно. Более того, вместо очищенных белков, клеточные экстракты и лизаты можно использовать для предоставления подходящей бесклеточной системы анализа.

Формирование комплекса между полипептидом ActRIIa и активин можно детектировать множе-

ством способов. Например, модуляцию формирования комплексов можно количественно оценивать с использованием, например, меченных поддающейся детекции меткой белков, таких как радиоактивно меченные (например, ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C или ^3H), флуоресцентно меченные (например, FITC), или ферментативно меченные полипептид ActRIIa или активин, посредством иммуноанализа или посредством хроматографической детекции.

В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к использованию флуоресцентных поляризационных анализов и анализов резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) для измерения, либо напрямую, либо опосредованно, степени взаимодействия между полипептидом ActRIIa и связывающим его белком. Кроме того, другие способы детекции, такие как основанные на оптических волноводах (публикация PCT WO 96/2 6432 и патент США No. 5677196), поверхностном плазмонном резонансе (SPR), сенсорах поверхностного заряда и сенсорах поверхностных сил, являются совместимыми со многими вариантами осуществления изобретения.

Более того, настоящее изобретение относится к использованию анализа взаимодействия с ловушкой, известного также как "двугибридный анализ", для идентификации средств, которые нарушают или стимулируют взаимодействие между полипептидом ActRIIa и связывающим его белком. См., например, патент США No. 5283317; Zervos et al. (1993) *Cell* 72:223-232; Madura et al. (1993) *J Biol Chem* 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) *Biotechniques* 14:920-924; и Iwabuchi et al. (1993) *Oncogene* 8:1693-1696). В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к использованию обратных двугибридных систем для идентификации соединений (например, малых молекул или пептидов), которые приводят к диссоциации взаимодействий между полипептидом ActRIIa и связывающим его белком. См., например, Vidal and Legrain, (1999) *Nucleic Acids Res* 27:919-29; Vidal and Legrain, (1999) *Trends Biotechnol* 17:374-81; и патенты США No. 5525490; 5955280; и 5965368.

В конкретных вариантах осуществления рассматриваемые соединения идентифицируют по их способности взаимодействовать с полипептидом ActRIIa или активина по изобретению.

Взаимодействие между соединением и полипептидом ActRIIa или активина может быть ковалентным или нековалентным. Например, такое взаимодействие можно идентифицировать на уровне белка с использованием биохимических способов *in vitro*, включая фотоперекрестное сшивание, связывание радиоактивно меченного лиганда, и аффинную хроматографию (Jakoby WB et al., 1974, *Methods in Enzymology* 46:1). В конкретных случаях можно проводить скрининг соединений в анализе на основе механизма, таком как анализ для детекции соединений, которые связываются с полипептидом активина или ActRIIa. Это может включать в себя событие связывания в твердой фазе или в жидкой фазе. Альтернативно, ген, кодирующий полипептид активина или ActRIIa, можно трансфицировать с репортерной системой (например, β -галактозидазой, люциферазой или зеленым флуоресцентным белком) в клетку и проводить скрининг против библиотеки, предпочтительно, посредством высокопроизводительного скрининга, или с отдельными членами библиотеки. Можно использовать анализы связывания на основе другого механизма, например, анализы связывания, детектирующие изменения в свободной энергии. Анализы связывания можно проводить с мишенью, фиксированной на лунке, бусине или чипе или захваченной иммобилизованным антителом, или разделенной капиллярным электрофорезом. Связанные соединения можно детектировать, обычно с использованием колориметрии или флуоресценции или поверхностного плазмонного резонанса.

В конкретных аспектах настоящее изобретение относится к способам и средствам для модуляции (стимуляции или ингибирования) формирования кости и увеличения костной массы. Таким образом, любое идентифицированное соединение можно тестировать в целых клетках или тканях, *in vitro* или *in vivo*, для подтверждения их способности модулировать рост или минерализацию кости. Различные способы, известные в данной области, можно использовать для этой цели.

Например, эффект полипептидов ActRIIa или активина, или тестируемых соединений на рост кости или хряща можно определять измерением индукции *Msx2* или дифференцировки клеток-остеопредшественников в остеобласты в анализах на основе клеток (см., например, Daluiski et al., *Nat Genet.* 2001, 27(1):84-8; Hino et al., *Front Biosci.* 2004, 9:1520-9). Другой пример анализов на основе клеток включает в себя анализ остеогенной активности рассматриваемых полипептидов ActRIIa или активина и тестируемых соединений в мезенхимальных клетках-предшественниках и остеобластах. Для иллюстрации, можно сконструировать рекомбинантные аденовирусы, экспрессирующие полипептид активина или ActRIIa, для инфекции плюрипотентных мезенхимальных клеток-предшественников C3H10T1/2, клеток-преosteобластов C2C12 и клеток-osteобластов TE-85. Затем остеогенную активность определяют измерением индукции щелочной фосфатазы, остеокальцина и минерализации матрикса (см., например, Cheng et al., *J bone Joint Surg Am.* 2003, 85-A(8): 1544-52).

Настоящее изобретение относится также к анализам *in vivo* для измерения роста кости или хряща. Например, в Namkung-Matthai et al., *Bone*, 28:80-86 (2001) описана модель остеопороза на крысах, на которой изучают репарацию кости во время раннего периода после перелома. В Kubo et al., *Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 68:197-202 (1999) описана также модель остеопороза на крысах, на которой изучают репарацию кости во время позднего периода после перелома. В Andersson et al., *J. Endocrinol.* 170:529-537 описана модель остеопороза на мышах, в которой мышей подвергают овариэк-

томии, что вызывает у мышей потерю значительного минерального содержания кости и минеральной плотности кости, где губчатая кость теряет приблизительно 50% минеральной плотности кости. Плотность кости можно увеличивать у мышей после овариэктомии введением таких факторов, как паратиреоидный гормон. В конкретных аспектах настоящего изобретения используют анализы заживления переломов, известные в данной области. Эти анализы включают в себя способы разлома, гистологический анализ и биомеханические анализы, описанные, например, в патенте США No. 6521750, содержание которого приведено полностью для описания экспериментальных способов с индукцией переломов и процесса репарации, а также для измерения их степени.

6. Примерные терапевтические применения.

В конкретных вариантах осуществления антагонисты активина-ActRIIa (например, полипептиды ActRIIa) по настоящему изобретению можно использовать для лечения или предотвращения заболевания или состояния, связанного с разрушением кости, например, из-за перелома, утраты или деминерализации. Как показано в настоящем описании, антагонисты активина-ActRIIa, и в частности, конструкции ActRIIa-Fc, являются эффективными для лечения или предотвращения связанной с раком потери костной массы. В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения или предотвращения повреждения кости индивидуума посредством введения индивидууму терапевтически эффективного количества антагониста активина-ActRIIa, в частности, полипептида ActRIIa. В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам стимуляции роста или минерализации кости у индивидуума посредством введения индивидууму терапевтически эффективного количества антагониста активина-ActRIIa, в частности, полипептида ActRIIa. Эти способы предпочтительно имеют целью терапевтические и профилактические обработки животных, и более предпочтительно, человека. В конкретных вариантах осуществления описание относится к использованию антагонистов активина-ActRIIa (в частности, растворимых полипептидов ActRIIa и нейтрализующих антител, нацеленных на активин или ActRIIa) для лечения нарушений, связанных с низкой плотностью кости или уменьшенной прочностью кости.

Как используется в настоящем описании, терапевтическое средство, которое "предотвращает" нарушение или состояние, относится к соединению, которое, в статистической выборке, уменьшает частоту возникновения нарушения или состояния в обработанной выборке по сравнению с необработанной контрольной выборкой, или задерживает начало, или уменьшает тяжесть одного или нескольких симптомов нарушения или состояния по сравнению с необработанной контрольной выборкой. Термин "обработка", как используется в настоящем описании, включает в себя профилактику указанного состояния, или облегчение или прекращение состояния после его развития. В любом случае, предотвращение или лечение можно различать по диагнозу, представленному врачом, и предполагаемому результату введения лекарственного средства.

Описание относится к способам индукции формирования кости и/или хряща, предотвращения потери костной массы, увеличения минерализации кости или предотвращения деминерализации кости. Например, рассматриваемые антагонисты активина-ActRIIa имеют применение для лечения остеопороза и заживления переломов кости и дефектов хряща у человека и других животных. Полипептиды ActRIIa или активина могут использоваться у пациентов с диагнозом субклиническая низкая плотность кости, в качестве защитной меры против развития остеопороза.

В одном конкретном варианте осуществления способы и композиции по настоящему изобретению могут найти применение в медицине для заживления переломов кости и дефектов хряща у человека и других животных. Рассматриваемые способы и композиции могут также иметь профилактическое применение для уменьшения закрытых, а также открытых переломов, а также для улучшенной фиксации искусственных суставов. Формирование кости *de novo*, индуцированное остеогенным средством, приводит к репарации врожденных, индуцированных травмой или онкологической резекцией черепно-лицевых дефектов, а также используется в косметической пластической хирургии. В конкретных случаях, рассматриваемые антагонисты активина-ActRIIa могут обеспечивать окружение для привлечения формирующих кость клеток, стимулировать рост формирующих кость клеток или индуцировать дифференцировку предшественников формирующих кость клеток. Антагонисты активина-ActRIIa по изобретению могут также использоваться для лечения остеопороза.

Способы и композиции по изобретению можно применять для состояний, характеризующихся или вызванных потерей костной массы, таких как остеопороз (включая вторичный остеопороз), гиперпаратиреоз, болезнь Кушинга, болезнь Педжета, тиреотоксикоз, хроническое диарейное состояние или малабсорбция, почечный канальцевый ацидоз или нервная анорексия.

Остеопороз может быть вызван различными факторами или связан с различными факторами. Женский пол, особенно после менопаузы, низкая масса тела и ведение сидячего образа жизни все представляют собой факторы риска для остеопороза (потери минеральной плотности кости, приводящее к риску перелома). Лица, обладающие одной из следующих характеристик, могут являться кандидатами на лечение антагонистом ActRIIa: женщина после менопаузы, не принимающая эстроген или другое гормональное лекарственное средство; лицо с собственным или переломом шейки бедра в наследственном анамнезе или курением в анамнезе; женщина после менопаузы, являющаяся высокой (выше 5 футов

7 дюймов (170 см)) или худой (менее 125 фунтов (57 кг)); мужчина с клиническими состояниями, связанными с потерей костной массы; лицо, использующее лекарственные средства, известные как вызывающие потерю костной массы, включая кортикостероиды, такие как Преднизон™, различные противосудорожные лекарственные средства, такие как Дилантин™ и конкретные барбитураты, или высокую дозу замещающих гормоны щитовидной железы лекарственных средств; лицо, страдающее диабетом 1 типа, заболеванием печени, заболеванием почек, или имеющее семейный анамнез остеопороза; лицо с высокой перестройкой кости (например, с избыточным коллагеном в образцах мочи); лицо с таким состоянием щитовидной железы, как гипертиреоз; лицо, пережившее перелом после только умеренной травмы; лицо с переломом позвонка или другими признаками остеопороза по данным рентгеновского анализа.

Как указано выше, остеопороз может также возникать как состояние, связанное с другим нарушением, или в результате использования конкретных лекарственных средств. Остеопороз, возникающий из-за лекарственных средств или другого медицинского состояния, известен как вторичный остеопороз. При состоянии, известном как болезнь Кушинга, избыточное количество кортизона, продуцируемое в организме, приводит к остеопорозу и переломам. Наиболее распространенными лекарственными средствами, связанными с вторичным остеопорозом, являются кортикостероиды, класс лекарственных средств, которые действуют подобно кортизону, гормону, естественно продуцируемому надпочечниками. Хотя адекватные уровни гормонов щитовидной железы (продуцируемых щитовидной железой) необходимы для развития скелета, избыток гормона щитовидной железы может уменьшать костную массу с течением времени. Антациды, содержащие алюминий, могут приводить к потере костной массы при введении в больших дозах людям с проблемами почек, в частности, подвергавшимся диализу. Другие лекарственные средства, которые могут вызывать вторичный остеопороз, включают в себя фенитоин (дилантин) и барбитураты, которые используют для предотвращения судорог; метотрексат (ревматрекс, иммунекс, фоллекс PFS), лекарственное средство против некоторых форм артрита, рака и иммунных нарушений; циклоспорин (сандиммун, неорал), лекарственное средство, используемое для лечения некоторых аутоиммунных заболеваний и для супрессии иммунной системы у пациентов с трансплантатами органов; агонисты гормона, высвобождающего лютеинизирующий гормон (люпрон, золадекс), используемые для лечения рака предстательной железы и эндометриоза; гепарин (кальципарин, ликваемин), противосвертывающее лекарственное средство; и холестирамин (квестран) и колестипол (колестид), используемые для лечения высокого уровня холестерина. Потеря костной массы в результате противораковой терапии широко известна и названа индуцированной противораковой терапией потерей костной массы (CTIBL). Метастазы в кости могут образовывать полости в кости, которые можно корректировать лечением антагонистами активина-ActRIIa.

