



**СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АНЕМИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ  
ЛИГАНДОВ-ЛОВУШЕК АСТРПВ И ИНГИБИТОРОВ mTOR**

**ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

**[0001]** Настоящая заявка испрашивает преимущество предварительной заявки США № 63/025955, поданной 15 мая 2020 года, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

**1. ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ**

**[0002]** Настоящая заявка включает посредством ссылки машиночитаемую форму (CRF) перечня последовательностей, представленного в данном документе, во всей своей полноте. Представленный в данном документе текстовый файл с перечнем последовательностей под названием "14247-488-228\_SEQ\_LISTING.txt" был создан 7 мая 2021 года и имеет размер 73399 байтов.

**2. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0003]** В данном документе предусмотрены способы лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, включающие введение субъекту лиганда-ловушки активина типа ПВ (ActRПВ) и ингибитора mTOR.

**3. ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0004]** Анемия представляет собой уменьшение числа эритроцитов или меньшее, чем обычно, количество гемоглобина в крови. Анемия также может быть вызвана сниженной способностью гемоглобина связывать кислород.

**[0005]** Анемия может быть вызвана неэффективным эритропоэзом. Неэффективный эритропоэз имеет место, если активный эритропоэз осуществляется, но зрелые эритроциты не могут развиваться с надлежащей скоростью. Клетки-предшественники подвергаются апоптозу до того, как достигается стадия зрелых эритроцитов. Миелодиспластические синдромы (MDS) включают нарушения гемопоэтических стволовых клеток, характеризующиеся неэффективным гемопоэзом. Более того, нарушения MDS включают нарушения, характеризующиеся наличием кольцевидных сидеробластов. Кольцевидные сидеробласты представляют собой аномальные эритробласты. Кроме того, определенные соматические мутации, ассоциированные с MDS, вызывают образование кольцевидных сидеробластов и неэффективный эритропоэз. Доминантные мутации фактора сплайсинга 3B1 (SF3B1) ассоциированы с образованием кольцевидных сидеробластов. Кольцевидные сидеробласты представляют собой эритробласты, в которых наблюдается как минимум

пять содержащих железо (сидеротических) гранул, покрывающих по меньшей мере одну треть окружности ядра. См., например, Mufti et al., 2008, *Haematologica* 93(11):1712-7. Кольцевидные сидеробласты содержат насыщенные железом митохондрии. Наличие кольцевидных сидеробластов можно выявлять посредством окраски берлинской лазурью и визуализации. Кольцевидные сидеробласты можно выявлять в мазках периферической крови и/или костного мозга.

**[0006]** Анемия может быть ассоциирована с хроническим миеломоноцитарным лейкозом (CMML). Наиболее распространенный признак CMML представляет собой наличие слишком большого количества моноцитов, которые могут оседать в печени и селезенке, вызывая их увеличение.

**[0007]** Кроме того, анемия может быть ассоциирована с талассемией. Существует два основных типа талассемии: альфа и бета. Молекулы гемоглобина состоят из альфа-и бета-цепей, которые могут подвергаться мутациям. При талассемии продуцирование либо альфа-, либо бета-цепей снижается, что приводит к развитию либо альфа-талассемии, либо бета-талассемии. Бета-талассемия, как одна из наиболее распространенных в мире наследственных гемоглобинопатий, обусловлена аутосомными мутациями в гене, кодирующем  $\beta$ -глобин, которые индуцируют отсутствие или низкий уровень синтеза данного белка в эритропоэтических клетках (Weatherall, 2001, *Nature Reviews Genetics* 2(4):245-255). Приблизительно от 80 до 90 миллионов человек (~ 1,5% мировой популяции) являются носителями бета-талассемии, при этом ежегодно рождается примерно 60000 индивидуумов, имеющих клинические проявления (Modell et al., 2007, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 67(1):39-69). Согласно подсчетам ежегодные показатели встречаемости индивидуумов с клиническими проявлениями составляют 1 на 100000 в мире и 1 на 10000 в Европейском союзе (Galanello и Origa, 2010, *Orphanet. J. Rare Dis.* 5:11). Показатели встречаемости являются наиболее высокими в Средиземноморском регионе, Среднем Востоке и Юго-Восточной Азии (в частности, в Индии, Таиланде и Индонезии; на данный регион приходится примерно 50% больных новорожденных), и показатели встречаемости в мире повышаются (например, в Европе, Северной и Южной Америке и Австралии) в результате миграции (Colah et al., 2010, *Expert Rev. Hematol.* 3(1):103-117; Modell et al., 2008, *Bull. World Health Organ.* 86(6):480-487).

**[0008]** Бета-талассемии характеризуются снижением содержания цепей  $\beta$ -глобина и последующим нарушением равновесия в системе цепей глобина (соотношения  $\alpha$ -цепей и цепей, отличных от  $\alpha$ ) в молекуле гемоглобина (Hb), что приводит к нарушению эритропоэза и другим осложнениям. У пациентов с бета-талассемией было описано около

200 различных мутаций, которые влияют на ген бета-глобина, по отношению к которым пациенты могут характеризоваться либо гомозиготностью, либо составной гетерозиготностью. Фенотипические эффекты у пациентов, таким образом, широко варьируют: от легкого нарушения до полного подавления синтеза цепей бета-глобина (Thein, 2013, Cold Spring Harb. Perspect. Med. 3(5):a011700). В дополнение к дефектным цепям  $\beta$ -глобина у пациентов может также наблюдаться  $\beta$ -талассемия в комбинации со структурными вариантами, такими как HbE, что приводит к развитию HbE/бета-талассемии.

**[0009]** С учетом отсутствия в настоящее время безопасных и эффективных видов медикаментозной терапии для лечения анемии, ассоциированной с неэффективным эритропоэзом, талассемией, альфа-талассемией, бета-талассемией, MDS или непролиферативным CMML, существует значительная неудовлетворенная медицинская потребность в разработке новых видов терапии, которые конкретно направлены на патофизиологию, лежащую в основе синдромов, включающих анемию и осложнения неэффективного эритропоэза.

**[0010]** 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 некоторыми другими белками семейства TGF-бета, 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 является первичным рецептором типа I для активинов, в частности для активина A, а ALK-7 также может служить рецептором для активинов, в частности, для активина B.

**[0011]** Луспатерцепт, лиганд-ловушка ActRIIB, был описан для лечения различных показаний. См., например, публикацию заявки на патент США № US 2018/0050085 A1, патент США № 8058229, патент США № 8361957 и патент США № 8343933.

#### **4. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0012]** В данном документе предусмотрены способы лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR.

**[0013]** В определенных вариантах осуществления анемия представляет собой анемию, ассоциированную с неэффективным эритропоэзом, талассемией, альфа-талассемией, бета-

талассемией, миелодиспластическими синдромами (MDS) или непролиферативным хроническим миеломоноцитарным лейкозом.

**[0014]** В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой рапамицин. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат рапамицина.

**[0015]** В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой рапамицин. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат рапамицина. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой сиролимус. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат сиролимуса. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой дефоролимус. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат дефоролимуса. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой эверолимус. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат эверолимуса. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой темсиролимус. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат темсиролимуса. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой ридафоролимус. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат ридафоролимуса. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой такролимус (FK-506). В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат такролимуса (FK-506). В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой зотаролимус (ABT-578). В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат зотаролимуса (ABT-578). В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой ингибирующее mTOR соединение, представляющее собой аналог, отличный от рапамицина. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат ингибирующего mTOR соединения, представляющего собой аналог, отличный от рапамицина. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой АТФ-конкурентные ингибиторы.

**[0016]** В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушка ActRIIB представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере (a) на 90% идентичной SEQ ID NO:3; (b) на 95% идентичной SEQ ID NO:3; (c) на 98% идентичной SEQ ID NO:3; (d) SEQ ID NO:3; (e) на 90% идентичной SEQ ID NO:6; (f) на 95% идентичной SEQ ID NO:6; (g) на 98% идентичной SEQ ID NO:6; (h) SEQ ID NO:6; (i) на 90% идентичной SEQ ID NO:7; (j) на 95% идентичной SEQ ID NO:7; (k) на 98% идентичной SEQ ID NO:7; (l) SEQ ID NO:7; (m) на 90% идентичной SEQ ID NO:11; (n) на 95% идентичной SEQ ID NO:11; (o) на 98% идентичной SEQ ID NO:11 или (p) SEQ ID NO:11. В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушка ActRIIB представляет собой продукт, полученный в результате экспрессии из открытой рамки считывания с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO:34 или вырожденной версией SEQ ID NO:34, которая кодирует SEQ ID NO:11. В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушка ActRIIB представляет собой гуманизированный слитый белок, состоящий из внеклеточного домена ActRIIB и Fc-домена IgG1 человека.