В предпочтительном варианте осуществления антагонисты активина-ActRIIa, в частности, растворимый ActRIIa, описанный в настоящем описании, можно использовать для больных раком. Пациенты, страдающие определенными опухолями (например, опухолями предстательной железы, молочной железы, множественной миеломой или любой опухолью, вызывающей гиперпаратиреоз), подвержены высокому риску потери костной массы из-за индуцированной опухолью потери костной массы, а также из-за метастазов кости и лекарственных средств. Таких пациентов можно лечить антагонистами активина-ActRIIa даже в отсутствие признаков потери костной массы или метастазов в кости. Можно также проводить мониторинг пациентов по признакам потери костной массы или метастазов в кости и можно лечить антагонистами активина-ActRIIa в случае, если показатели позволяют предполагать увеличенный риск. Как правило, используют сканирование DEXA для оценки изменений в плотности кости, в то время как показатели перестройки кости можно использовать для оценки вероятности метастазов в кости. Можно проводить мониторинг сывороточных маркеров. Специфическая костная щелочная фосфатаза (BSAP) представляет собой фермент, присутствующий в остеобластах. Уровни BSAP в крови повышены у пациентов с метастазами в кости и другими состояниями, приводящими к увеличению перестройки кости. Пептиды остеокальцин и проколлаген также связаны с формированием кости и метастазами в кости. Увеличение уровня BSAP детектировали у пациентов с метастазами в кости, вызванными раком предстательной железы, и в меньшей степени, при метастазах кости из-за рака молочной железы. Уровни костного морфогенетического белка-7 (BMP-7) являются высокими при раке предстательной железы, который метастазирует в кость, но не при метастазах в кости из-за рака мочевого пузыря, кожи, печени или легкого. Карбоксиконцевой телопептид типа I (ICTP) представляет собой сшивку, обнаруженную в коллагене, которая формируется во время резорбции кости. Поскольку кость постоянно разрушается и переформируется, ICTP будут обнаруживать повсюду в организме. Однако в участке метастазов в кости уровень будет значительно выше, чем в области нормальной кости. Высокие уровни ICTP обнаружили в метастазах кости из-за рака предстательной железы, легкого и молочной железы. Другая сшивка коллагена, N-концевой телопептид типа I (NTx), продуцируется вместе с ICTP во время перестройки кости. Количество NTx увеличено в метастазах кости, вызванных многими различными типами рака, включая рак легкого, предстательной железы и молочной железы. Уровни NTx увеличиваются также при прогрессировании метастазирования в кости. Таким образом, этот маркер можно использовать как для де-

текции метастазов, так и для измерения степени заболевания. Другие маркеры резорбции включают в себя пиридинолин и дезоксипиридинолин. Любое увеличение уровня маркеров резорбции или маркеров метастазов в кости указывает на необходимость терапии антагонистом активина-ActRIIa для пациента.

Антагонисты активина-ActRIIa можно вводить совместно с другими фармацевтическими средствами. Совместное введение можно осуществлять введением одного совместного состава, одновременным введением или введением в разное время. Антагонисты активина-ActRIIa могут являться особенно эффективными при введении с другими активными по отношению к кости средствами. Пациент может получать преимущество от совместного введения антагониста активина-ActRIIa и введения пищевых добавок с кальцием, витамином D, доступных упражнений и/или, в некоторых случаях, другого лекарственного средства. Примеры других лекарственных средств включают бисфосфонаты (алендронат, ибандронат и ризедронат), кальцитонин, эстрогены, паратиреоидный гормон и ралоксифен. Бисфосфонаты (алендронат, ибандронат и ризедронат), кальцитонин, эстрогены и ралоксифен действуют на цикл перестройки кости, и их классифицируют как антирезорбтивные лекарственные средства. Перестройка кости состоит из двух отдельных стадий: резорбции кости и формирования кости. Антирезорбтивные лекарственные средства замедляют или останавливают часть резорбции кости из цикла перестройки кости, но не замедляют части формирования кости из цикла. В результате новое формирование продолжается с более высокой скоростью, чем резорбция кости, и плотность кости может увеличиваться с течением времени. Терапаратид, форма паратиреоидного гормона, увеличивает скорость формирования кости в цикле перестройки кости. Алендронат одобрен как для предотвращения (5 мг в сутки или 35 мг раз в неделю), так и для лечения (10 мг в сутки или 70 мг раз в неделю) остеопороза после менопаузы. Алендронат уменьшает потерю костной массы, увеличивает плотность кости и уменьшает риск переломов позвоночника, запястья и бедра. Алендронат одобрен также для лечения индуцированного глюкокортикоидом остеопороза у мужчин и женщин в результате длительного использования этих лекарственных средств (т.е., преднизона и кортизона) и для лечения остеопороза у мужчин. Алендронат плюс витамин D одобрен для лечения остеопороза у женщин после менопаузы (70 мг раз в неделю плюс витамин D), и для лечения для улучшения костной массы у мужчин с остеопорозом. Ибандронат одобрен для предотвращения и лечения остеопороза после менопаузы. При введении пилюли (150 мг) раз в месяц, ибандронат следует вводить в одни и те же сутки каждый месяц. Ибандронат уменьшает потерю костной массы, увеличивает плотность кости и уменьшает риск переломов позвоночника. Ризедронат одобрен для предотвращения и лечения остеопороза после менопаузы. При введении ежесуточно (доза 5 мг) или еженедельно (доза 35 мг или доза 35 мг с кальцием), ризедронат замедляет потерю костной массы, увеличивает плотность кости и уменьшает риск переломов позвоночника и не относящихся к позвоночнику переломов. Ризедронат одобрен также для использования у мужчин и женщин для предотвращения и/или лечения индуцированного глюкокортикоидами остеопороза в результате длительного использования этих лекарственных средств (т.е., преднизона или кортизона). Кальцитонин представляет собой природный гормон, вовлеченный в регуляцию кальция и метаболизм кости. У женщин через более 5 лет после менопаузы кальцитонин замедляет потерю костной массы, увеличивает плотность кости позвоночника и может облегчать боль, связанную с переломами кости. Кальцитонин уменьшает риск переломов позвоночника. Кальцитонин доступен в виде инъекции (50-100 МЕ ежесуточно) или назального спрея (200 МЕ ежесуточно). Эстрогенная терапия (ЕТ)/гормональная терапия (НТ) одобрена для предотвращения остеопороза. Показано, что ЕТ уменьшает потерю костной массы, увеличивает плотность кости как в позвоночнике, так и в бедре, и уменьшает риск переломов бедра и позвоночника у женщин после менопаузы. ЕТ чаще всего вводят в форме пилюли или чрескожного пластыря, доставляющих низкую дозу приблизительно 0,3 мг ежесуточно или стандартную дозу приблизительно 0,625 мг ежесуточно и она является эффективной даже при начале после возраста 70 лет. Когда эстроген вводят отдельно, он может увеличивать у женщин риск развития рака слизистой оболочки матки (рака эндометрия). Чтобы избежать этого риска, работники здравоохранения прописывают гормон прогестин в сочетании с эстрогеном (гормонозаместительная терапия или НТ) для женщин, имеющих интактную матку. ЕТ/НТ облегчает симптомы менопаузы, и показано, что она оказывает благоприятный эффект на здоровье кости. Побочные эффекты могут включать в себя вагинальное кровотечение, болезненность молочных желез, перепады настроения и заболевание желчного пузыря. Ралоксифен, 60 мг в сутки, одобрен для предотвращения и лечения остеопороза после менопаузы. Он принадлежит к классу лекарственных средств, называемых избирательными модуляторами рецепторов эстрогена (SERM), разработанных для обеспечения благоприятных эффектов эстрогенов без их потенциальных недостатков. Ралоксифен увеличивает костную массу и уменьшает риск переломов позвоночника. До сих пор не доступны данные, чтобы продемонстрировать, что ралоксифен может уменьшать риск переломов бедра и других не относящихся к позвоночнику переломов. Терапаратид, форма паратиреоидного гормона, одобрена для лечения остеопороза у женщин после менопаузы и у мужчин, подверженных высокому риску переломов. Это лекарственное средство стимулирует формирование новой кости и значительно увеличивает минеральную плотность кости. У женщин после менопаузы уменьшение переломов отмечено для позвоночника, бедра, стопы, ребер и запястья. У мужчин уменьшение переломов отмечено для позвоночника, однако существовало недостаточно данных для оценки уменьшения переломов в других участках. Терапаратид вводят самостоятельно в виде ежесуточ-

ной инъекции в течение вплоть до 24 месяцев.

7. Фармацевтические композиции.

В конкретных вариантах осуществления, антагонисты активина-ActRIIa (например, полипептиды ActRIIa) по настоящему изобретению составляют с фармацевтически приемлемым носителем. Например, полипептид ActRIIa можно вводить отдельно или в качестве компонента фармацевтического состава (терапевтической композиции). Рассматриваемые соединения можно составлять для введения любым удобным способом для применения в медицине или ветеринарии.

В конкретных вариантах осуществления терапевтический способ по изобретению включает введение композиции системно или местно в виде имплантата или устройства. При введении терапевтическая композиция для применения по этому изобретению представляет собой апиогенную физиологически приемлемую форму. Терапевтически применимые средства, отличные от антагонистов ActRIIa, которые можно, необязательно, включать в композицию, как описано выше, можно вводить одновременно или последовательно с рассматриваемыми соединениями (например, полипептидами ActRIIa) в способах по изобретению.

Как правило, антагонисты ActRIIa будут вводить парентерально, и в частности, внутривенно или подкожно. Фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, могут содержать один или несколько полипептидов ActRIIa в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями или стерильными порошками, которые можно разводить в стерильных подходящих для инъекции растворах или дисперсиях непосредственно перед использованием, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты, растворенные вещества, придающие составу изотоничность с кровью намеченного реципиента, или суспендирующие средства или загустители. Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно применять в фармацевтических композициях по изобретению, включают в себя воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.), и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и пригодные для инъекции органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Подходящую текучесть можно поддерживать, например, использованием покрывающих материалов, таких как лецитин, поддержанием необходимого размера частиц в случае дисперсий и использованием поверхностно-активных веществ.

Кроме того, композицию можно инкапсулировать или инъектировать в форме для доставки к намеченному участку ткани (например, кости). В конкретных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению могут включать матрикс, способный доставлять одно или несколько терапевтических соединений (например, полипептидов ActRIIa) к намеченному участку ткани (например, кости), предоставлять структуру для развития ткани и оптимально, способный резорбироваться в организме. Например, матрикс может обеспечивать медленное высвобождение полипептидов ActRIIa. Такие матриксы можно формировать из материалов, в настоящее время применяемых для других применений медицинской имплантации.

Выбор материала матрикса основан на биосовместимости, биоразлагаемости, механических свойствах, косметическом внешнем виде и свойствах поверхности. Конкретное применение рассматриваемых композиций будет определять подходящий состав. Потенциальные матриксы для композиций могут представлять собой биоразлагаемые и химически определенные сульфат кальция, трикальцийфосфат, гидроксиапатит, полимолочную кислоту и полиангидриды. Другие потенциальные материалы являются биоразлагаемыми и хорошо определенными биологически, такие как костный или дермальный коллаген. Дополнительные матриксы состоят из чистых белков или компонентов внеклеточного матрикса. Другие потенциальные матриксы являются не биоразлагаемыми и химически определенными, такими как спеченный гидроксиапатит, биостекло, алюминаты, или другие виды керамики. Матриксы могут состоять из сочетаний любых из вышеупомянутых типов материала, таких как полимолочная кислота и гидроксиапатит или коллаген и трикальцийфосфат. Биокерамику можно изменять по составу, такому как кальций-алюминат-фосфат, и перерабатывать для изменения размера пор, размера частиц, формы частиц и биоразлагаемости.

В конкретных вариантах осуществления способы по изобретению могут представлять собой введение пероральное, например, в форме капсул, облаток, пилюль, таблеток, пастилок (с использованием вкусовой основы, обычно сахарозы и гуммиарабика или трагакантовой камеди), 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 (с использованием инертной основы, такой как желатин и глицерин, или сахароза и гуммиарабик) и/или в виде жидкости для полоскания рта и т.п., где каждое содержит предопределенное количество средства в качестве активного ингредиента. Средство можно вводить также в виде болуса, электуария или пасты.

В твердых лекарственных формах для перорального введения (капсулах, таблетках, пилюлях, драже, порошках, гранулах и т.п.), одно или несколько терапевтических соединений по настоящему изобретению можно смешивать с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, такими как цитрат натрия или фосфат дикальция, и/или любым из следующего:

(1) наполнители или разбавители, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или

кремниевая кислота;

(2) связующие вещества, такие как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза, и/или гуммиарабик;

(3) смачивающие средства, такие как глицерин;

(4) дезинтегрирующие вещества, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный или маниоковый крахмал, альгиновая кислота, конкретные силикаты и карбонат натрия;

(5) замедляющие растворение средства, такие как парафин;

(6) ускорители всасывания, такие как соединения четвертичного аммония;

(7) увлажняющие вещества, такие как, например, цетиловый спирт и глицеринмоноостеарат;

(8) абсорбирующие вещества, такие как каолин и бентонитовая глина;

(9) смазывающие вещества, такие как, тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия, и их смеси; и

(10) окрашивающие средства.

В случае капсул, таблеток и пилюль, фармацевтические композиции могут также содержать забуферивающие средства. Твердые композиции подобного типа можно также применять в качестве наполнителей в мягких и твердых заполненных желатиновых капсулах с использованием таких наполнителей, как лактоза или молочные сахара, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и т.п.

Жидкие формы дозирования для перорального введения включают фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активному ингредиенту, жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, общепринятые в данной области, такие как вода или другие растворители, солюбилизующие средства и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное масла, масло проростков, оливковое, касторовое, и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбитана, и их смеси. Помимо инертных разбавителей, пероральные композиции могут также включать в себя адъюванты, такие как увлажняющие вещества, эмульгирующие и суспендирующие вещества, подсластители, вкусовые вещества, окрашивающие средства, ароматизаторы и консервирующие средства.

Суспензии, в дополнение к активным соединениям, могут содержать суспендирующие вещества, такие как этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтиленсорбит и сложные эфиры сорбитана, микрокристаллическая целлюлоза, метакрилат алюминия, бентонит, агар-агар и трагакантовая камедь, и их смеси.

Композиции по изобретению могут также содержать адъюванты, такие как консерванты, увлажняющие вещества, эмульгаторы и диспергирующие средства. Предупреждение действия микроорганизмов можно обеспечивать включением различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабена, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и т.п. Может также являться желательным включать изотонические средства, такие как сахара, хлорид натрия, и т.п., в композиции. Кроме того, замедленное всасывание пригодной для инъекции фармацевтической формы можно вызывать включением средств, задерживающих всасывание, таких как моноостеарат алюминия и желатин.

Понятно, что режим дозирования будет определять лечащий врач с учетом различных факторов, модифицирующих действие рассматриваемых соединений по изобретению (например, полипептидов ActRIIa). Различные факторы включают, в качестве неограничивающих примеров, количество массы кости, которое желательно сформировать, степень потери плотности кости, участок повреждения кости, состояние поврежденной кости, возраст, пол и диету пациента, тяжесть любого заболевания, которое может вносить вклад в потерю костной массы, время введения, и другие клинические факторы. Необязательно, доза может меняться с типом используемого для реконструирования матрикса и типами соединений в композиции. Добавление других известных факторов роста к конечной композиции также может влиять на дозу. Прогресс можно мониторировать периодической оценкой роста и/или репарации кости, например, рентгеновскими лучами (включая DEXA), гистоморфометрическими определениями и тетрациклиновым мечением.

Эксперименты на приматах и людях показали, что эффекты ActRIIa-Fc на кость поддаются детекции, когда соединение дозируют в интервалах и количествах, достаточных для достижения концентраций в сыворотке приблизительно 200 нг/мл, при возникновении половины от максимальных эффектов на анаболические биомаркеры кости при дозе 0,3 мг/кг или эквивалентной, в переводе на площадь под кривой. У человека, уровней в сыворотке 200 нг/мл можно достигать при однократной дозе 0,1 мг/кг или более, и уровней в сыворотке 1000 нг/мл можно достигать при однократной дозе 0,3 мг/кг или более. Наблюдаемое время полужизни молекулы в сыворотке составляет между приблизительно 25 и 35 сутками, по существу, дольше, чем для большинства слитых с Fc белков, и таким образом, можно достигать продолжительного эффективного уровня в сыворотке, например, дозированием приблизительно 0,05-0,5 мг/кг на основе дозирования раз в неделю или два раза в неделю, или можно использовать более высокие дозы с более длительными интервалами между дозами. Например, дозы 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 1, 2 или 3 мг/кг, или промежуточные значения, можно использовать на основе дозирования раз в месяц или раз в два ме-

сяца, и эффект на кость может быть достаточно стойким, чтобы дозирование являлось необходимым только один раз в каждые 3, 4, 5, 6, 9, 12 или более месяцев. Более длительные интервалы между дозами дополнительно поддержаны продолжительностью фармакодинамического эффекта, которая является более длительной, чем продолжительность присутствия лекарственного средства в сыворотке. PD эффекты наблюдали в течение по меньшей мере 120 суток у пациентов-людей.

В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к генотерапии для получения полипептидов ActRIIa *in vivo*. Терапевтического эффекта такой терапии будут достигать введением полинуклеотидных последовательностей ActRIIa в клетки или ткани, обладающие нарушениями, как перечислено выше. Доставки полинуклеотидных последовательностей ActRIIa можно достигать с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора, такого как химерный вирус, или коллоидной дисперсионной системы. Предпочтительным для терапевтической доставки полинуклеотидных последовательностей ActRIIa является использование нацеленных липосом.

Различные вирусные векторы, которые можно использовать для генотерапии, как объясняют в настоящем описании, включают в себя аденовирус, вирус герпеса, вирус осповакцины, или, предпочтительно, РНК-вирус, такой как ретровирус.

Предпочтительно, ретровирусный вектор представляет собой производное ретровируса мышей или птиц. Примеры ретровирусных векторов, в которые можно вставлять отдельный чужеродный ген, включают в себя в качестве неограничивающих примеров: вирус лейкоза мышей Молони (MoMuLV), вирус саркомы мышей Харви (HaMuSV), вирус опухоли молочной железы мышей (MuMTV) и вирус саркомы Рауса (RSV). Ряд дополнительных ретровирусных векторов могут включать несколько генов. Все эти векторы могут переносить или включать ген селективного маркера, так чтобы трансдуцированные клетки можно было идентифицировать и получать. Ретровирусные векторы можно сделать специфическими для мишени присоединением, например, сахара, гликолипида или белка. Предпочтительное нацеливание осуществляют с использованием антитела. Специалистам в данной области известно, что специфические полинуклеотидные последовательности можно вставлять в ретровирусный геном или присоединять к оболочке вируса, чтобы позволять специфическую для мишени доставку ретровирусного вектора, содержащего полинуклеотид ActRIIa. В предпочтительном варианте осуществления вектор нацелен на кость или хрящ.

Альтернативно, культуру клеток ткани можно непосредственно трансфицировать плазмидами, кодирующими структурные гены ретровирусов *gag*, *pol* и *env*, посредством общепринятой трансфекцией с фосфатом кальция. Затем эти клетки трансфицируют векторной плазмидой, содержащей интересующие гены. Полученные клетки высвобождают ретровирусный вектор в культуральную среду.

Другой системой для нацеленной доставки полинуклеотидов ActRIIa является коллоидная дисперсионная система. Коллоидные дисперсионные системы включают макромолекулярные комплексы, нанокapsулы, микросферы, бусины и системы на основе липидов, включая эмульсии типа масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Предпочтительной коллоидной системой по этому изобретению является липосома. Липосомы представляют собой везикулы с искусственной мембраной, которые используются в качестве носителей для доставки *in vitro* и *in vivo*. РНК, ДНК и интактные вирионы можно инкапсулировать внутри водного внутреннего пространства и доставлять в клетки в биологически активной форме (см., например, Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Способы эффективного переноса генов с использованием липосомного носителя известны в данной области, см., например, Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988. Состав липосомы обычно представляет собой сочетание фосфолипидов, обычно в сочетании со стероидами, особенно холестерином. Можно использовать также другие фосфолипиды или другие липиды. Физические характеристики липосом зависят от pH, ионной силы и присутствия двухвалентных катионов.

Примеры липидов, используемых при получении липосом, включают фосфатидильные соединения, такие как фосфатидилглицерин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, сфинголипиды, цереброзиды и ганглиозиды. Примерные фосфолипиды включают фосфатидилхолин яйца, дипальмитоилфосфатидилхолин и дистеароилфосфатидилхолин.

Возможно и известно в данной области также нацеливание липосомы на основе, например, специфичности для органа, специфичности для клетки и специфичности для органеллы.

Примеры

Изобретение, в настоящее время описанное в общем, будет более легко понятно со ссылкой на следующие примеры, которые включены только для целей иллюстрации конкретных вариантов осуществления и вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначены для ограничения изобретения.

Пример 1: Слитые белки ActRIIa-Fc.

Авторы настоящего изобретения сконструировали растворимый слитый белок ActRIIa, обладающий внеклеточным доменом ActRIIa человека, слитым с доменом Fc человека или мыши с минимальным линкером между ними. Конструкции обозначены как ActRIIa-hFc и ActRIIa-mFc, соответственно.

ActRIIa-hFc показан внизу, как выделено из линий клеток CHO (SEQ ID NO: 7):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDGDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
 CWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPK
 PPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
 VPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SPGK

Белки ActRIIa-hFc и ActRIIa-mFc экспрессировали в линиях клеток CHO. Рассматривали три различных лидерных последовательности:

- (i) Меллитина пчелы медоносной (HBML): MKFLVNVALLVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 8)
- (ii) Тканевого активатора плазминогена (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 9)
- (iii) Природный: MGAAAKLAFVFLISCSGA (SEQ ID NO: 10).

Выбранная форма содержит лидер TPA и обладает следующей непротесированной аминокислотной последовательностью:

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCY
 GDGDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEG
 NMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
 DTLNISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:13)

Этот полипептид кодирует следующая последовательность нуклеиновой кислоты:

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCT
 TCGTTTCGCCCCGGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTT
 TTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACTGGTGTGAACCGTGT
 ATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGG
 TTCCATTGAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACA
 GGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGA
 GGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTCCGGAGATGGAAGTCACACAG
 CCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGAACCTCACACAT
 GCCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC
 CCCAAAACCCAAAGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTG
 GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
 GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG
 CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGTCCCCATCGAGAAA
 ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC
 CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGCTGACCTGCCTGGTCAAA
 GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
 AACAACACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT
 ATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
 GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
 GTCTCCGGGTAAATGAGAATTC (SEQ ID NO:14)

Как ActRIIa-hFc, так и ActRIIa-mFc замечательно поддавались рекомбинантной экспрессии. Как показано на фигуре 1, белок очищали в виде отдельного, хорошо определенного пика белка. N-концевым секвенированием выявили отдельную последовательность - ILGRSTQE (SEQ ID NO: 11). Очистки можно достигать серий стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующего, в любом порядке: хроматография с белком А, хроматография на Q-сефарозе, хроматография на фенил-сефарозе, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершать

филтрацией вирусов и заменой буфера. Белок ActRIIa-hFc очищали до чистоты >98% как определяли эксклюзионной хроматографией, и >95%, как определяли посредством SDS PAGE.

ActRIIa-hFc и ActRIIa-mFc показали высокую аффинность к лигандам, в частности, активину А. GDF-11 или активин А ("ActA") иммобилизовали на чипе Bioscore CM5 с использованием общепринятого способа присоединения по аминогруппам. Белки ActRIIa-hFc и ActRIIa-mFc вводили в систему и измеряли связывание. ActRIIa-hFc связывался с активинном с константой диссоциации (K_D) 5×10^{-12} , и белок связывался с GDF11 с K_D $9,96 \times 10^{-9}$. См. фиг. 2. Поведение ActRIIa-mFc являлось сходным.

Анализ репортерного гена A-204 использовали для оценки эффектов белков ActRIIa-hFc на передачу сигнала посредством GDF-11 и активина А. Линия клеток: Рабдомиосаркома человека (полученная из мышцы). Репортерный вектор: pGL3(CAGA)12 (описанный в Dennler et al., 1998, EMBO 17: 3091-3100.) См. фиг. 3. Повтор CAGA12 присутствует в отвечающих на TGF-бета генах (ген PAI-1), так что этот вектор находит основное применение для факторов, передающих сигналы посредством Smad2 и 3.

Сутки 1: Распределяли клетки A-204 в 48-луночном планшете.

Сутки 2: Клетки A-204 трансфицировали 10 мкг pGL3(CAGA)12 или pGL3(CAGA)12 (10 мкг)+pRLCMV (1 мкг) и Fugene.

Сутки 3: Добавляли факторы (разведенные в среде+0,1% BSA). Ингибиторы необходимо предварительно инкубировать с факторами в течение 1 ч перед добавлением к клеткам. Через 6 ч клетки промывали PBS, и лизировали клетки.

За этим следовал анализ люциферазы. Как правило, в этом анализе в отсутствие каких-либо ингибиторов для активина А показывают приблизительно 10-кратную стимуляцию экспрессии репортерного гена и $ED_{50} \sim 2$ нг/мл. GDF-11: 16-кратную стимуляцию, ED_{50} : $\sim 1,5$ нг/мл. Для GDF-8 показали эффект, сходный с GDF-11.

Как показано на фиг. 4, ActRIIa-hFc и ActRIIa-mFc ингибируют опосредованную GDF-8 передачу сигналов в пикомолярных концентрациях. Как показано на фиг. 5, три различных препарата ActRIIa-hFc ингибировали передачу сигналов GDF-11 с IC_{50} приблизительно 200 пМ.

ActRIIa-hFc был очень стабильным при фармакокинетических исследованиях. Крысам вводили дозы 1 мг/кг, 3 мг/кг или 10 мг/кг белка ActRIIa-hFc, и уровни белка в плазме измеряли через 24, 48, 72, 144 и 168 ч. В отдельном исследовании крысам вводили дозы 1 мг/кг, 10 мг/кг или 30 мг/кг. У крыс ActRIIa-hFc обладал временем полужизни в сыворотке 11-14 суток и уровни лекарственного средства в кровотоке являлись довольно высокими через две недели (11 мкг/мл, 110 мкг/мл или 304 мкг/мл для исходных введений 1 мг/кг, 10 мг/кг или 30 мг/кг, соответственно.) У яванских макаков время полужизни в сыворотке составляло по существу более 14 суток, и уровни лекарственного средства в кровотоке составляли 25 мкг/мл, 304 мкг/мл или 1440 мкг/мл для исходных введений 1 мг/кг, 10 мг/кг или 30 мг/кг, соответственно. Предварительные результаты у человека позволяют предполагать, что время полужизни в сыворотке составляет между приблизительно 20 и 30 сутками.

Пример 2: ActRIIa-mFc стимулирует рост кости *in vivo*

Нормальным самкам мышей (BALB/c) вводили дозы ActRIIa-mFc на уровне 1 мг/кг/дозу, 3 мг/кг/дозу или 10 мг/кг/дозу, с введением доз дважды в неделю. Минеральную плотность кости и минеральное содержание кости определяли посредством DEXA, см. фиг. 6.

У самок мышей BALB/c сканированиями DEXA показали значительное увеличение (>20%) минеральной плотности и содержания кости в результате обработки ActRIIa-mFc. См. фиг. 7 и 8.

Таким образом, антагонизм ActRIIa вызывал увеличение плотности и содержания кости у нормальных самок мышей. В качестве следующего шага, тестировали эффект ActRIIa-mFc на кость на модели остеопороза у мышей.

Andersson et al. (2001) определили, что мыши после овариэктомии страдают значительной потерей костной массы (приблизительно 50% потери губчатой кости через шесть недель после операции), и что потерю костной массы у этих мышей можно корректировать лекарственными средствами-кандидатами, такими как паратиреоидный гормон.