**[0017]** В определенных вариантах осуществления способ обеспечивает повышение уровней гемоглобина (HGB) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни HGB у субъекта до указанного лечения.

**[0018]** В определенных вариантах осуществления способ обеспечивает повышение уровней гематокрита (HCT) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни HCT у субъекта до указанного лечения.

**[0019]** В определенных вариантах осуществления способ обеспечивает снижение уровней среднего корпускулярного объема (MCV) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, или 100%, более низких, чем уровни MCV у субъекта до указанного лечения.

**[0020]** В определенных вариантах осуществления способ обеспечивает повышение уровней концентрации корпускулярного гемоглобина (CHC) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни CHC у субъекта до указанного лечения.

**[0021]** В определенных вариантах осуществления способ обеспечивает снижение уровней ширины распределения эритроцитов по объему (RDW) у субъекта до уровней,

равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, или 100% более низких, чем уровни RDW у субъекта до указанного лечения.

**[0022]** В определенных вариантах осуществления уровни ретикулоцитов у субъекта остаются в диапазоне, соответствующем или на приблизительно 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, или 20% выше или ниже уровней ретикулоцитов у субъекта до указанного лечения.

**[0023]** В определенных вариантах осуществления уровни ретикулоцитов у субъекта остаются в диапазоне, соответствующем или на приблизительно 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, или 20% выше или ниже уровней ретикулоцитов в эталонной популяции. В определенном варианте осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенном варианте осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов. В определенном варианте осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект.

**[0024]** В определенных вариантах осуществления уровни лейкоцитов у субъекта остаются в диапазоне, соответствующем или на приблизительно 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, или 20% выше или ниже уровней лейкоцитов у субъекта до указанного лечения.

**[0025]** В определенных вариантах осуществления уровни лейкоцитов у субъекта остаются в диапазоне, соответствующем или на приблизительно 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, или 20% выше или ниже уровней лейкоцитов в эталонной популяции. В определенном варианте осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенном варианте осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов. В определенном варианте осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект.

**[0026]** В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR вводят до или одновременно с введением лиганда-ловушки ActRIIB. В определенных вариантах осуществления субъект ранее получал лечение с помощью ингибитора mTOR до введения лиганда-ловушки ActRIIB. В определенных вариантах осуществления субъект ранее получал лечение с помощью лиганда-ловушки ActRIIB до введения ингибитора mTOR.

**[0027]** В определенных вариантах осуществления субъект является независимым от переливания эритроцитов. В определенных вариантах осуществления субъект является зависимым от переливания эритроцитов.

**[0028]** В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушку ActRIIB вводят в дозе, составляющей 0,6 мг/кг, 0,8 мг/кг, 1 мг/кг, 1,33 мг/кг или 1,75 мг/кг. В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушку ActRIIB вводят субъекту один раз в 21 день. В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушку ActRIIB вводят два раза в неделю. В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушку ActRIIB вводят один раз в неделю. В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушку ActRIIB вводят субъекту подкожно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек.

**[0029]** В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR вводят перорально. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR вводят в дозе, составляющей 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг, 10 мг/кг или 15 мг/кг. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR вводят ежедневно.

**[0030]** В другом аспекте в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR, при этом способ обеспечивает повышение уровней гемоглобина (HGB) в эталонной популяции до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни гемоглобина (HGB) у субъекта, который получал либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из индивидуумов с анемией. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов.

**[0031]** В еще одном аспекте в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR, при этом способ обеспечивает повышение уровней гематокрита (HCT) у субъекта

до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни гемоглобина (HGB) в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из индивидуумов с анемией. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов.

**[0032]** В еще одном аспекте в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR, при этом способ обеспечивает снижение уровней среднего корпускулярного объема (MCV) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни гемоглобина (HGB) в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из индивидуумов с анемией. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов.

**[0033]** В еще одном аспекте в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR, при этом способ обеспечивает повышение уровней концентрации корпускулярного гемоглобина (CHC) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни HGB в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах

осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из индивидуумов с анемией. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов.

**[0034]** В еще одном аспекте в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR, при этом способ обеспечивает снижение уровней ширины распределения эритроцитов по объему (RDW) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни гемоглобина (HGB) в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из индивидуумов с анемией. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов.

**[0035]** В еще одном аспекте в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR, при этом уровни ретикулоцитов у субъекта, отклоняющиеся от нормальных уровней ретикулоцитов, являются равными или на приблизительно 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, или 20% более низкими по сравнению с уровнями ретикулоцитов в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект. В определенных вариантах

осуществления эталонная популяция состоит из индивидуумов с анемией. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов.

**[0036]** В еще одном аспекте в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR, при этом уровни лейкоцитов у субъекта, отклоняющиеся от нормальных уровней ретикулоцитов, являются равными или на приблизительно 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, или 20% более низкими по сравнению с уровнями ретикулоцитов в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из индивидуумов с анемией. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из индивидуумов с анемией, ассоциированной с неэффективным эритропоэзом, талассемией, альфа-талассемией, бета-талассемией, миелодиспластическими синдромами (MDS) или непролиферативным хроническим миеломоноцитарным лейкозом (CMML). В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов.

## **5. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

**[0037]** На **фиг. 1** изображена схема доклинического эксперимента. Для эксперимента 1 (Exp1) использовали самок мышей дикого типа (C57BL/6J) в возрасте 10-12 недель (Jackson Lab, сток № 000664). Для эксперимента 2 (Exp1) использовали самок мышей B6.129P2-Hbb-b1<sup>tm1Unc</sup> Hbb-b2<sup>tm1Unc</sup>/J (th3/+) на фоне 000664 C57BL/6J (Jackson Lab, сток № 002683, мышьяная модель с бета-талассемией) в возрасте 9–18 недель. Мышиную версию луспатерцепта (RAP-536) в 1X фосфатно-солевом буфере (PBS) с общим объемом 150 мкл и дозой 10 мг/кг вводили путем подкожной (SC) инъекции два раза в неделю в течение двух недель. Рапамицин в дозе 4 мг/кг в 1xPBS, который содержит 5% Tween 80, 5% PEG400, 4% этанол, и общим объемом 150 мкл вводили путем внутрибрюшинной инъекции ежедневно, за исключением дня 6 и дня 13, в течение двух недель. Ткани собирали в день 15.

**[0038]** На **фиг. 2А** и **2В** продемонстрировано, что совместное введение доз рапамицина и мышьяной версии луспатерцепта (RAP-536) повышало уровни эритроцитов (RBC) в крови в большей степени, чем введение доз монотерапии. RAP-536 и рапамицин повышали

уровни RBC на сходных уровнях. Процентное повышение RBC у th3/+ мышей (B6.129P2-Hbb-b1<sup>tm1Unc</sup> Hbb-b2<sup>tm1Unc</sup>/J) является более высоким, чем у мышей дикого типа (C57BL/6J). Показатели количества RBC достигали уровней дикого типа у th3/+ мышей (мышей B6.129P2-Hbb-b1<sup>tm1Unc</sup> Hbb-b2<sup>tm1Unc</sup>/J на фоне 000664 C57BL/6J) после введения доз RAP-536 или рапамицина и превышали уровни дикого типа после совместного введения доз RAP-536 или рапамицина.

**[0039]** На **фиг. 3А** и **3В** продемонстрировано, что совместное введение доз рапамицина и RAP-536 повышало уровни гемоглобина (HGB) в крови в большей степени, чем введение доз монотерапии. Процентное повышение уровней HGB было сходным с процентным повышением уровней RBC. Уровни HGB у th3/+ мышей составляют приблизительно половину от уровней HGB у мышей дикого типа. Совместное введение доз повышало уровни HGB у th3/+ мышей на более чем 40%.

**[0040]** На **фиг. 4А** и **4В** продемонстрировано, что совместное введение доз рапамицина и RAP-536 повышало уровни НСТ в крови в большей степени, чем введение доз монотерапии. Повышение НСТ у мышей дикого типа ограничено после введения доз. Процентное повышение НСТ у th3/+ мышей коррелирует с повышением RBC и HGB. Совместное введение доз являлось весьма эффективным в отношении повышения уровней RBC, HGB и НСТ, особенно у th3/+ мышей.