Авторы настоящего изобретения использовали самок мышей C57BL6 после овариэктомии (OVX) или ложной операции в возрасте 4-5 недель. Через восемь недель после хирургической операции начинали обработку ActRIIa-mFc (10 мг/кг, дважды в неделю) или контрольную обработку (PBS). Плотность кости измеряли сканером СТ.

Как показано на фиг. 9, для мышей после овариэктомии без обработки показали значительную потерю плотности губчатой кости по сравнению с контролями после ложной операции через шесть недель. Обработка ActRIIa-mFc восстанавливала плотность кости до такого уровня, как у мышей после ложной операции. Через 6 и 12 недель обработки ActRIIa-mFc вызывал существенное увеличение губчатой кости у мышей OVX. См. фиг. 10. После 6 недель обработки плотность кости увеличивалась на 24% по сравнению с контролями после PBS. Через 12 недель увеличение составляло 27%.

У мышей после ложной операции ActRIIa-mFc также вызывал существенное увеличение губчатой кости. См. фиг. 11. Через 6 и 12 недель обработка приводила к 35% увеличению по сравнению с контролями.

В дополнительном наборе экспериментов мышей после овариэктомии (OVX) или после ложной операции, как описано выше, обрабатывали ActRIIa-mFc (10 мг/кг, дважды в неделю) или контролем (PBS) в течение двенадцати недель. Подобно результатам, описанным выше для ActRIIa-mFc, для мышей OVX после введения ActRIIa-mFc показали увеличение плотности губчатой кости на 15% настолько рано, как через четыре недели, и на 25% через 12 недель обработки (фиг. 12). Подобным образом, для мышей после ложной операции после введения ActRIIa-mFc показали увеличение плотности губчатой кости на 22% настолько рано, как через четыре недели, и на 32% через 12 недель обработки (фиг. 13).

Через двенадцать недель обработки ActRIIa-mFc, анализ всего организма и анализ DEXA бедренной кости *ex vivo* показал, что обработка индуцирует увеличение плотности кости у мышей как после овариэктомии, так и после ложной операции (фиг. 14A и 14B, соответственно). Эти результаты поддержаны также анализом pQCT *ex vivo* середины диафиза бедренной кости, который показал значительное увеличение как общей плотности кости, так и плотности трубчатой кости через двенадцать недель после обработки ActRIIa-mFc. Обработанные носителем мыши после овариэктомии показали плотности кости, сравнимые с плотностями у обработанных носителем мышей после ложной операции (фиг. 15). В дополнение к плотности кости, содержание костной ткани увеличивалось после обработки ActRIIa-mFc. Анализы pQCT *ex vivo* середины диафиза бедренной кости показали значительное увеличение как общего содержания кости, так и содержания трубчатой кости через двенадцать недель обработки ActRIIa-mFc, тогда как для обработанных контролем-носителем мышей как после овариэктомии, так и после ложной операции показали сравнимое содержание кости (фиг. 16). Анализ pQCT *ex vivo* середины диафиза бедренной кости также показал, что обработанные ActRIIa-mFc мыши не обладали изменениями периостальной окружности; однако обработка ActRIIa-mFc приводила к уменьшению эндостальной окружности, указывая на увеличение толщины кортикального слоя из-за роста внутренней поверхности бедренной кости (фиг. 17).

Механическим тестированием бедренной кости определили, что ActRIIa-mFc являлся способным увеличивать внешние характеристики кости (максимальную нагрузку, прочность и работу для разлома), которые вносят вклад в значительное увеличение внутренних свойств (предела прочности) костей. Для мышей после овариэктомии, обработанных ActRIIa-mFc, показали увеличение прочности кости до уровня выше, чем у контролей после ложной операции после обработки носителем, что указывает на полное обращение остеопорозного фенотипа (фиг. 18).

Эти данные показывают, что антагонист активина-ActRIIa может увеличивать плотность кости у нормальных самок мышей и, более того, корректировать дефекты плотности кости, содержания кости и в конечном счете, прочности кости, на модели остеопороза у мышей.

В дополнительных экспериментах мышей подвергали овариэктомии или ложной операции на 4 неделе, и начиная с 12 недель вводили либо плацебо, либо ActRIIa-mFc (2 раза/неделю, 10 мг/кг) (обозначены также как RAP-11 на фиг. 19-24), в течение дополнительного периода 12 недель. Оценивали ряд параметров кости. Как показано на фиг. 19, ActRIIa-mFc увеличивал соотношения объема губчатой кости позвоночника к общему объему (BV/TV) у мышей, после операции как OVX, так и SHAM. ActRIIa-mFc также улучшал губчатую архитектуру (фиг. 20), увеличивал толщину кортикального слоя (фиг. 21) и улучшал прочность кости (фиг. 22). Как показано на фиг. 23, ActRIIa-mFc оказывал желательные эффекты в диапазоне доз от 1 мг/кг до 10 мг/кг.

Гистоморфометрию кости проводили во временной точке 2 недели у мышей после ложной операции. Эти данные, представленные на фиг. 24, показывают, что ActRIIa-mFc оказывает двойной эффект, как ингибируя резорбцию кости, так и стимулируя рост кости. Таким образом, ActRIIa-mFc стимулирует рост кости (анаболический эффект) и ингибирует резорбцию кости (антикатаболический эффект). BV=объем кости; TV=общий объем ткани. BV/TV представляет собой меру процента объема кости, который является минерализованным. ES=эродированная поверхность; BS=поверхность кости. ES/BS является мерой эрозии кости, и уменьшение, вызванное RAP-011, показывает антирезорбтивный или антикатаболический эффект. Ms/Bs представляет собой соотношение минерализованной поверхности/поверхности кости, что является показателем роста кости или анаболического эффекта. Подобным образом, уровень аппозиции минералов (MAR) и скорость формирования кости на поверхность кости в сутки (BFR/BSd) указывают на рост кости. Измерения остеобластов (Nob/BPm) и остеокластов (Noc/BPm) проводили для исследования механизма действия.

Второй эксперимент по гистоморфометрии проводили на самках мышей C57BL/6 начиная с возраста двенадцать недель. Мышам дважды в неделю вводили внутрибрюшинно 10 мг/кг ActRIIa-mFc в течение двух недель, четырех недель, восьми недель или двенадцати недель.

Каждую группу умерщвляли через пять суток после последней дозы и отбирали кости для анализа. Мышей метили кальцином за девять суток и двое суток до эвтаназии. Как показано на фиг. 25, измерения показывают, что ActRIIa-mFc стимулирует рост и минерализацию кости и оказывает как анаболический, так и антикатаболический эффекты. Смотри, например, соотношение BV/TV, соотношение ES/BS и соотношение MS/BS. Анаболические эффекты, по-видимому, сохраняются на протяжении режима дозирования, тогда как антирезорбтивные эффекты, по-видимому, являются недолговечными у мышей.

Пример 3: ActRIIa-mFc облегчает или предотвращает повреждение кости на модели множественной

миеломы у мышей.

Пациенты с множественной миеломой обладают нарушением с потерей костной массы, характеризующимся увеличенной активностью остеокластов и уменьшенным формированием кости остеобластами. Модель миеломы на мышах 5T2MM основана на использовании опухолевых клеток (клеток 5T2MM) из типа спонтанной опухоли, которая развивается у старых мышей и вызывает у мышей эффекты, сходные с эффектами, наблюдаемыми у пациентов-людей со множественной миеломой. Смотри, например, Vanderkerken et al., *Methods Mol Med.* 2005; 113:191-205. Эффекты ActRIIa-mFc тестировали на этой модели.

Клетки 5T2MM, инъецированные мышам C57B1/KaLwRij, стимулировали увеличение поверхности остеокластов, образование остеолитических очагов и вызывали уменьшение площади кости. Заболевание кости являлось связанным с уменьшением числа остеобластов, поверхности остеобластов и с уменьшением минерализации.

Мышей, несущих клетки 5T2MM, обрабатывали ActRIIa-mFc (RAP-011) (10 мг/кг, i.p. дважды в неделю), или носителем, со времени инъекции 5T2MM, всего в течение 12 недель. Анализ микро-СТ проксимальной берцовой кости и поясничных позвонков показал уменьшение объема губчатого вещества кости на 39% и 21% ($p < 0,001$ и $p < 0,01$) и уменьшение числа трабекул на 37% и 15% ($p < 0,01$ и $p < 0,05$) у несущих 5T2MM мышей по сравнению с наивными мышами. RAP-011 полностью предотвращает индуцированные 5T2MM уменьшения объема губчатой ткани и числа трабекул как в берцовой кости ($p < 0,001$ и $p < 0,05$), так и в позвоночнике ($p < 0,01$ и $p < 0,05$) при сравнении с обработанными носителем мышами. Объем кости был на 19% выше для берцовой кости ($p = 168$) и на 12% выше для позвоночника ($p < 0,05$) у обработанных RAP-011 мышей по сравнению с наивными мышами. RAP-011 предупреждал развитие остеолитических очагов в кости ($p < 0,05$). Этот эффект проиллюстрирован на фиг. 26. В то время как предварительной оценкой данных не удалось идентифицировать значительные эффекты парапротеина в сыворотке (биомаркера опухолевых клеток множественной миеломы) или нагрузки миеломы в этом исследовании, дальнейший анализ показал, что уровень парапротеина в сыворотке являлся по существу пониженным у всех обработанных животных, кроме одного, и кроме того, что объем здорового костного мозга являлся по существу увеличенным, что указывает на уменьшение нагрузки опухолевых клеток миеломы.

Таким образом, ActRIIa-mFc можно использовать для уменьшения эффектов заболевания кости, возникающего из-за множественной миеломы, и для лечения собственно от опухолевых клеток.

Пример 4: Характеризация белка ActRIIa-hFc

Слитый белок ActRIIa-hFc экспрессировали в стабильно трансфицированных клетках CHO-DUKX B11 с вектора pAID4 (SV40 ori/энхансер, промотор CMV), с использованием лидерной последовательности тканевого плазминогена из SEQ ID NO: 9. Белок, очищенный, как описано выше в примере 1, обладает последовательностью SEQ ID NO: 7. Часть Fc представляет собой последовательность Fc IgG1 человека, как показано на SEQ ID NO: 7. Анализ сиаловой кислоты показал, что белок содержал, в среднем, между приблизительно 1,5 и 2,5 моль сиаловой кислоты на молекулу слитого белка ActRIIa-hFc.

Для этого очищенного белка показали существенно долгое время полужизни в сыворотке для всех тестируемых животных, включая время полужизни 25-32 суток для пациентов-людей (см. пример 5, ниже). Кроме того, экспрессированный в клетках CHO материал обладал более высокой аффинностью для лиганда активина В, чем опубликовано для слитого белка ActRIIa-hFc, экспрессированного в клетках 293 человека (del Re et al., *J Biol Chem.* 2004 Dec 17; 279 (51):53126-35.) Кроме того, использование лидерной последовательности tPa обеспечивало более высокую продукцию, чем другие лидерные последовательности, и, в отличие от ActRIIa-Fc, экспрессированного с природным лидером, обеспечивало высоко чистую N-концевую последовательность. Применение природной лидерной последовательности приводило к двум главным видам ActRIIa-Fc, где каждый обладал различной N-концевой последовательностью.

Пример 5: Клинические испытания на людях.

Белок, описанный в примере 4, вводили пациентам-людям в рандомизированном двойном слепом контролируемом плацебо исследовании, которое проводили для оценки, в первую очередь, безопасности белка для здоровых женщин после менопаузы. Сорок восемь индивидов случайным образом распределяли в когорты по 6 для введения либо однократной дозы ActRIIa-hFc, либо плацебо (5 активное вещество: 1 плацебо). Уровни дозы лежали в диапазоне от 0,01 до 3,0 мг/кг внутривенно (IV) и от 0,03 до 0,1 мг/кг подкожно (SC). Всех индивидов наблюдали в течение 120 суток. Индивидов исключали из участия в исследовании, если они принимали лекарственные средства, влияющие на метаболизм кости, в пределах 6 месяцев от начала исследования. Проводили исследования безопасности, наблюдая каждую когорту для определения увеличения дозы. В дополнение к фармакокинетическим (ПК) анализам, оценивали также биологическую активность ActRIIa-hFc измерением биохимических маркеров формирования и резорбции кости, и уровней FSH.

В этом исследовании не опубликовано тяжелых неблагоприятных событий. Неблагоприятные события (AE) в основном являлись умеренными и временными. Предварительный анализ AE включал в себя головную боль, повышенные лабораторные показатели, симптомы простуды, рвоты или тошноты, внутривенную инфильтрацию и гематому в участке инъекции.

Анализ PK ActRIIa-hFc показал линейный профиль для дозы, и среднее время полужизни приблизительно 25-32 суток. Площадь под кривой (AUC) для ActRIIa-hFc линейно зависела от дозы, и поглощение после SC дозирования являлось по существу полным (см. фиг. 27 и 28). Эти данные показывают, что SC является желательным способом для дозирования, поскольку он обеспечивает эквивалентную биодоступность и время полужизни в сыворотке для лекарственного средства, в то же время избегая всплеска концентраций лекарственного средства в сыворотке, связанного с первыми несколькими сутками IV дозирования (см. фиг. 28). ActRIIa-hFc вызывал быстрое, продолжительное зависимое от дозы увеличение уровней в сыворотке специфической костной щелочной фосфатазы (BAP), которая является маркером анаболического роста кости, и зависимое от дозы уменьшение уровней С-концевого телопептида коллагена 1 типа и устойчивой к тартрату кислой фосфатазы 5b, которые являются маркерами резорбции кости. Для других маркеров, таких как P1NP, показали неопределенные результаты. Для уровней BAP показали почти насыщающие эффекты при наиболее высокой дозе лекарственного средства, показывая, что половины максимальных эффектов на эти анаболические биомаркеры кости можно достигать при дозе 0,3 мг/кг, с увеличением в диапазоне вплоть до 3 мг/кг. Рассчитанная как отношение фармакодинамического эффекта к AUC для лекарственного средства, EC_{50} составляет 51,465 (сутки·нг/мл). См. фиг. 29. Изменения уровня этих биомаркеров кости сохранялись в течение приблизительно 120 суток при наиболее высоких тестируемых уровнях дозы. Присутствовало также зависимое от дозы уменьшение уровней FSH в сыворотке, согласующееся с ингибированием активина.