**[0041]** На **фиг. 5А** и **5В** продемонстрировано, что совместное введение доз рапамицина и RAP-536 изменяло размер клетки RBC (MCV) у мышей дикого типа. Введение доз RAP-536 снижало MCV у мышей дикого типа, однако повышало уровни MCV у th3/+ мышей. Совместное введение доз RAP-536 и рапамицина снижало MCV у мышей дикого типа.

**[0042]** На **фиг. 6А** и **6В** показаны средние уровни корпускулярного гемоглобина (MCH) после совместного введения доз рапамицина и RAP-536. У мышей дикого типа введение доз RAP-536 слегка снижает уровни MCH. Уровни MCH являются значительно более низкими у th3/+ мышей по сравнению с мышами дикого типа. Уровни HGB и RBC у th3/+ мышей являются более низкими, чем уровни HGB и RBC у мышей дикого типа, чем объясняется более низкое общее количество HGB/клетка (MCH) у th3/+ мышей. Уровни MCH являлись более высокими после введения доз рапамицина, однако являлись более низкими после введения доз RAP-536 у мышей дикого типа, что указывает на разные механизмы действия и, таким образом, наличие потенциала для аддитивного/синергического эффекта в отношении продуцирования эритроцитов.

**[0043]** На **фиг. 7А** и **7В** продемонстрировано, что совместное введение доз рапамицина и RAP-536 повышало концентрацию корпускулярного HGB (CHC) у мышей дикого типа, однако снижало CHC у th3/+ мышей.

**[0044]** На **фиг. 8А** и **8В** продемонстрировано, что совместное введение доз рапамицина и RAP-536 снижало уровни ширины распределения эритроцитов по объему (RDW) у th3/+ мышей. RDW повышалось после введения доз RAP-536 или совместного введения доз RAP-536 и рапамицина у мышей дикого типа. Следует отметить, что RDW являлось более высоким у th3/+ мышей по сравнению с мышами дикого типа. У th3/+ мышей RDW являлось сниженным при корреляции с улучшением анемии посредством введения доз RAP-536 и совместного введения доз RAP-536 и рапамицина.

**[0045]** На **фиг. 9А** и **9В** продемонстрировано, что введение доз RAP-536 повышало уровни ретикулоцитов в крови и введение доз рапамицина снижало уровни ретикулоцитов в крови у мышей дикого типа, что позволяет предположить, что механизм действия RAP-536 и механизм действия рапамицина в отношении продуцирования эритроцитов являются разными. Процентная доля и показатели абсолютного количества ретикулоцитов изменялись таким же образом в крови у мышей дикого типа после введения доз. Совместное введение доз обоих средств нормализовало уровни ретикулоцитов.

**[0046]** На **фиг. 10А** и **10В** продемонстрировано, что совместное введение доз рапамицина и RAP-536 повышало показатели количества ретикулоцитов, но не процентную долю ретикулоцитов у th3/+ мышей. Процентная доля и показатели абсолютного количества ретикулоцитов были выше у th3/+ мышей по сравнению с таковыми у мышей дикого типа. Показатели абсолютного количества ретикулоцитов у th3/+ мышей значительно повышались после введения доз рапамицина, введения доз RAP-536 и совместного введения доз обоих средств. Тот факт, что показатели абсолютного количества ретикулоцитов у th3/+ мышей повышались как после введения доз RAP-536, так и после введения доз рапамицина, позволяет предположить, что выживаемость ретикулоцитов повышается у th3/+ мышей.

**[0047]** На **фиг. 11А** и **11В** продемонстрировано, что совместное введение доз рапамицина и RAP-536 слегка снижало содержание гемоглобина в ретикулоцитах (CHr – содержание гемоглобина в ретикулоцитах) у мышей дикого типа и у th3/+ мышей.

**[0048]** На **фиг. 12** показан иллюстративный состав ретикулоцитов в крови, проанализированный с помощью автоматизированного анализатора клеток крови в канале ретикулоцитов. Н обозначает высокие уровни РНК, незрелые ретикулоциты; М обозначает

умеренные уровни РНК и L обозначает низкие уровни РНК, зрелые ретикулоциты. (См., например, Mori et al., 2003, Nephrology Dialysis Transplantation, 18(suppl 4):416).

**[0049]** На **фиг. 13А** и **13В** показан состав ретикулоцитов в крови, измененный после совместного введения доз рапамицина и RAP-536 у мышей дикого типа. В частности, процентная доля Н-ретикулоцитов повышалась и процентная доля М-ретикулоцитов снижалась после введения доз RAP-536. Общие показатели количества ретикулоцитов повышались после введения доз RAP-536. Процентная доля Н-ретикулоцитов снижалась и процентные доли L- и М-ретикулоцитов повышались после введения доз рапамицина. Общие уровни ретикулоцитов также снижались.

**[0050]** На **фиг. 14А** и **14В** изображено, что состав ретикулоцитов в крови изменялся после совместного введения доз рапамицина и RAP-536 у th3/+ мышей. В частности, процентная доля Н-ретикулоцитов снижалась после совместного введения доз рапамицина и RAP-536 у th3/+ мышей. Совместное введение доз рапамицина и RAP-536 не снижало общие показатели количества ретикулоцитов у th3/+ мышей. Тем не менее, процентная доля Н-ретикулоцитов значительно снижалась, что позволяет предположить, что, возможно, созревание/выживание ретикулоцитов улучшалось.

**[0051]** На **фиг. 15А** и **15В** продемонстрированы изменения веса тела мышей дикого типа и th3/+ мышей.

**[0052]** На **фиг. 16А** и **16В** продемонстрированы изменения размера селезенки у мышей дикого типа и th3/+ мышей. Введение доз RAP-536 слегка увеличивало и введение доз рапамицина уменьшало размер селезенки у мышей дикого типа. Совместное введение доз рапамицина и RAP-536 нормализовало размер селезенки у мышей дикого типа. У th3/+ мышей совместное введение доз рапамицина и RAP-536 не только снижало выраженность анемии, но также уменьшало размер селезенки.

**[0053]** На **фиг. 17А** и **17В** продемонстрировано, что частота встречаемости эритробластов в костном мозге снижалась после совместного введения доз рапамицина и RAP-536 у th3/+ мышей. В частности, соотношение эритробласты/CD45(+) в костном мозге являлось высоким у th3/+ мышей и нормализовалось посредством совместного введения доз рапамицина и RAP-536.

**[0054]** На **фиг. 18А** и **18В** продемонстрировано, что большее количество ретикулоцитов продуцировалось и/или сохранялось в костном мозге у мышей дикого типа и th3/+ мышей после совместного введения доз рапамицина и RAP-536, чем после введения доз либо рапамицина, либо RAP-536 по отдельности. Соотношение ретикулоцитов и эритробластов

повышалось у мышей дикого типа и у th3/+ мышей после введения доз RAP-536 и совместного введения доз рапамицина и RAP-536.

**[0055]** На **фиг. 19А** и **19В** продемонстрировано, что введение доз RAP-536 и совместное введение доз рапамицина и RAP-536 повышало частоту встречаемости клеток Ter119(+) в селезенке как мышей дикого типа, так и th3/+ мышей.

**[0056]** На **фиг. 20А** и **20В** продемонстрированы изменения соотношения эритробласты/CD45(+) в селезенке у мышей дикого типа и th3/+ мышей после совместного введения доз рапамицина и RAP-536. У мышей дикого типа введение доз RAP-536 повышало соотношение эритробласты/CD45(+) в селезенке, и рапамицин снижал соотношение эритробласты/CD45(+) в селезенке.

**[0057]** На **фиг. 21А** и **21В** продемонстрированы изменения соотношения ретикулоциты/эритробласты в селезенке у мышей дикого типа и th3/+ мышей. Совместное введение доз рапамицина и RAP-536 обладало более слабыми прямыми эффектами в отношении эритропоэза в селезенке у th3/+ мышей, чем у мышей дикого типа. Соотношение ретикулоциты/эритробласты в селезенке мышей дикого типа было более высоким, чем в селезенке th3/+ мышей.

## **6. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

### **6.1 Сокращения и терминология**

**[0058]** " $\beta^0$ " обозначает аллель, ассоциированный с отсутствием синтеза субъединицы бета-глобина.

**[0059]** " $\beta^+$ " обозначает аллель, ассоциированный со сниженным синтезом субъединицы бета-глобина.

**[0060]** Как используется в данном документе, термин "приблизительно" при использовании в сочетании с числом обозначает любое число в пределах 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% или 15% от указанного числа. В определенных вариантах осуществления термин "приблизительно" охватывает точное указанное число.

**[0061]** Как используется в данном документе, "ActRII" обозначает рецептор активина типа II. Как используется в данном документе, "ActRIIA" обозначает рецептор активина типа IIА.