Однократная доза ActRIIa-hFc, вводимая здоровым женщинам после менопаузы, являлась безопасной и хорошо переносимой в диапазоне тестируемых уровней дозы. Продолжительные PK и фармакодинамические эффекты позволяют предполагать, что прерывистое дозирование будет подходящим для будущих исследований. Например, дозирование на основании времени полужизни в сыворотке можно проводить на основании дозирования раз в месяц, или по порядку раз в каждые две, три, четыре, пять или шесть недель. Кроме того, поскольку фармакодинамический эффект продолжается далеко за пределами пребывания лекарственного средства в сыворотке, дозирование можно проводить на основании фармакодинамического эффекта, подразумевая, что дозирование каждые три месяца или каждые два, три, четыре, пять, шесть или даже двенадцать месяцев может быть эффективным для получения желательного эффекта у пациентов. Это клиническое испытание показывает, что для человека ActRIIa-hFc является остеонаболическим средством с биологическим доказательством как увеличения формирования кости, так и уменьшения резорбции кости.

Пример 6: Совместное введение ActRIIa-mFc и бисфосфоната

Бисфосфонаты представляют собой класс лекарственных средств, которые широко используют для лечения нарушений, связанных с низкой минеральной плотностью кости, включая остеопороз и связанную с раком потерю костной массы. Бисфосфонаты обладают сильной антирезорбтивной активностью, ингибируя остеокласты. Возможно, поскольку остеокласты необходимы как для разрушения кости, так и для роста кости, бисфосфонаты, по-видимому, уменьшают эффекты паратиреоидного гормона (PTH), одного из единственно известных средств для анаболического роста кости (Black et al., *N Engl J Med.* 2003 Sep 25;349 (13):1207-15; Samadfam et al., *Endocrinology.* 2007 Jun; 148 (6):2778-87)

Для тестирования эффективности лечения ActRIIa-Fc у пациентов, которым ранее вводили или одновременно вводили бисфосфонат или другое антирезорбтивное лекарственное средство, мышей тестировали с помощью комбинированных ActRIIa-mFc и золедроната, бисфосфонатного соединения. Мышей C57BL/6N в возрасте 12 недель обрабатывали следующим образом:

Группа 1 PBS

Группа 2 ActRIIa-mFc (RAP-011) (10 мг/кг) дважды в неделю (с группами 3 и 4)

Группа 3 Золедроновая кислота (ZOL), однократная доза (20 мг/кг)

Группа 4 ZOL (1 доза), 3 суток после ActRIIa-mFc (RAP-011) (1 мг/кг) дважды в неделю

Группа 5 ZOL (1 доза), 3 суток после ActRIIa-mFc (RAP-011) (10 мг/кг) дважды в неделю

Общую BMD определяли сканированием DEXA (PIXI) перед дозированием и на 3 и 8 неделе обработки.

Как показано на фиг. 30, общая BMD значительно увеличивалась во всех группах обработки, причем с комбинацией ZOL и ActRIIa-mFc получали самые большие эффекты. Эти результаты показывают, что белки ActRIIa-Fc можно использовать для увеличения плотности кости, даже у пациентов, получающих терапию бисфосфонатом.

Пример 7: ActRIIa-Fc облегчает или предотвращает потерю костной массы, вызванную метастазированием рака молочной железы

Предполагают, что 65-75 процентов рака молочной железы метастазирует в кость, вызывая существенное повреждение структуры кости, увеличение риска переломов и вызывая боль и другие побочные эффекты. Авторы настоящего изобретения тестировали эффекты ActRIIa-Fc на модели на мышах рака молочной железы, метастазирующего в кость.

Сублинию линии клеток рака молочной железы человека MDA-MB-231 (клон 2287) культивировали *in vitro*, и клетки собирали при плотности 5×10^6 клеток/мл. MDA-MB-231 представляет собой линию

клеток, которые являются высоко компетентными для засева в кость и вызывают повреждение кости, сходное с повреждением, вызванным метастазами в кости. 10 мл клеток инъецировали в большую берцовую кость бестимусной мыши nude в возрасте 6 недель на сутки исследования 0. На сутки исследования 10 мышам вводили ActRIIa-mFc (10 мг/кг/ дважды в неделю/ подкожно) (n=8) или носитель - PBS (n=7). Прогрессирование заболевания оценивали двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрией (PIXI-Mus) с недельными интервалами. Мышей обрабатывали ActRIIa-mFc в течение 4 недель и затем умерщвляли, и большие берцовые кости (как после инъекции опухоли, так и без опухоли) собирали от каждого животного. Затем большие берцовые кости обрабатывали и подготавливали для микро-СТ и гистологического анализа.

Инъекция клеток MDA-MB-231 в большую берцовую кость бестимусной мыши nude стимулировала развитие остеолитических очагов в большой берцовой кости после инъекции по сравнению с контралатеральной ногой. Анализ микро-СТ проксимальной большой берцовой кости показал уменьшение на 62% объема губчатой ткани кости в несущих MDA-MB-231 больших берцовых костях по сравнению с большой берцовой костью без опухоли у мышей после обработки носителем - PBS. Обработка ActRIIa-mFc приводила к увеличению на 70% или 147% в наивной или несущей опухоль большой берцовой кости, соответственно, по сравнению с носителем ($P < 0,01$ для обеих). Несущие опухоль большие берцовые кости обработанных ActRIIa-mFc мышей обладали плотностью губчатой ткани кости, сходной с наивными большими берцовыми костями обработанных VEH мышей ($p = 0,39$).

Таким образом, ActRIIa-mFc является способным устранять повреждение кости, связанное с присутствием опухолевых клеток молочной железы в кости.

Пример 8: Альтернативные белки ActRIIa-Fc

Альтернативная конструкция может обладать делецией С-концевого хвоста (последних 15 аминокислот внеклеточного домена ActRIIa). Последовательность для такой конструкции представлена ниже (часть Fc подчеркнута)(SEQ ID NO: 12):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
 CWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP^{EMTGGGTHTCPPCPA}
^{PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK}
^{TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVIIEKTISKAKGQPRE}
^{PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG}
^{SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK}

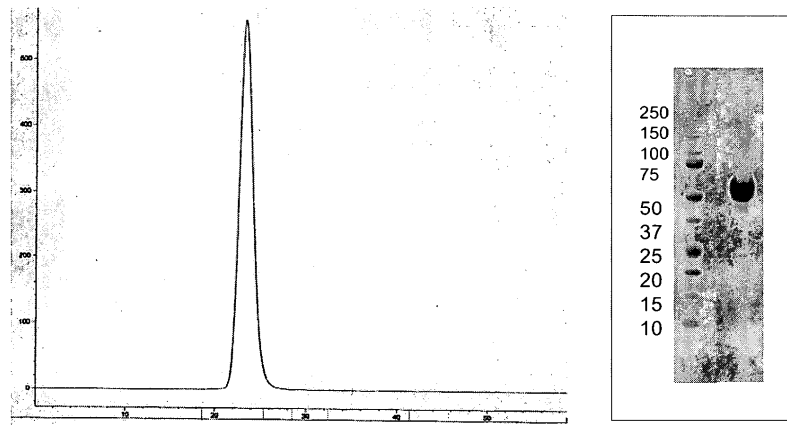
Включение в качестве ссылки.

Полное содержание всех публикаций и патентов, упомянутых в настоящем описании, таким образом, приведено в качестве ссылки, как если бы было конкретно и отдельно указано, что каждая отдельная публикация или патент приведены в качестве ссылки.

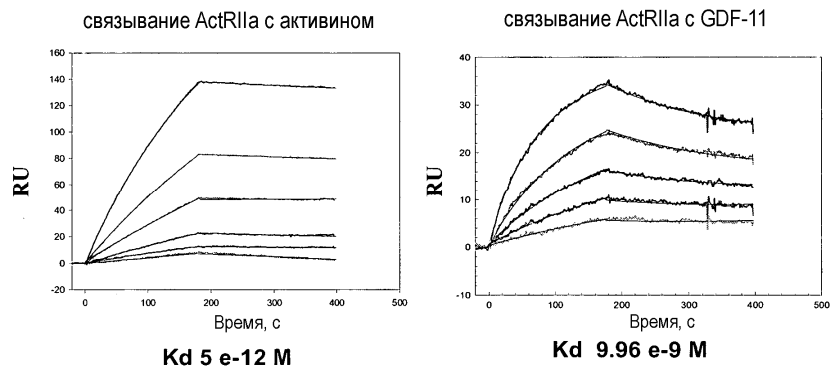
В то время как обсуждали конкретные варианты осуществления объекта, приведенное выше описание является иллюстративным, а не ограничивающим. Множество вариантов будут очевидными для специалистов в данной области после обзора этого описания и следующей ниже формулы изобретения. Полный объем изобретения следует определять исходя из пунктов формулы изобретения, вместе с полным объемом эквивалентов в них, и из описания, вместе с такими вариантами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

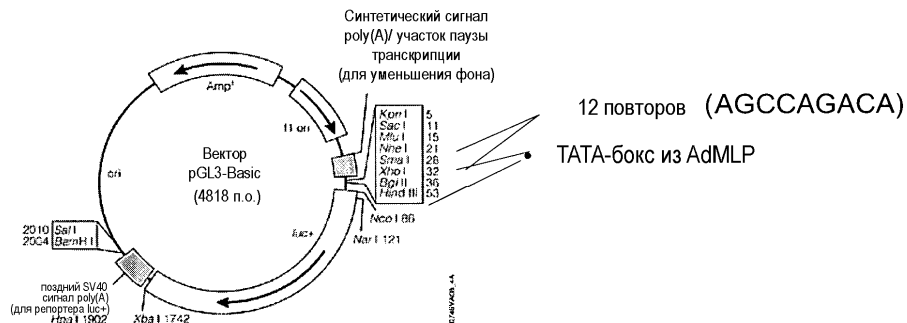
Слитый белок ActRIIa-Fc, который представляет собой димер, сформированный из двух полипептидов, каждый из которых содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, при этом слитый белок ActRIIa-Fc содержит три или более группы сиаловой кислоты и подходит для стимуляции роста костей и ингибирования резорбции костей у пациента.



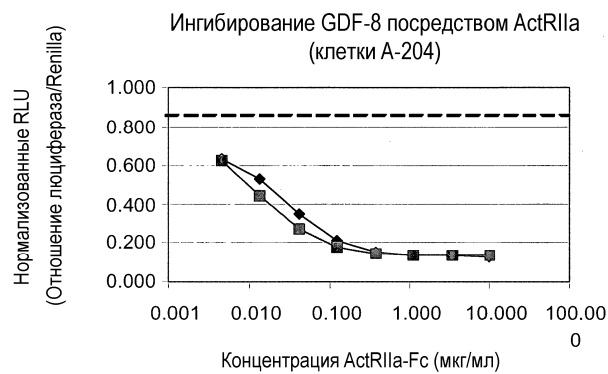
Фиг. 1



Фиг. 2

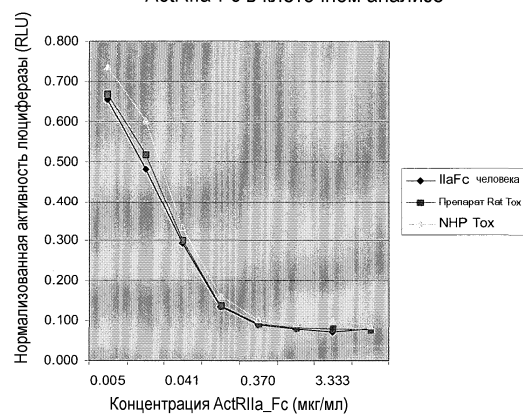


Фиг. 3

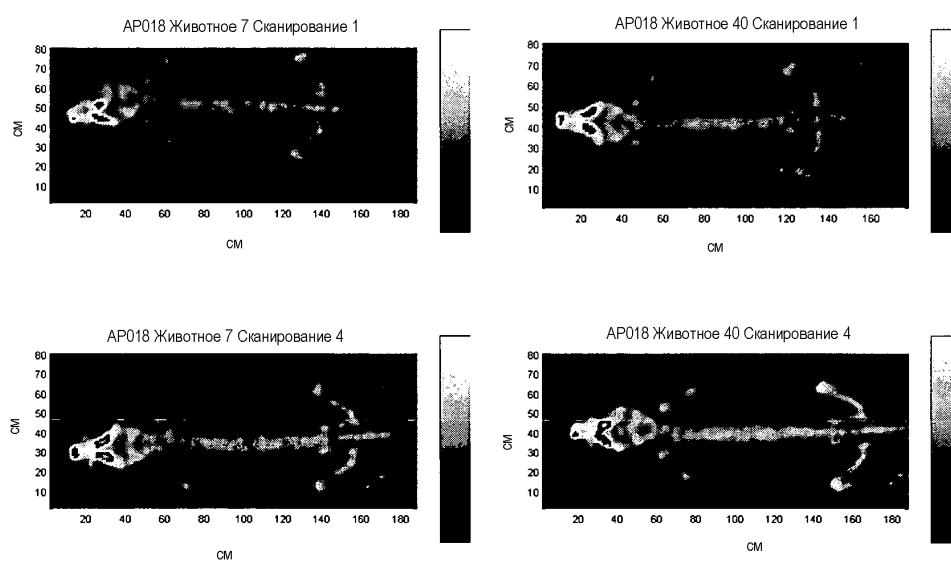


Фиг. 4

ActRlla-Fc в клеточном анализе

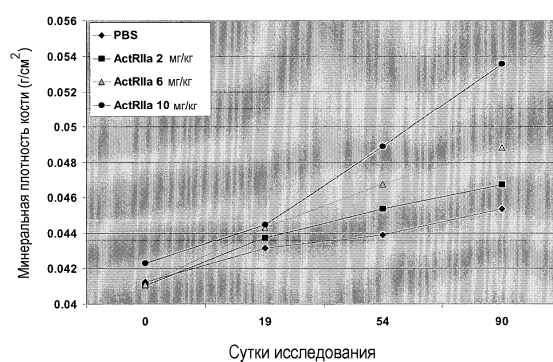


Фиг. 5



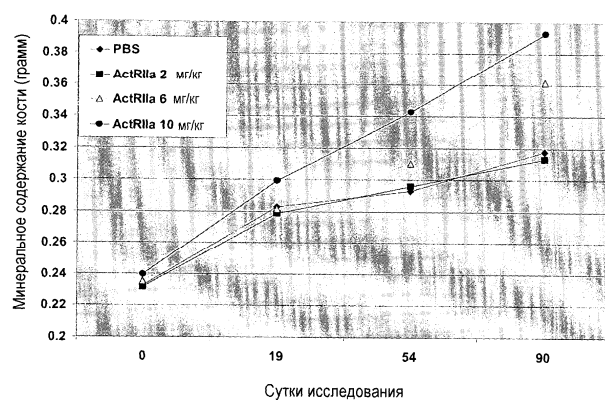
Фиг. 6

Минеральная плотность кости (самки BALB/c)