**[0062]** Как используется в данном документе, "ActRIIB" обозначает рецептор активина типа IIВ. См., например, Attisano et al., 1992, Cell 68: 97-108. Номер доступа в GenBank™ NM\_001106.3 предусматривает иллюстративную последовательность нуклеиновой кислоты человеческого ActRIIB. Номер доступа в GenBank™ NP\_001097.2

предусматривает иллюстративную аминокислотную последовательность человеческого ActRIIB.

**[0063]** Как используется в данном документе, "BL" обозначает исходный уровень.

**[0064]** Как используется в данном документе, "CHC" обозначает среднюю концентрацию корпускулярного гемоглобина.

**[0065]** Как используется в данном документе, "ECD" обозначает внеклеточный домен.

**[0066]** Как используется в данном документе, "EPO" обозначает эритропоэтин.

**[0067]** Как используется в данном документе, "sEPO" обозначает эритропоэтин в сыворотке крови.

**[0068]** Как используется в данном документе, "ESA" обозначает средство, стимулирующее эритропоэз.

**[0069]** Как используется в данном документе, "G-CSF" обозначает гранулоцитарный колониестимулирующий фактор.

**[0070]** Как используется в данном документе, "GM-CSG" обозначает гранулоцитарный макрофагальный колониестимулирующий фактор.

**[0071]** Как используется в данном документе, как "Hb", так и "HGB" обозначают гемоглобин.

**[0072]** Как используется в данном документе, "HI-E" обозначает улучшение эритроидных гематологических показателей. В определенных вариантах осуществления HI-E является таким, как определено с помощью IWG. В определенных вариантах осуществления HI-E определяется с помощью модифицированной IWG 2006 г. В определенных вариантах осуществления HI-E для пациента с низкой трансфузионной нагрузкой представляет собой повышение концентрации гемоглобина у пациента на по меньшей мере 1,5 г/дл в течение по меньшей мере 8 недель. В определенных вариантах осуществления HI-E для пациента с высокой трансфузионной нагрузкой представляет собой уменьшение на по меньшей мере 4 единицы RBC при переливании в течение 8 недель.

**[0073]** Как используется в данном документе, "HTB" обозначает высокую трансфузионную нагрузку. В определенных вариантах осуществления субъект с HTB получает ровно 4 единицы RBC или больше в течение курса из 8 недель.

**[0074]** Как используется в данном документе, "IgG" обозначает иммуноглобулин G.

**[0075]** Как используется в данном документе, "IPSS-R" обозначает пересмотренную Международную прогностическую балльную систему. См. раздел 6.5.

**[0076]** Как используется в данном документе, "IWG" обозначает Международную

рабочую группу. См., например, Cheson et al. Blood. 2000 96:3671-3674. В определенных вариантах осуществления IWG обозначает модифицированные критерии 2006 г. См., например, Cheson et al., 2006, Blood 108(2):419-425.

**[0077]** Как используется в данном документе, "LTV" обозначает низкую трансфузионную нагрузку. В определенных вариантах осуществления субъект с LTV получает менее чем 4 единицы RBC в течение курса из 8 недель.

**[0078]** Как используется в данном документе, "ITT" обозначает совокупность пациентов с назначенным исследуемым лечением.

**[0079]** Как используется в данном документе, "MedDRA" обозначает Медицинский словарь для регуляторной деятельности.

**[0080]** Как используется в данном документе, "MCV" обозначает средний корпускулярный объем.

**[0081]** Как используется в данном документе, "MDS" обозначает миелодиспластические синдромы.

**[0082]** Как используется в данном документе, "mTOR" обозначает мишень рапамицина у млекопитающих.

**[0083]** Как используется в данном документе, "PD" обозначает фармакодинамику.

**[0084]** Как используется в данном документе, "PK" обозначает фармакокинетику.

**[0085]** Как используется в данном документе, "RA" обозначает рефрактерную анемию.

**[0086]** Как используется в данном документе, "RAEB" обозначает рефрактерную анемию с избытком бластов.

**[0087]** Как используется в данном документе, "рапамицин" обозначает сиролимус. "Рапамицин" и "сиролимус" используются в данном документе взаимозаменяемо.

**[0088]** Как используется в данном документе, "RBC" обозначает эритроциты.

**[0089]** Как используется в данном документе, "RBC-TI" обозначает независимость от переливания эритроцитов.

**[0090]** Как используется в данном документе, "RCMD-RS" обозначает рефрактерную цитопению с мультилинейной дисплазией с кольцевидными сидеробластами.

**[0091]** Как используется в данном документе, "RDW" обозначает ширину распределения эритроцитов по объему.

**[0092]** Как используется в данном документе, "RS" обозначает кольцевидный сидеробласт.

**[0093]** Как используется в данном документе, "SC" обозначает подкожное введение.

**[0094]** Как используется в данном документе, "SF3B1" обозначает фактор сплайсинга

3B1. Номера доступа в GenBank™ NM\_012433.3, NM\_001005523.2 и NM\_001308824.1 предусматривают иллюстративные последовательности нуклеиновой кислоты для человеческого SF3B1. Номера доступа в GenBank™ NP\_001295753.1, NP\_001005526.1 и NP\_036565.2 предусматривают иллюстративные аминокислотные последовательности для человеческого SF3B1.

**[0095]** Как используется в данном документе, "WPSS" обозначает Прогностическую балльную систему Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ).

**[0096]** Как используется в данном документе, "луспатерцепт" обозначает продукт, полученный в результате экспрессии из открытой рамки считывания с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO:34 или вырожденной версией SEQ ID NO:34, которая кодирует SEQ ID NO:11, и последующих процедур очистки белка.

**[0097]** В определенных вариантах осуществления термины "лечить", "осуществление лечения", "лечение" и т. п. относятся к действию (такому как введение лиганда-ловушки ActRIIB и ингибитора mTOR) для устранения, снижения, подавления, смягчения или ослабления, временного или постоянного, по меньшей мере одной из основополагающих причин заболевания, нарушения или состояния, поражающих субъекта, или по меньшей мере одного из симптомов, ассоциированных с заболеванием, нарушением, состоянием, поражающими субъекта.

**[0098]** В определенных вариантах осуществления термины "лечить", "лечение" или "осуществление лечения" в контексте анемии включают ослабление по меньшей мере одного симптома анемии. Неограничивающие примеры симптомов анемии включают усталость, упадок сил, учащенное сердцебиение, одышку, головные боли, трудности с концентрацией внимания, головокружение, бледность кожи, судороги в ногах и бессонницу.

**[0099]** В определенных вариантах осуществления термины "лечить", "лечение" или "осуществление лечения" в контексте бета-талассемии включают ослабление по меньшей мере одного симптома бета-талассемии. Неограничивающие примеры симптомов бета-талассемии включают продуцирование дефектных эритроцитов в костном мозге, неэффективный эритропоэз, дефектные уровни гемоглобина, полиорганную недостаточность, перенасыщение железом, бледность, усталость, желтуху и спленомегалию.

**[00100]** В определенных вариантах осуществления термины "лечить", "лечение" или "осуществление лечения" в контексте MDS включают ослабление по меньшей мере одного симптома MDS. Неограничивающие примеры симптомов MDS включают усталость,

слабость, легкое образование синяков или кровотечения, лихорадку, боли в костях, одышку и частые инфекционные заболевания.

**[00101]** В определенных вариантах осуществления термины "лечить", "лечение" или "осуществление лечения" в контексте MDS включают ослабление по меньшей мере одного симптома MDS. Неограничивающие примеры симптомов MDS включают усталость, частые инфекционные заболевания, легкое образование синяков или кровотечения, дискомфорт в брюшной полости вследствие отека селезенки и потерю аппетита.

## **6.2 Обзор**

**[00102]** В данном документе предусмотрены способы лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB (например, луспатерцепта, продукта, полученного в результате экспрессии из открытой рамки считывания с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO:34 или вырожденной версией SEQ ID NO:34, которая кодирует SEQ ID NO:11, и последующих процедур очистки белка; см. раздел 6.7) и введение субъекту ингибитора mTOR (например, рапамицина; см. раздел 6.8). Режимы введения доз описаны в разделе 6.4. Популяции пациентов, которых можно подвергать лечению с применением способов, предусмотренных в данном документе, описаны в разделе 6.5. Клинические исходы способов, предусмотренных в данном документе, описаны в разделе 6.3.

## **6.3 Способы лечения**

**[00103]** В данном документе предусмотрены способы лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB (такого как лиганды-ловушки ActRIIB, описанные в разделе 6.7) и введение субъекту ингибитора mTOR (такого как ингибиторы mTOR, описанные в разделе 6.8).

**[00104]** В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR, при этом способ обеспечивает повышение уровней эритроцитов (RBC) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни RBC в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400,

500, или 1000 индивидуумов. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из индивидуумов с анемией. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов.

**[00105]** В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR, при этом способ обеспечивает повышение уровней НСТ у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни НСТ в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из индивидуумов с анемией. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов.

**[00106]** В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR, при этом способ обеспечивает повышение уровней гемоглобина (HGB) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни гемоглобина (HGB) в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из индивидуумов с анемией. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов.

**[00107]** В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR, при этом способ обеспечивает снижение уровней среднего корпускулярного объема (MCV) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни гемоглобина (HGB) в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из индивидуумов с анемией. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов.

**[00108]** В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR, при этом способ обеспечивает повышение уровней концентрации корпускулярного гемоглобина (CHC) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни HGB в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из индивидуумов с анемией. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов.

**[00109]** В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR, при этом способ обеспечивает снижение уровней

ширины распределения эритроцитов по объему (RDW) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни HGB в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из индивидуумов с анемией. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов.

**[00110]** В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR, при этом способ обеспечивает снижение уровней гемоглобина в ретикулоцитах у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни HGB в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из индивидуумов с анемией. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов.

**[00111]** В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR, при этом способ обеспечивает снижение процентной доли H-ретикулоцитов у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более низких, чем процентная доля H-ретикулоцитов в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не

совместно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из индивидуумов с анемией. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов.

**[00112]** В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR, при этом способ обеспечивает повышение уровней среднего объема тромбоцитов (MPV) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни MPV в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из индивидуумов с анемией. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов.

**[00113]** В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR, при этом способ обеспечивает повышение процентной доли эритроидных клеток поздней стадии Ter119(+) в костном мозге у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем процентная доля эритроидных клеток поздней стадии Ter119(+) в костном мозге в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенных

вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из индивидуумов с анемией. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов.

**[00114]** В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR, при этом способ обеспечивает снижение частоты встречаемости эритробластов в костном мозге у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более низких, чем частота встречаемости эритробластов в костном мозге в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из индивидуумов с анемией. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов.

**[00115]** В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии, способ лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR, при этом уровни ретикулоцитов у субъекта, отклоняющиеся от нормальных уровней ретикулоцитов, являются равными или на приблизительно 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, или 20% более низкими по сравнению с уровнями ретикулоцитов в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из индивидуумов с анемией. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов.

**[00116]** В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR, при этом уровни лейкоцитов у субъекта, отклоняющиеся от нормальных уровней ретикулоцитов, являются равными или на приблизительно 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, или 20% более низкими по сравнению с уровнями ретикулоцитов в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек.

В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из индивидуумов с анемией. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов.

**[00117]** В определенных вариантах осуществления анемия представляет собой анемию, ассоциированную с неэффективным эритропоэзом, талассемией, альфа-талассемией, бета-талассемией, миелодиспластическими синдромами (MDS) или непролиферативным хроническим миеломоноцитарным лейкозом (CMML).

**[00118]** В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой рапамицин. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат рапамицина.

**[00119]** В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушка ActRIIB представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере (a) на 90% идентичной SEQ ID NO:3; (b) на 95% идентичной SEQ ID NO:3; (c) на 98% идентичной SEQ ID NO:3; (d) SEQ ID NO:3; (e) на 90% идентичной SEQ ID NO:6; (f) на 95% идентичной SEQ ID NO:6; (g) на 98% идентичной SEQ ID NO:6; (h) SEQ ID NO:6; (i) на 90% идентичной SEQ ID NO:7; (j) на 95% идентичной SEQ ID NO:7; (k) на 98% идентичной SEQ ID NO:7; (l) SEQ ID NO:7; (m) на 90% идентичной SEQ ID NO:11; (n) на 95% идентичной SEQ ID NO:11; (o) на 98% идентичной SEQ ID NO:11 или (p) SEQ ID NO:11. В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушка ActRIIB представляет собой продукт, полученный в результате экспрессии из открытой рамки считывания с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO:34 или вырожденной версией SEQ ID NO:34, которая кодирует SEQ ID NO:11. В определенных вариантах

осуществления лиганд-ловушка ActRIIB представляет собой гуманизированный слитый белок, состоящий из внеклеточного домена ActRIIB и Fc-домена IgG1 человека.

**[00120]** В определенных вариантах осуществления способ обеспечивает повышение уровней гемоглобина (HGB) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни HGB у субъекта до указанного лечения.

**[00121]** В определенных вариантах осуществления способ обеспечивает повышение уровней гематокрита (HCT) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни HCT у субъекта до указанного лечения.

**[00122]** В определенных вариантах осуществления способ обеспечивает снижение уровней среднего корпускулярного объема (MCV) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, или 100%, более низких, чем уровни MCV у субъекта до указанного лечения.

**[00123]** В определенных вариантах осуществления способ обеспечивает повышение уровней концентрации корпускулярного гемоглобина (CHC) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни CHC у субъекта до указанного лечения.

**[00124]** В определенных вариантах осуществления способ обеспечивает снижение уровней ширины распределения эритроцитов по объему (RDW) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, или 100%, более низких, чем уровни RDW у субъекта до указанного лечения.

**[00125]** В определенных вариантах осуществления уровни ретикулоцитов у субъекта остаются в диапазоне, соответствующем или на приблизительно 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, или 20% выше или ниже уровней ретикулоцитов у субъекта до указанного лечения.

**[00126]** В определенных вариантах осуществления уровни ретикулоцитов у субъекта остаются в диапазоне, соответствующем или на приблизительно 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, или 20% выше или ниже уровней ретикулоцитов в эталонной популяции. В определенном варианте осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В

определенном варианте осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов. В определенном варианте осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект.

**[00127]** В определенных вариантах осуществления уровни лейкоцитов у субъекта остаются в диапазоне, соответствующем или на приблизительно 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, или 20% выше или ниже уровней лейкоцитов у субъекта до указанного лечения.

**[00128]** В определенных вариантах осуществления уровни лейкоцитов у субъекта остаются в диапазоне, соответствующем или на приблизительно 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, или 20% выше или ниже уровней лейкоцитов в эталонной популяции. В определенном варианте осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенном варианте осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов. В определенном варианте осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект.

**[00129]** В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR вводят до или одновременно с введением лиганда-ловушки ActRIIB. В определенных вариантах осуществления субъект ранее получал лечение с помощью ингибитора mTOR до введения лиганда-ловушки ActRIIB. В определенных вариантах осуществления субъект ранее получал лечение с помощью лиганда-ловушки ActRIIB до введения ингибитора mTOR.

**[00130]** В определенных вариантах осуществления субъект является независимым от переливания эритроцитов. В определенных вариантах осуществления субъект является зависимым от переливания эритроцитов.

**[00131]** В определенном варианте осуществления лиганд-ловушку ActRIIB вводят в дозе, составляющей 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг, 10 мг/кг или 15 мг/кг. В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушку ActRIIB вводят в дозе, составляющей 0,6 мг/кг, 0,8 мг/кг, 1 мг/кг, 1,33 мг/кг или 1,75 мг/кг. В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушку ActRIIB вводят субъекту один раз в 21 день. В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушку ActRIIB вводят два раза в неделю. В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушку ActRIIB вводят один раз в неделю. В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушку ActRIIB вводят субъекту подкожно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек.

**[00132]** В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR вводят перорально. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR вводят в дозе, составляющей 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг, 10 мг/кг, 15 мг/кг, 20 мг/кг, 25 мг/кг, 30 мг/кг или 35 мг/кг. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR вводят ежедневно.

**[00133]** В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR, при этом способ обеспечивает повышение уровней гемоглобина (HGB) в эталонной популяции до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни HGB у субъекта, который получал либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из индивидуумов с анемией. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов.

**[00134]** В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR, при этом способ обеспечивает повышение уровней гематокрита (HCT) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни HGB в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из индивидуумов с

анемией. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов.

**[00135]** В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR, при этом способ обеспечивает снижение уровней среднего корпускулярного объема (MCV) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более низких, чем уровни HGB в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из индивидуумов с анемией. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов.

**[00136]** В другом аспекте в данном документе предусмотрены способы лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB (например, луспатерцепта, продукта, полученного в результате экспрессии из открытой рамки считывания с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO:34 или вырожденной версией SEQ ID NO:34, которая кодирует SEQ ID NO:11; см. раздел 6.7) и введение субъекту ингибитора mTOR (например, рапамицина; см. раздел 6.8).