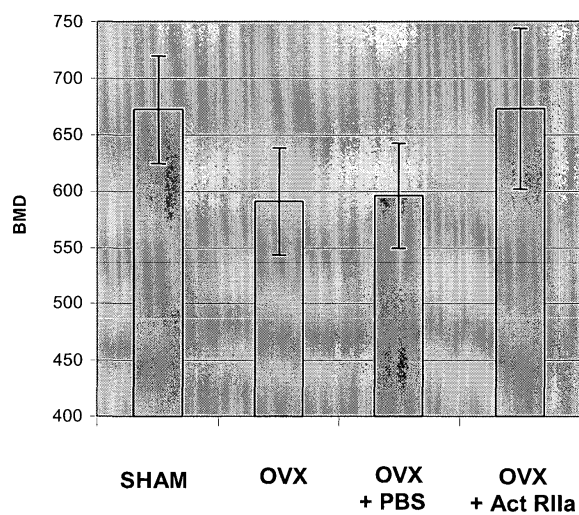


Фиг. 7

Минеральное содержание кости (самки BALB/c)

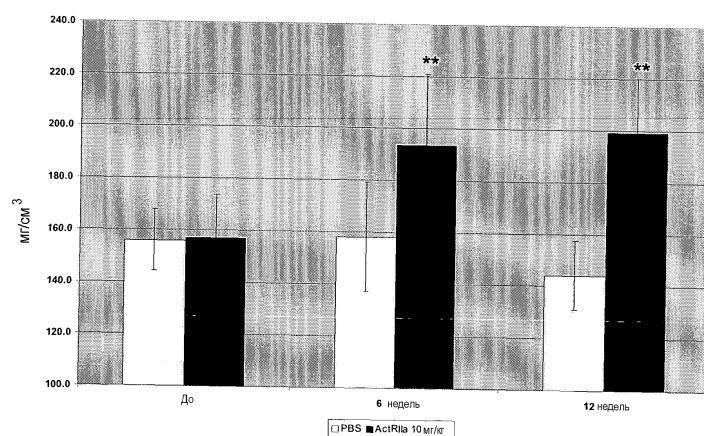


Фиг. 8



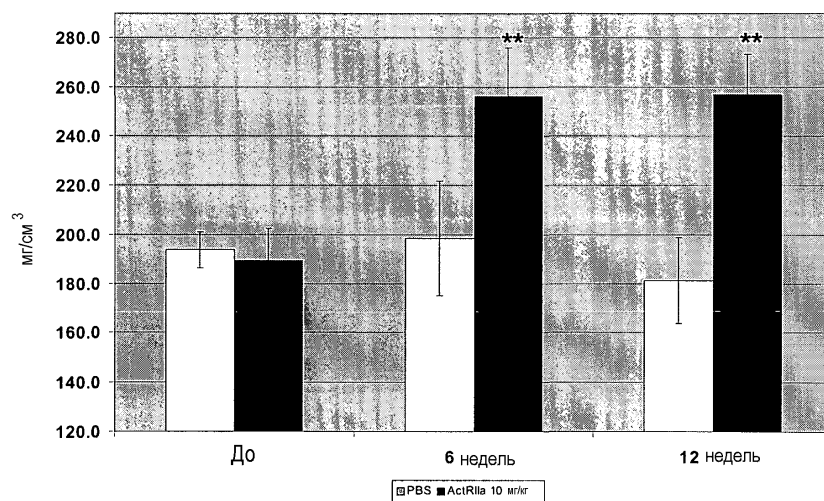
Фиг. 9

Губчатая кость (C57BL6 после овариэктомии)



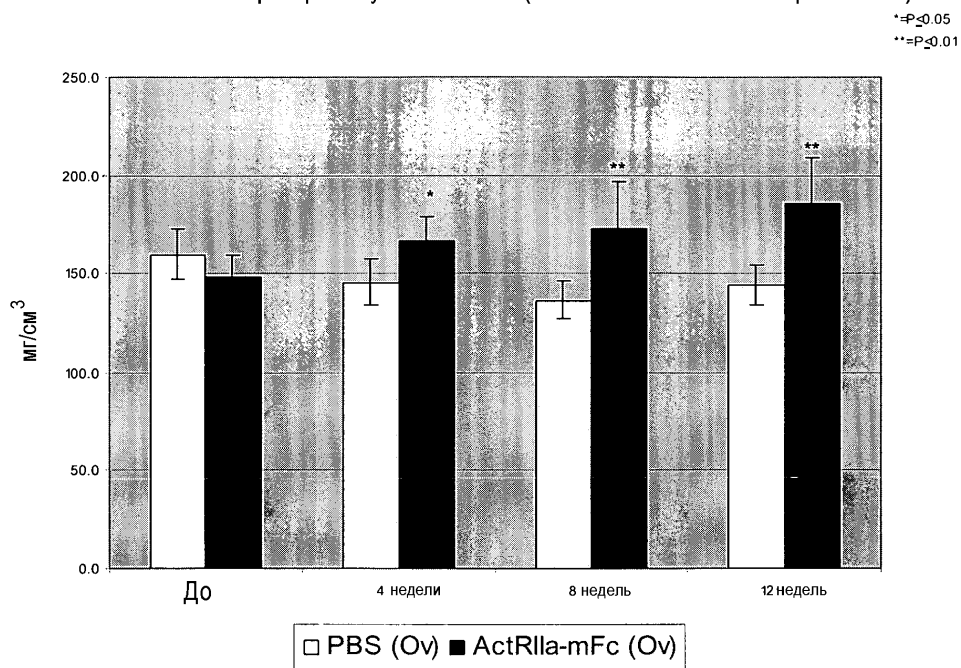
Фиг. 10

Губчатая кость (C57BL6 после ложной операции)

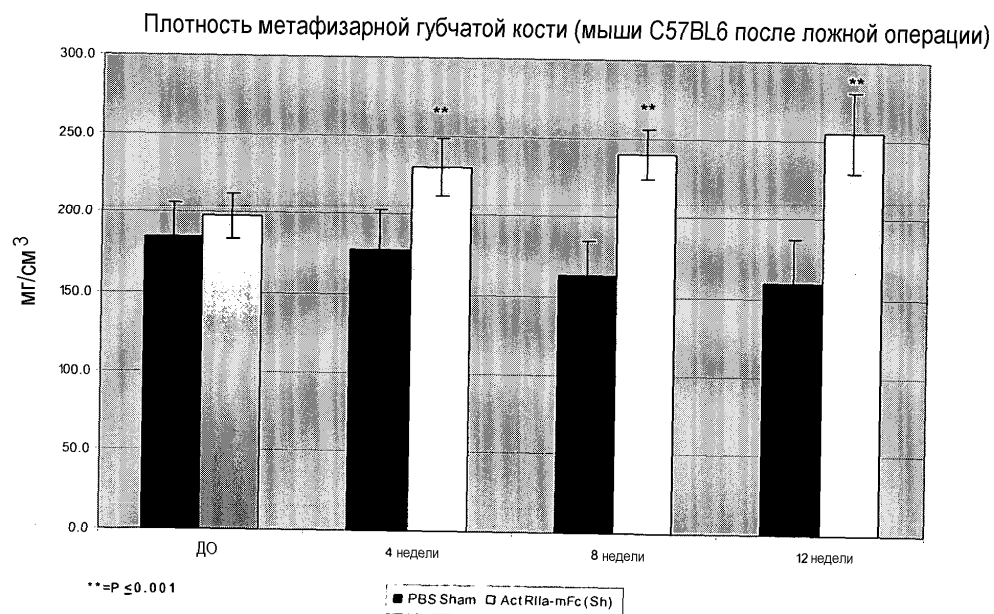


Фиг. 11

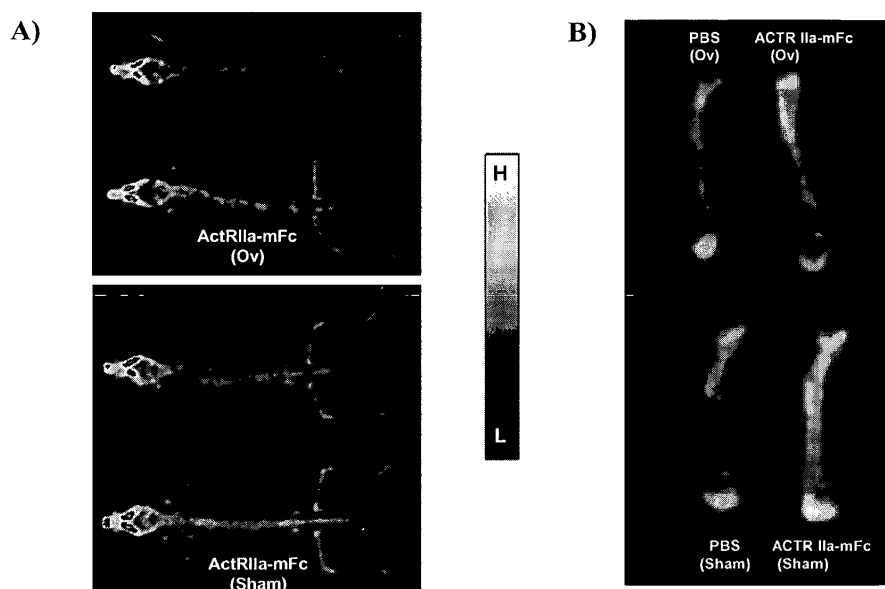
Плотность метафизарной губчатой кости (мыши C57BL6 после овариэктомии)