**[00137]** В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигнала ActRIIB представляет собой лиганд-ловушку ActRIIB (например, луспатерцепт, продукт, полученный в результате экспрессии из открытой рамки считывания с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO:34 или вырожденной версией SEQ ID NO:34, которая кодирует SEQ ID NO:11; см. раздел 6.7). В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигнала ActRIIB вводят субъекту в комбинации со вторым фармацевтически активным средством или терапевтическим средством, как описано в разделе 6.3.1.

**[00138]** В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой без ограничения ингибитор mTOR, описанный в разделе 6.8. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой рапамицин. В определенных

вариантах осуществления ингибитор mTOR (например, рапамицин; см. раздел 6.8) вводят субъекту в комбинации со вторым фармацевтически активным средством или терапевтическим средством, как описано в разделе 6.3.1.

### **6.3.1 Комбинированная терапия**

**[00139]** В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую ингибитор mTOR, вводят до введения лиганда-ловушки ActRIIB или одновременно с ним.

**[00140]** В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую ингибитор mTOR, вводят после введения лиганда-ловушки ActRIIB.

**[00141]** В определенных вариантах осуществления субъект ранее получал лечение с помощью ингибитора mTOR до введения лиганда-ловушки ActRIIB.

**[00142]** В определенных вариантах осуществления субъект ранее получал лечение с помощью лиганда-ловушки ActRIIB до введения ингибитора mTOR.

**[00143]** В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR вводят до введения лиганда-ловушки ActRIIB или одновременно с ним.

### **6.4 Режим введения доз и коррекция дозы**

**[00144]** В данном документе предусмотрены способы для лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, включающие введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и введение субъекту ингибитора mTOR. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает (а) измерение концентрации гемоглобина, гематокрита, MCH, MCV, MCV, CHC, RDW, ретикулоцитов, размера селезенки или объема селезенки; и (b) введение последующей дозы лиганда-ловушки ActRIIB исходя из разницы между показателями измерения концентрации гемоглобина, гематокрита, MCH, MCV, MCV, CHC, RDW, ретикулоцитов, размера селезенки или объема селезенки в эталонной популяции.

**[00145]** В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает (а) измерение концентрации гемоглобина, гематокрита, MCH, MCV, MCV, CHC, RDW, ретикулоцитов, размера селезенки или объема селезенки; и (b) введение последующей дозы фармацевтической композиции, содержащей ингибитор mTOR или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат, исходя из разницы между показателями измерения концентрации гемоглобина, гематокрита, MCH, MCV, MCV, CHC, RDW, ретикулоцитов, размера селезенки или объема селезенки на стадии (а) и в эталонной популяции.

**[00146]** В определенных вариантах осуществления размер селезенки или объем селезенки измеряют посредством визуализации с помощью магнитного резонанса (MRI). В

определенных вариантах осуществления размер селезенки или объем селезенки измеряют с помощью компьютерной томографии (СТ). В определенных вариантах осуществления размер селезенки или объем селезенки измеряют с помощью пальпации.

**[00147]** В еще одном аспекте в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии, неэффективного эритропоэза или бета-талассемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие (a) осуществление первого измерения концентрации гемоглобина, гематокрита, MCH, MCV, MCV, CHC, RDW, ретикулоцитов, размера селезенки или объема селезенки у субъекта; (b) введение субъекту начальной дозы лиганда-ловушки ActRIIB; (c) введение субъекту начальной дозы фармацевтической композиции, содержащей ингибитор mTOR или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат; (d) по прошествии первого промежутка времени осуществление второго измерения концентрации гемоглобина, гематокрита, MCH, MCV, MCV, CHC, RDW, ретикулоцитов, размера селезенки или объема селезенки у субъекта и (e) введение последующей дозы фармацевтической композиции, содержащей ингибитор mTOR или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат, исходя из разницы между показателями второго измерения концентрации гемоглобина, гематокрита, MCH, MCV, MCV, CHC, RDW, ретикулоцитов, размера селезенки или объема селезенки и первого измерения концентрации гемоглобина, гематокрита, MCH, MCV, MCV, CHC, RDW, ретикулоцитов, размера селезенки или объема селезенки.

**[00148]** В еще одном аспекте в данном документе предусмотрены способы для лечения анемии, неэффективного эритропоэза или бета-талассемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающие (a) осуществление первого измерения концентрации гемоглобина, гематокрита, MCH, MCV, MCV, CHC, RDW, ретикулоцитов, размера селезенки или объема селезенки у субъекта; (b) введение субъекту начальной дозы лиганда-ловушки ActRIIB; (c) введение субъекту ингибитора mTOR или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата; (d) по прошествии первого промежутка времени осуществление второго измерения концентрации гемоглобина, гематокрита, MCH, MCV, MCV, CHC, RDW, ретикулоцитов, размера селезенки или объема селезенки у субъекта и (e) введение последующей дозы лиганда-ловушки ActRIIB, исходя из разницы между показателями второго измерения концентрации гемоглобина, гематокрита, MCH, MCV, MCV, CHC, RDW, ретикулоцитов, размера селезенки или объема селезенки и первого измерения концентрации гемоглобина, гематокрита, MCH, MCV, MCV, CHC, RDW, ретикулоцитов, размера селезенки или объема селезенки.

**[00149]** В определенных вариантах осуществления первое измерение концентрации гемоглобина, гематокрита, MCH, MCV, MCV, CHC, RDW, ретикулоцитов, размера селезенки или объема селезенки осуществляют до введения ингибитора mTOR.

**[00150]** В определенных вариантах осуществления первое измерение концентрации гемоглобина, гематокрита, MCH, MCV, MCV, CHC, RDW, ретикулоцитов, размера селезенки или объема селезенки осуществляют до введения субъекту лиганда-ловушки ActRIIB.

**[00151]** В определенных вариантах осуществления второе измерение концентрации гемоглобина, гематокрита, размера селезенки или объема селезенки осуществляют через примерно 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев или 12 месяцев после введения начальной дозы ингибитора mTOR. В определенных вариантах осуществления второе измерение концентрации гемоглобина, гематокрита, размера селезенки или объема селезенки осуществляют через примерно 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев или 12 месяцев после введения начальной дозы лиганда-ловушки ActRIIB.

**[00152]** В определенных вариантах осуществления первый промежуток времени составляет приблизительно 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель или 12 недель.

**[00153]** В определенных вариантах осуществления последующая доза ингибитора mTOR является такой же, как и начальная доза ингибитора mTOR.

**[00154]** В определенных вариантах осуществления последующая доза лиганда-ловушки ActRIIB является такой же, как и начальная доза.

**[00155]** В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую ингибитор mTOR или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат, вводят до или одновременно с введением лиганда-ловушки ActRIIB.

**[00156]** В определенных вариантах осуществления субъект ранее получал лечение с помощью любого ингибитора mTOR до введения лиганда-ловушки ActRIIB. В определенных вариантах осуществления субъект ранее получал лечение с помощью ингибитора mTOR до введения введения лиганда-ловушки ActRIIB.

**[00157]** В определенных вариантах осуществления повышенные уровни концентрации гемоглобина, гематокрита, MCH, CHC, размера селезенки или объема селезенки равны или на приблизительно 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%,

80%, 90%, 100%, 200% или 500% более высокие, чем уровни концентрации гемоглобина, гематокрита, MCH, CHC, размера селезенки или объема селезенки у первых 10%, первых 5%, первых 4%, первых 3%, первых 2% или первого 1% в эталонной популяции.

**[00158]** В определенных вариантах осуществления сниженные уровни MCV или RDW равны или на приблизительно 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% или 100% более низкие, чем уровни MCV или RDW у последних 10%, последних 5%, последних 4%, последних 3%, последних 2% или последнего 1% в эталонной популяции.

**[00159]** В определенных вариантах осуществления последующая доза ингибитора mTOR составляет на приблизительно 0,1 мг, приблизительно 0,2 мг, приблизительно 0,3 мг, приблизительно 0,4 мг, приблизительно 0,5 мг, приблизительно 0,6 мг, приблизительно 0,7 мг, приблизительно 0,8 мг, приблизительно 0,9 мг, приблизительно 1 мг, приблизительно 1,1 мг, приблизительно 1,2 мг, приблизительно 1,3 мг, приблизительно 1,4 мг, приблизительно 1,5 мг, приблизительно 1,6 мг, приблизительно 1,7 мг, приблизительно 1,8 мг, приблизительно 1,9 мг, приблизительно 2,0 мг, приблизительно 2,1 мг, приблизительно 2,2 мг, приблизительно 2,3 мг, приблизительно 2,4 мг, приблизительно 2,5 мг, приблизительно 2,5 мг, приблизительно 2,6 мг, приблизительно 2,7 мг, приблизительно 2,8 мг, приблизительно 2,9 мг, приблизительно 3,0 мг, приблизительно 3,5 мг, приблизительно 4,0 мг, приблизительно 4,5 мг, приблизительно 5 мг, приблизительно 6 мг, приблизительно 7 мг, приблизительно 8 мг, приблизительно 9 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 11 мг, приблизительно 12 мг, приблизительно 13 мг, приблизительно 14 мг, приблизительно 15 мг, приблизительно 16 мг, приблизительно 17 мг, приблизительно 18 мг, приблизительно 19 мг, приблизительно 20 мг или приблизительно 35 мг меньше, чем начальная доза ингибитора mTOR, или составляет на приблизительно 0,05 мг/кг, приблизительно 0,06 мг/кг, приблизительно 0,07 мг/кг, приблизительно 0,08 мг/кг, приблизительно 0,09 мг/кг, приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,11 мг/кг, приблизительно 0,12 мг/кг, приблизительно 0,13 мг/кг, приблизительно 0,14 мг/кг, приблизительно 0,15 мг/кг, приблизительно 0,16 мг/кг, приблизительно 0,17 мг/кг, приблизительно 0,18 мг/кг, приблизительно 0,19 мг/кг, приблизительно 0,20 мг/кг, приблизительно 0,21 мг/кг, приблизительно 0,22 мг/кг, приблизительно 0,23 мг/кг, приблизительно 0,24 мг/кг, приблизительно 0,25 мг/кг, приблизительно 0,26 мг/кг, приблизительно 0,27 мг/кг, приблизительно 0,28 мг/кг, приблизительно 0,29 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 0,35 мг/кг, приблизительно 0,4 мг/кг, приблизительно 0,45 мг/кг, приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 0,6 мг/кг, приблизительно 0,7 мг/кг, приблизительно 0,8 мг/кг,

приблизительно 0,9 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 1,1 мг/кг,  
приблизительно 1,2 мг/кг, приблизительно 1,3 мг/кг, приблизительно 1,4 мг/кг,  
приблизительно 1,5 мг/кг, приблизительно 1,6 мг/кг, приблизительно 1,7 мг/кг,  
приблизительно 1,8 мг/кг, приблизительно 1,9 мг/кг, приблизительно 2,0 мг/кг,  
приблизительно 2,1 мг/кг, приблизительно 2,2 мг/кг, приблизительно 2,3 мг/кг,  
приблизительно 2,4 мг/кг, приблизительно 2,5 мг/кг, приблизительно 2,5 мг/кг,  
приблизительно 2,6 мг/кг, приблизительно 2,7 мг/кг, приблизительно 2,8 мг/кг,  
приблизительно 2,9 мг/кг, приблизительно 3,0 мг/кг, приблизительно 3,5 мг/кг,  
приблизительно 4,0 мг/кг, приблизительно 4,5 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг,  
приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 7 мг/кг, приблизительно 8 мг/кг, приблизительно  
9 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 11 мг/кг, приблизительно 12 мг/кг,  
приблизительно 13 мг/кг, приблизительно 14 мг/кг или приблизительно 15 мг/кг меньше,  
чем начальная доза ингибитора mTOR. В определенном варианте осуществления  
последующая доза ингибитора mTOR является такой же, как и начальная доза ингибитора  
mTOR.

**[00160]** В определенных вариантах осуществления последующая доза лиганда-  
ловушки ActRIIB составляет на приблизительно 0,1 мг, приблизительно 0,2 мг,  
приблизительно 0,3 мг, приблизительно 0,4 мг, приблизительно 0,5 мг, приблизительно  
0,6 мг, приблизительно 0,7 мг, приблизительно 0,8 мг, приблизительно 0,9 мг,  
приблизительно 1 мг, приблизительно 1,1 мг, приблизительно 1,2 мг, приблизительно  
1,3 мг, приблизительно 1,4 мг, приблизительно 1,5 мг, приблизительно 1,6 мг,  
приблизительно 1,7 мг, приблизительно 1,8 мг, приблизительно 1,9 мг, приблизительно  
2,0 мг, приблизительно 2,1 мг, приблизительно 2,2 мг, приблизительно 2,3 мг,  
приблизительно 2,4 мг, приблизительно 2,5 мг, приблизительно 2,5 мг, приблизительно  
2,6 мг, приблизительно 2,7 мг, приблизительно 2,8 мг, приблизительно 2,9 мг,  
приблизительно 3,0 мг, приблизительно 3,5 мг, приблизительно 4,0 мг, приблизительно  
4,5 мг, приблизительно 5 мг, приблизительно 6 мг, приблизительно 7 мг, приблизительно  
8 мг, приблизительно 9 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 11 мг, приблизительно  
12 мг, приблизительно 13 мг, приблизительно 14 мг, приблизительно 15 мг,  
приблизительно 16 мг, приблизительно 17 мг, приблизительно 18 мг, приблизительно  
19 мг, приблизительно 20 мг или приблизительно 35 мг меньше, чем начальная доза  
лиганда-ловушки ActRIIB, или составляет на приблизительно 0,05 мг/кг, приблизительно  
0,06 мг/кг, приблизительно 0,07 мг/кг, приблизительно 0,08 мг/кг, приблизительно  
0,09 мг/кг, приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,11 мг/кг, приблизительно

0,12 мг/кг, приблизительно 0,13 мг/кг, приблизительно 0,14 мг/кг, приблизительно  
0,15 мг/кг, приблизительно 0,16 мг/кг, приблизительно 0,17 мг/кг, приблизительно  
0,18 мг/кг, приблизительно 0,19 мг/кг, приблизительно 0,20 мг/кг, приблизительно  
0,21 мг/кг, приблизительно 0,22 мг/кг, приблизительно 0,23 мг/кг, приблизительно  
0,24 мг/кг, приблизительно 0,25 мг/кг, приблизительно 0,26 мг/кг, приблизительно  
0,27 мг/кг, приблизительно 0,28 мг/кг, приблизительно 0,29 мг/кг, приблизительно  
0,3 мг/кг, приблизительно 0,35 мг/кг, приблизительно 0,4 мг/кг, приблизительно 0,45 мг/кг,  
приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 0,6 мг/кг, приблизительно 0,7 мг/кг,  
приблизительно 0,8 мг/кг, приблизительно 0,9 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг,  
приблизительно 1,1 мг/кг, приблизительно 1,2 мг/кг, приблизительно 1,3 мг/кг,  
приблизительно 1,4 мг/кг, приблизительно 1,5 мг/кг, приблизительно 1,6 мг/кг,  
приблизительно 1,7 мг/кг, приблизительно 1,8 мг/кг, приблизительно 1,9 мг/кг,  
приблизительно 2,0 мг/кг, приблизительно 2,1 мг/кг, приблизительно 2,2 мг/кг,  
приблизительно 2,3 мг/кг, приблизительно 2,4 мг/кг, приблизительно 2,5 мг/кг,  
приблизительно 2,5 мг/кг, приблизительно 2,6 мг/кг, приблизительно 2,7 мг/кг,  
приблизительно 2,8 мг/кг, приблизительно 2,9 мг/кг, приблизительно 3,0 мг/кг,  
приблизительно 3,5 мг/кг, приблизительно 4,0 мг/кг, приблизительно 4,5 мг/кг,  
приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 7 мг/кг, приблизительно  
8 мг/кг, приблизительно 9 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 11 мг/кг,  
приблизительно 12 мг/кг, приблизительно 13 мг/кг, приблизительно 14 мг/кг,  
приблизительно 15 мг/кг, приблизительно 16 мг/кг, приблизительно 17 мг/кг,  
приблизительно 18 мг/кг, приблизительно 19 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг или  
приблизительно 35 мг/кг меньше, чем начальная доза лиганда-ловушки ActRIIB. В  
определенном варианте осуществления последующая доза лиганда-ловушки ActRIIB  
является такой же, как и начальная доза лиганда-ловушки ActRIIB.