Фиг. 12

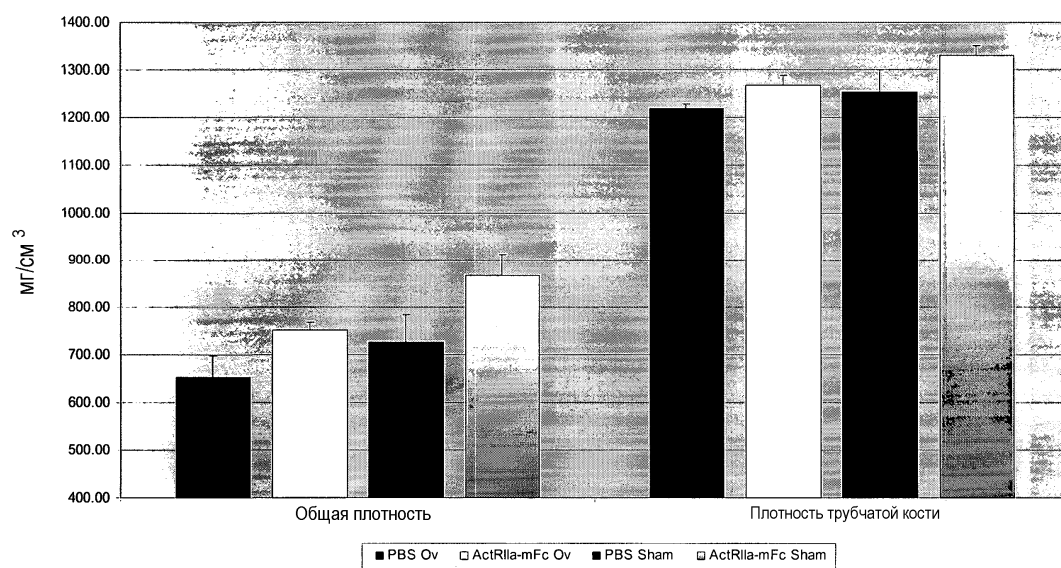


Фиг. 13



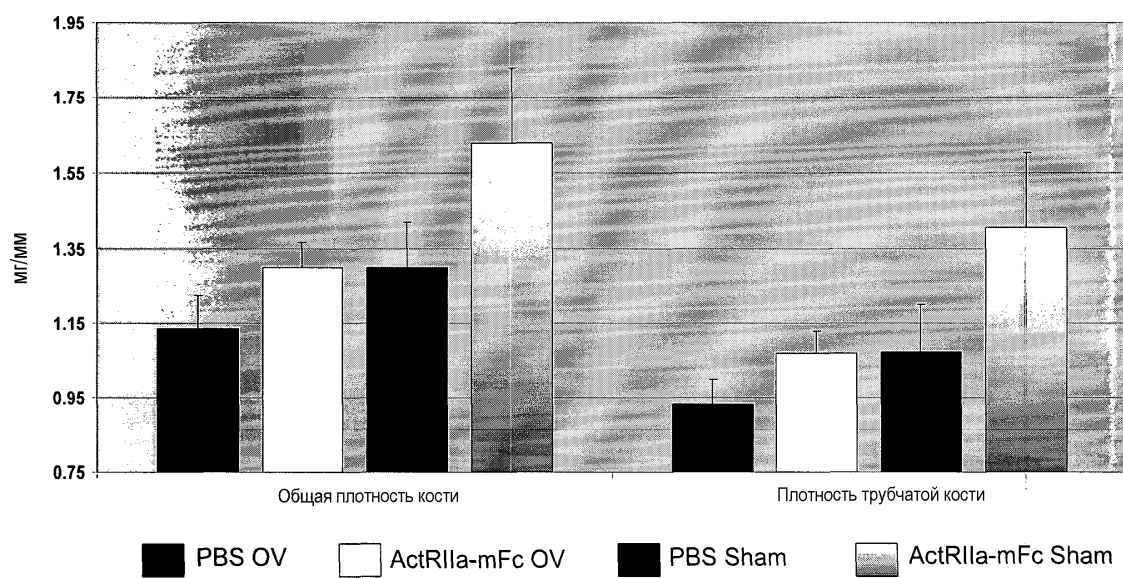
Фиг. 14

Плотность бедренной кости ex vivo



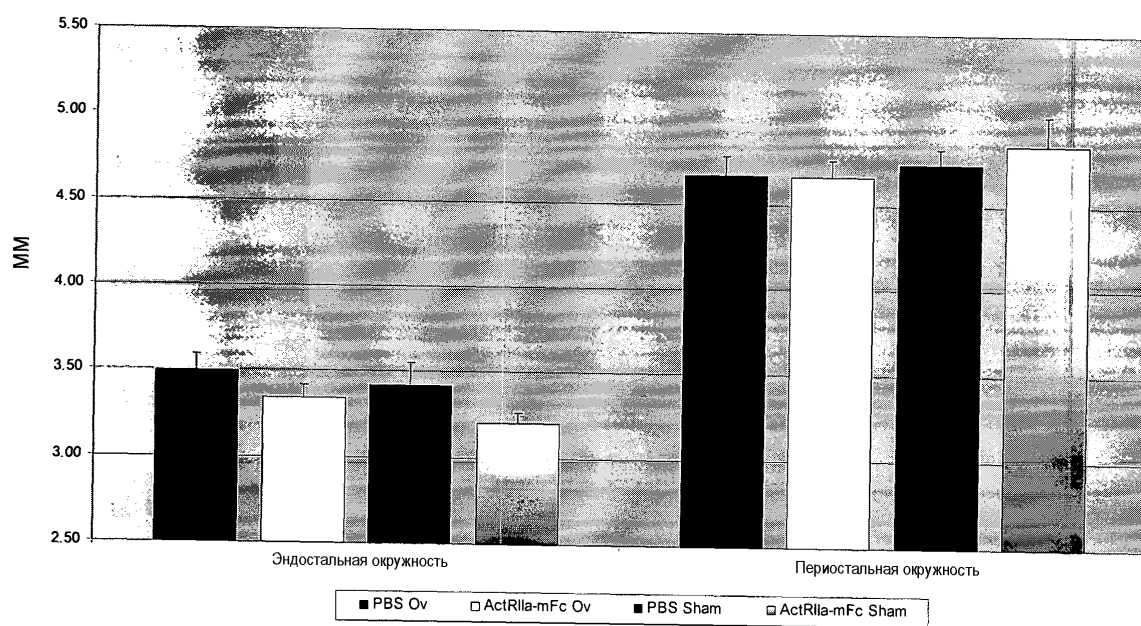
Фиг. 15

Диафизарное содержание кости бедренной кости



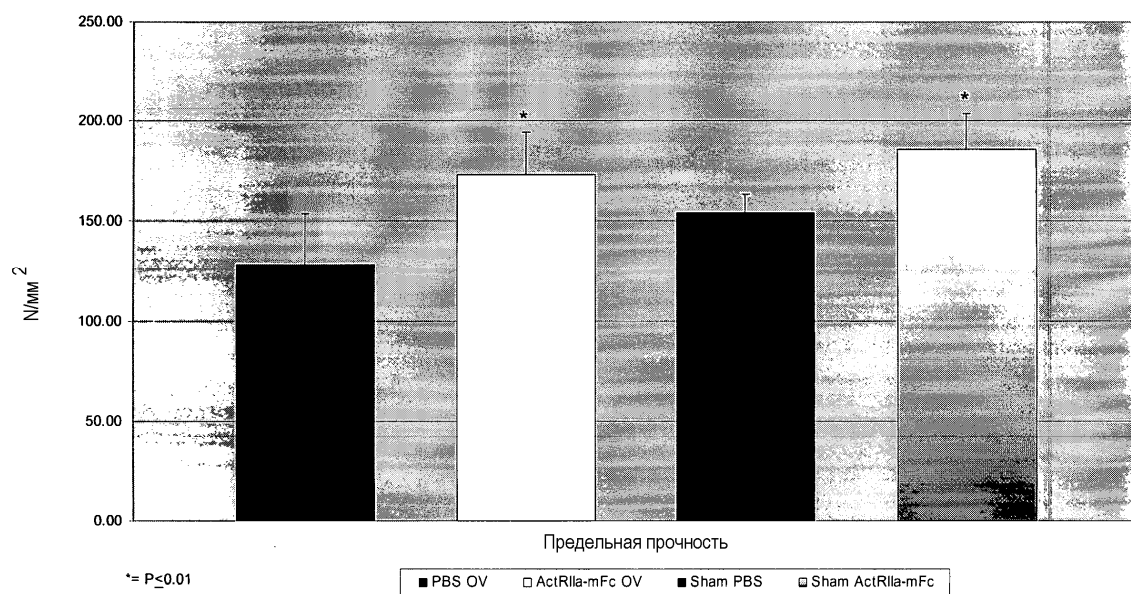
Фиг. 16

Толщина кортикального слоя бедренной кости ex vivo

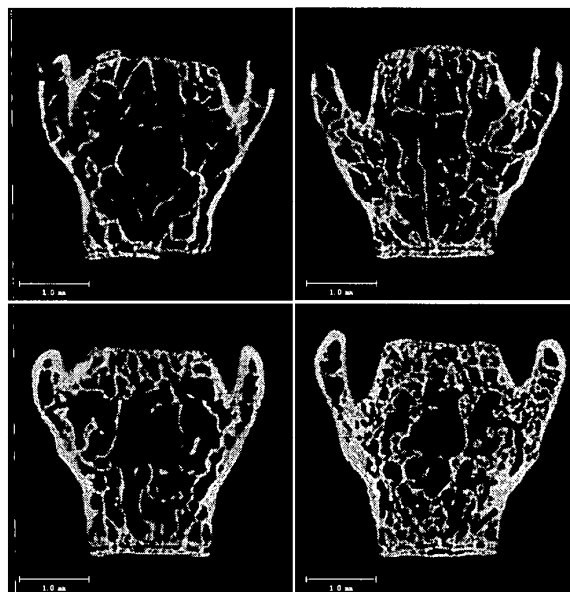
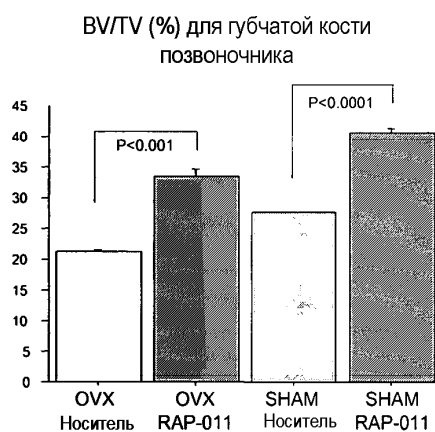


Фиг. 17

Биомеханическое тестирование по четырем точкам



Фиг. 18



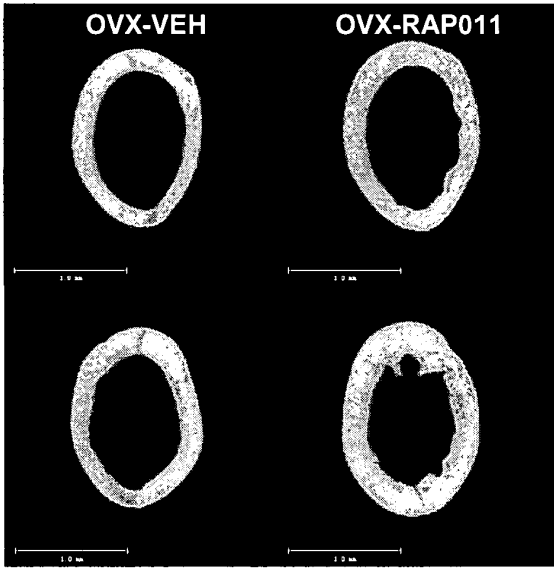
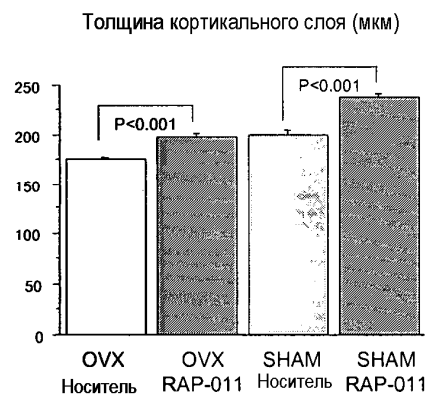
Данные микро-СТ в конце исследования (возраст 24 недели)

Фиг. 19

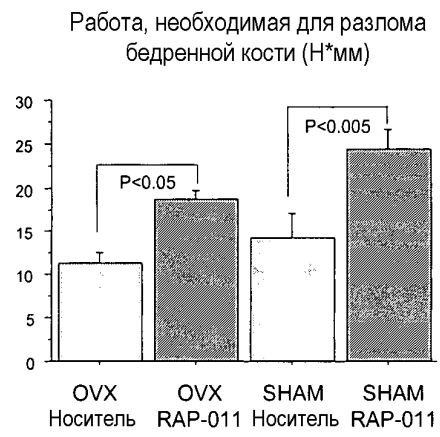
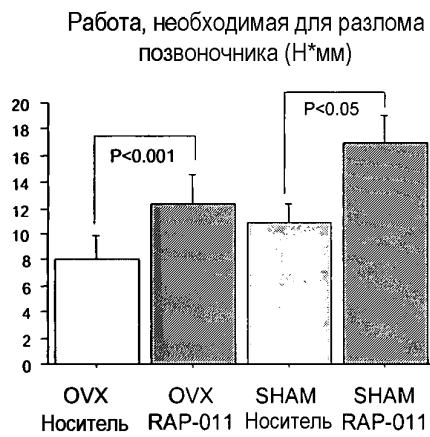
	OVX-VEH	OVX-RAP-011	SHAM-VEH	SHAM-RAP-011
@ 12 НЕДЕЛЬ	OVX-VEH	OVX-RAP-011	SHAM-VEH	SHAM-RAP-011
Tb N (мм ⁻¹)	2.1 ± 0.3	3.5 ± 0.2 **	3.0 ± 0.2	4.1 ± 0.2 **
Tb Sp (мкм)	486.2 ± 79	283.9 ± 21 **	332.4 ± 25	230.2 ± 12 **
Conn D (мм ⁻³)	8.4 ± 6	85.1 ± 13.7 **	41.4 ± 14.8	131.2 ± 16.5 **

** p< 0.01 vs VEH

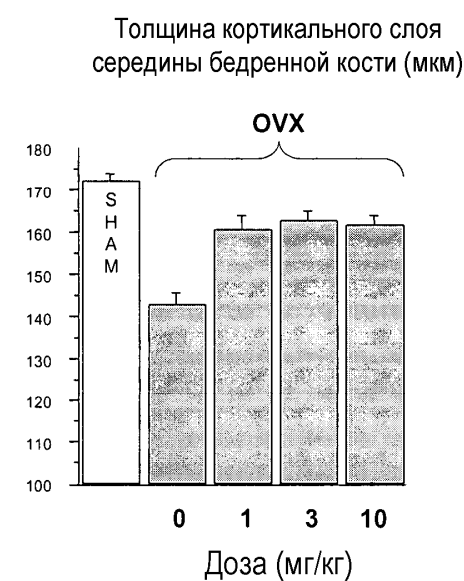
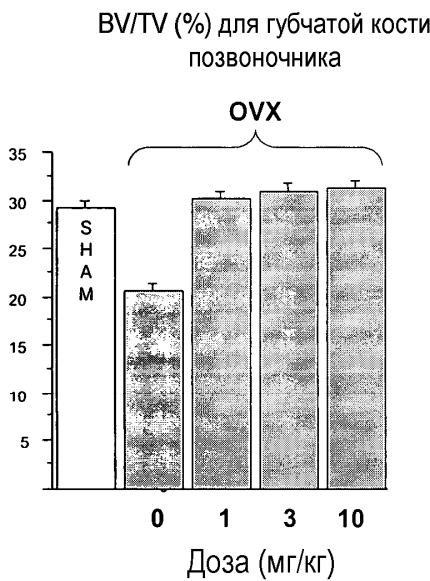
Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23

	BV/TV (%)	ES/BS (%)	Nob/BPm (/ MM)	Noc/BPm (/ MM)	Ms/Bs (%)	MAR (мкм/сутки)	BFR/BSd (мкм ³ /мкм ² /сутки)
Среднее для PBS	7.53	17.36	49.33	7.55	4.206	0.704	0.029
Среднее для RAP-011	10.88	13.93	40.89	5.34	7.546	0.852	0.065
Значение P	0.002	0.03	0.02	0.01	0.008	0.03	0.002

Фиг. 24

Параметр	2 недели VEH (N=6)	2 недели RAP-011 (N=6)	4 недели VEH (N=6)	4 недели RAP-011 (N=6)	6 недели VEH (N=8)	6 недели RAP-011 (N=8)	12 недели VEH (N=6)	12 недели RAP-011 (N=6)
Объем кости (BV/TV), %	7.53 ± 0.35	10.88 ± 0.45 *	7.04 ± 0.51	15.57 ± 1.39 *	6.14 ± 0.41	14.31 ± 0.53 *	4.39 ± 0.42	15.24 ± 1.08 *
Остеоидная поверхность (OS/BS), %	4.86 ± 0.34	5.32 ± 0.49	3.95 ± 0.51	3.65 ± 0.36	3.26 ± 0.34	3.31 ± 0.42	2.1 ± 0.46	1.91 ± 0.08
Эродированная поверхность (ES/BS), %	17.36 ± 0.99	13.93 ± 0.96 *	13.61 ± 1.6	12.01 ± 1.39	12.38 ± 1.31	11.89 ± 0.77	8.56 ± 0.77	10.0 ± 0.34
Число остеобластов/площадь (Ob/Tar), по./мм	429.89 ± 25.33	455.31 ± 28.29	411.84 ± 44.61	567.78 ± 53.13 *	405.22 ± 24.2	634.61 ± 35.39 *	238.69 ± 14.2	521.86 ± 22.77 *
Поверхность остеобластов / поверхность кости (Oba/BS), %	36.12 ± 2.42	29.43 ± 1.52 *	33.5 ± 2.53	29.14 ± 1.93	35.5 ± 1.27	35.92 ± 1.29	28.45 ± 1.32	30.24 ± 1.5
Остеобласты на периметр кости (Nob/BPm), %	49.33 ± 2.52	40.89 ± 1.46 *	48.52 ± 4.16	41.33 ± 3.25	49.61 ± 2.87	49.2 ± 3.26	39.4 ± 2.03	36.64 ± 2.53
Число остеокластов/площадь (Oc/Tar), по./мм	65.81 ± 4.97	59.62 ± 5.89	51.42 ± 3.58	65.68 ± 8.18	45.23 ± 3.98	62.95 ± 5.18 *	28.07 ± 1.85	61.15 ± 1.87 *
Остеокласты на периметр кости (Noc/BPm), %	7.55 ± 0.53	5.34 ± 0.45 *	6.25 ± 0.66	4.78 ± 0.59	5.74 ± 0.58	4.86 ± 0.4	4.65 ± 0.32	4.49 ± 0.17
Поверхность остеокластов/поверхность кости (Oca/BS), %	8.78 ± 0.78	6.23 ± 0.5 *	6.86 ± 0.67	5.36 ± 0.62	6.38 ± 0.67	5.8 ± 0.46	8.56 ± 0.77	10.0 ± 0.34
Толщина губчатой ткани (TbTh), мкм	13.59 ± 0.48	15.42 ± 0.45 *	13.11 ± 0.46	17.68 ± 0.75 *	12.04 ± 0.5	17.28 ± 0.35 *	11.18 ± 0.52	17.49 ± 1.02 *
Разрыхление губчатой ткани (TbSp), мкм	167.74 ± 5.88	127.57 ± 7.25 *	175.98 ± 9.3	98.61 ± 6.95 *	187 ± 7.13	104.26 ± 3.42 *	251.79 ± 18.14	98.07 ± 4.27 *
Число трабекул (TbN), по./мм	5.55 ± 0.19	7.09 ± 0.36 *	5.34 ± 0.23	8.73 ± 0.5 *	5.07 ± 0.18	8.27 ± 0.22 *	3.89 ± 0.27	8.7 ± 0.29 *
Минерализованная поверхность (MS/BS), %	4.21 ± 0.7	7.55 ± 0.73 *	4.15 ± 1.02	8.84 ± 0.77 *	3.6 ± 0.56	7.97 ± 0.73 *	3.86 ± 0.4	6.66 ± 0.51 *
Скорость аппозиции минералов (мкм/сутки)	0.704 ± 0.049	0.852 ± 0.028 *	0.566 ± 0.042	0.642 ± 0.014	0.517 ± 0.02	0.602 ± 0.016 *	0.425 ± 0.009	0.533 ± 0.013 *
Скорость формирования кости (мкм ³ /мм ² /сутки)	0.029 ± 0.004	0.065 ± 0.008 *	0.025 ± 0.008	0.057 ± 0.005 *	0.019 ± 0.003	0.048 ± 0.004 *	0.016 ± 0.002	0.035 ± 0.002 *

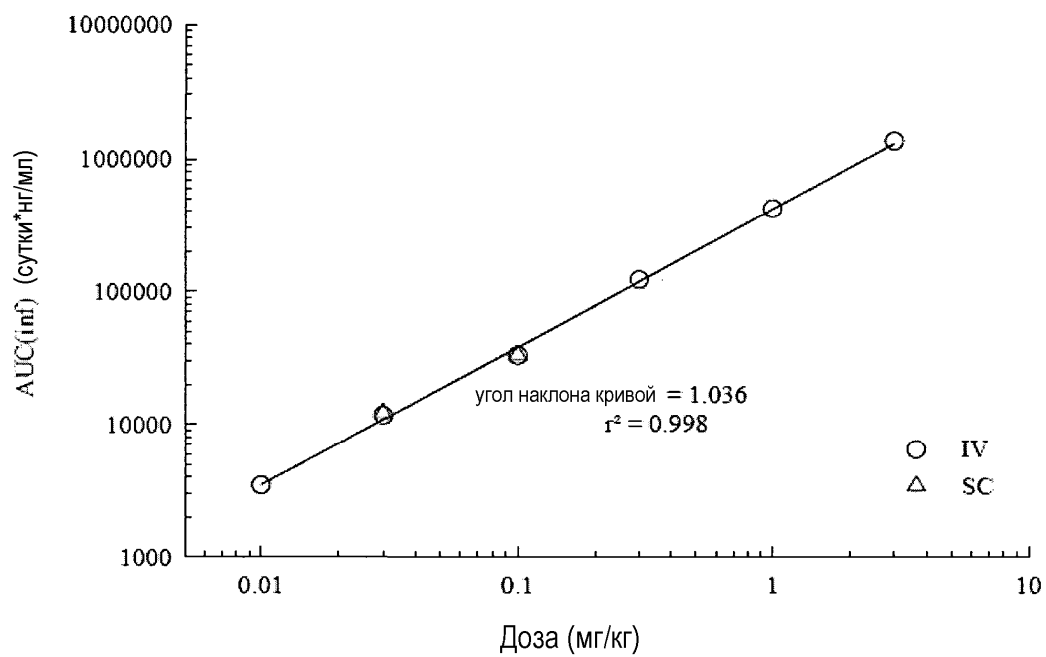
Фиг. 25

Naive

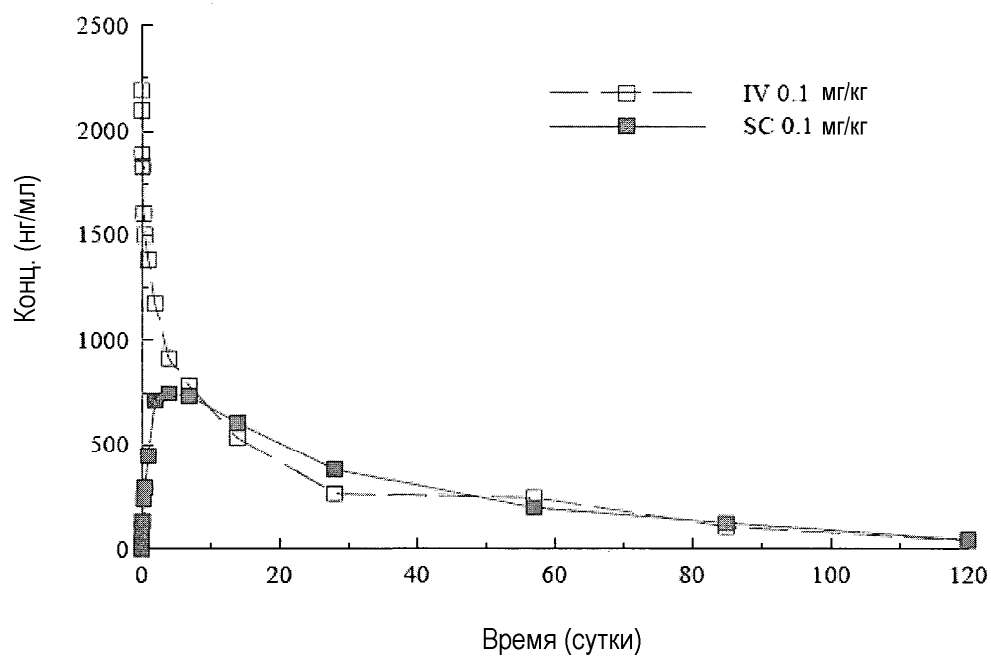
5T2 (ОПУХОЛЬ)



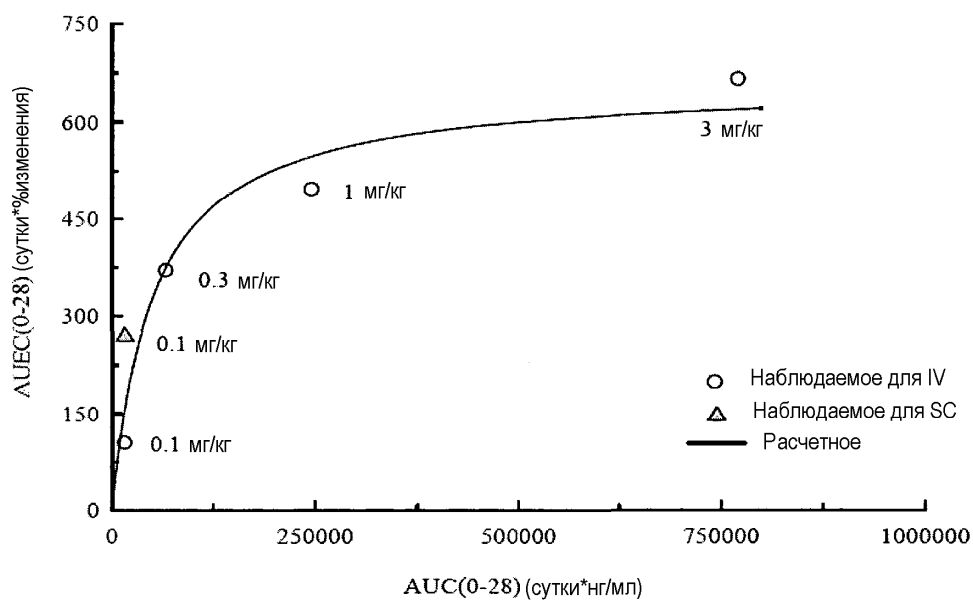
Фиг. 26



Фиг. 27

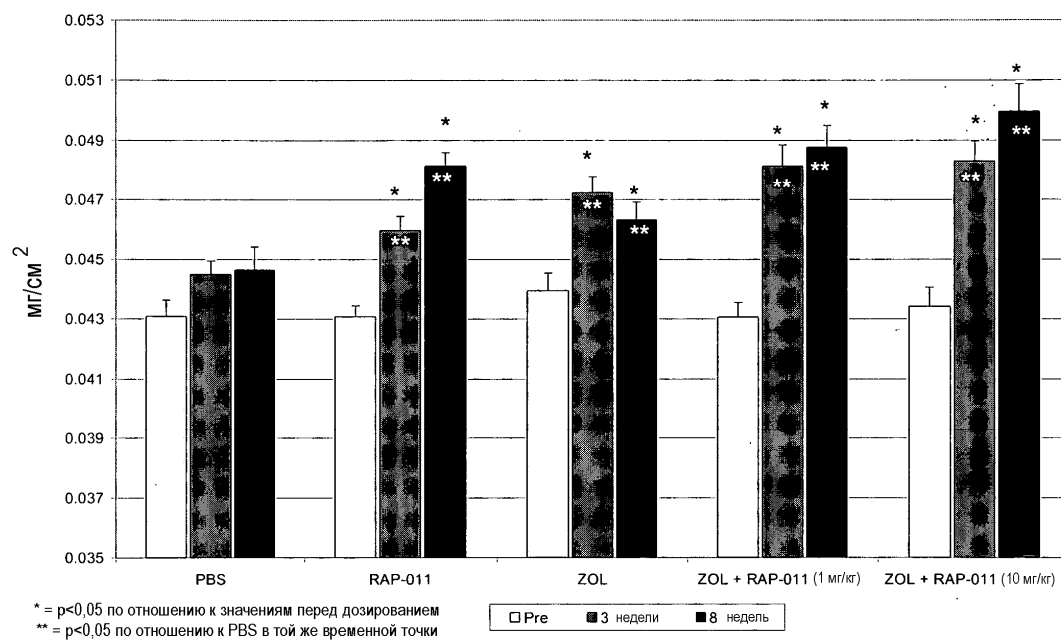


Фиг. 28



Фиг. 29

Общая BMD (PIXI)



Фиг. 30



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2