**[00161]** В определенных вариантах осуществления последующая доза ингибитора  
mTOR составляет на приблизительно 0,1 мг, приблизительно 0,2 мг, приблизительно 0,3 мг,  
приблизительно 0,4 мг, приблизительно 0,5 мг, приблизительно 0,6 мг, приблизительно  
0,7 мг, приблизительно 0,8 мг, приблизительно 0,9 мг, приблизительно 1 мг,  
приблизительно 1,1 мг, приблизительно 1,2 мг, приблизительно 1,3 мг, приблизительно  
1,4 мг, приблизительно 1,5 мг, приблизительно 1,6 мг, приблизительно 1,7 мг,  
приблизительно 1,8 мг, приблизительно 1,9 мг, приблизительно 2,0 мг, приблизительно  
2,1 мг, приблизительно 2,2 мг, приблизительно 2,3 мг, приблизительно 2,4 мг,  
приблизительно 2,5 мг, приблизительно 2,5 мг, приблизительно 2,6 мг, приблизительно





приблизительно 2,8 мг/кг, приблизительно 2,9 мг/кг, приблизительно 3,0 мг/кг, приблизительно 3,5 мг/кг, приблизительно 4,0 мг/кг, приблизительно 4,5 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 7 мг/кг, приблизительно 8 мг/кг, приблизительно 9 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 11 мг/кг, приблизительно 12 мг/кг, приблизительно 13 мг/кг, приблизительно 14 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг, приблизительно 16 мг/кг, приблизительно 17 мг/кг, приблизительно 18 мг/кг, приблизительно 19 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг или приблизительно 35 мг/кг больше, чем начальная доза лиганда-ловушки ActRIIB.

#### **6.4.1 Режимы введения доз лиганда-ловушки ActRIIB**

**[00163]** В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушка ActRIIB, вводимый субъекту в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе (см. раздел 6.3), представляет собой продукт, полученный в результате экспрессии из открытой рамки считывания с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO:34 или вырожденной версией SEQ ID NO:34, которая кодирует SEQ ID NO:11. В определенных вариантах осуществления доза лиганда-ловушки ActRIIB (например, продукта, полученного в результате экспрессии из открытой рамки считывания с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO:34 или вырожденной версией SEQ ID NO:34, которая кодирует SEQ ID NO:11) составляет приблизительно 0,3 мг/кг, составляет приблизительно 0,35 мг/кг, составляет приблизительно 0,4 мг/кг, приблизительно 0,45 мг/кг, приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 0,6 мг/кг, приблизительно 0,7 мг/кг, приблизительно 0,8 мг/кг, приблизительно 0,9 мг/кг, приблизительно 1,0 мг/кг, приблизительно 1,25 мг/кг, приблизительно 1,33 мг/кг, приблизительно 1,50 мг/кг, приблизительно 1,75 мг/кг или приблизительно 2,00 мг/кг. В определенных вариантах осуществления доза лиганда-ловушки ActRIIB составляет приблизительно 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг, 10 мг/кг или 15 мг/кг. В определенных вариантах осуществления доза лиганда-ловушки ActRIIB составляет приблизительно 0,3 мг/кг. В определенных вариантах осуществления доза лиганда-ловушки ActRIIB составляет приблизительно 0,45 мг/кг. В определенных вариантах осуществления доза лиганда-ловушки ActRIIB составляет приблизительно 0,6 мг/кг. В определенных вариантах осуществления доза лиганда-ловушки ActRIIB составляет приблизительно 0,8 мг/кг. В определенных вариантах осуществления доза лиганда-ловушки ActRIIB составляет приблизительно 1,0 мг/кг. В определенных вариантах осуществления доза лиганда-ловушки ActRIIB составляет приблизительно 1,25 мг/кг. В



вариантах осуществления последующая доза лиганда-ловушки ActRIIB определяется в данном документе в данном разделе. В определенных вариантах осуществления последующая доза лиганда-ловушки ActRIIB определяется исходя из разницы между показателями второго измерения концентрации гемоглобина, гематокрита, MCH, MCV, MCV, CHC, RDW, ретикулоцитов, размера селезенки или объема селезенки и первого измерения концентрации гемоглобина, гематокрита, MCH, MCV, MCV, CHC, RDW, ретикулоцитов, размера селезенки или объема селезенки. В определенных вариантах осуществления последующая доза лиганда-ловушки ActRIIB составляет приблизительно 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг, 10 мг/кг или 15 мг/кг. В определенных вариантах осуществления последующая доза лиганда-ловушки ActRIIB составляет приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 0,6 мг/кг, приблизительно 0,75 мг/кг, приблизительно 0,8 мг/кг, приблизительно 1,0 мг/кг, приблизительно 1,33 мг/кг, или приблизительно 1,5 мг/кг, или приблизительно 1,75 мг/кг. В определенных вариантах осуществления последующая доза лиганда-ловушки ActRIIB составляет приблизительно 0,1 мг/кг. В определенных вариантах осуществления последующая доза лиганда-ловушки ActRIIB составляет приблизительно 0,3 мг/кг. В определенных вариантах осуществления последующая доза лиганда-ловушки ActRIIB составляет приблизительно 0,5 мг/кг. В определенных вариантах осуществления последующая доза лиганда-ловушки ActRIIB составляет приблизительно 0,6 мг/кг. В определенных вариантах осуществления последующая доза лиганда-ловушки ActRIIB составляет приблизительно 0,75 мг/кг. В определенных вариантах осуществления последующая доза лиганда-ловушки ActRIIB составляет приблизительно 0,8 мг/кг. В определенных вариантах осуществления последующая доза лиганда-ловушки ActRIIB составляет приблизительно 1,0 мг/кг. В определенных вариантах осуществления последующая доза лиганда-ловушки ActRIIB составляет приблизительно 1,33 мг/кг. В определенных вариантах осуществления последующая доза лиганда-ловушки ActRIIB составляет приблизительно 1,5 мг/кг. В определенных вариантах осуществления последующая доза лиганда-ловушки ActRIIB составляет приблизительно 1,75 мг/кг. В определенных вариантах осуществления последующая доза лиганда-ловушки ActRIIB составляет приблизительно 2 мг/кг. В определенных вариантах осуществления последующая доза лиганда-ловушки ActRIIB составляет приблизительно 5 мг/кг. В определенных вариантах осуществления последующая доза лиганда-ловушки ActRIIB



приблизительно 2,1 мг, приблизительно 2,2 мг, приблизительно 2,3 мг, приблизительно 2,4 мг, приблизительно 2,5 мг, приблизительно 2,5 мг, приблизительно 2,6 мг, приблизительно 2,7 мг, приблизительно 2,8 мг, приблизительно 2,9 мг, приблизительно 3,0 мг, приблизительно 3,5 мг, приблизительно 4,0 мг, приблизительно 4,5 мг, приблизительно 5 мг, приблизительно 6 мг, приблизительно 7 мг, приблизительно 8 мг, приблизительно 9 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 11 мг, приблизительно 12 мг, приблизительно 13 мг, приблизительно 14 мг, приблизительно 15 мг, приблизительно 16 мг, приблизительно 17 мг, приблизительно 18 мг, приблизительно 19 мг, приблизительно 20 мг или приблизительно 35 мг больше, чем начальная доза, или на приблизительно 0,05 мг/кг, приблизительно 0,06 мг/кг, приблизительно 0,07 мг/кг, приблизительно 0,08 мг/кг, приблизительно 0,09 мг/кг, приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,11 мг/кг, приблизительно 0,12 мг/кг, приблизительно 0,13 мг/кг, приблизительно 0,14 мг/кг, приблизительно 0,15 мг/кг, приблизительно 0,16 мг/кг, приблизительно 0,17 мг/кг, приблизительно 0,18 мг/кг, приблизительно 0,19 мг/кг, приблизительно 0,20 мг/кг, приблизительно 0,21 мг/кг, приблизительно 0,22 мг/кг, приблизительно 0,23 мг/кг, приблизительно 0,24 мг/кг, приблизительно 0,25 мг/кг, приблизительно 0,26 мг/кг, приблизительно 0,27 мг/кг, приблизительно 0,28 мг/кг, приблизительно 0,29 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 0,35 мг/кг, приблизительно 0,4 мг/кг, приблизительно 0,45 мг/кг или приблизительно 0,5 мг/кг меньше, чем начальная доза лиганда-ловушки ActIIВ.

**[00167]** В определенных вариантах осуществления последующую дозу лиганда-ловушки ActIIВ вводят более часто, чем начальную дозу лиганда-ловушки ActIIВ. В определенных вариантах осуществления последующую дозу лиганда-ловушки ActIIВ вводят менее часто, чем начальную дозу лиганда-ловушки ActIIВ. В определенных вариантах осуществления последующую дозу лиганда-ловушки ActIIВ вводят с такой же частотой, что и начальную дозу лиганда-ловушки ActIIВ. В определенных вариантах осуществления последующую дозу лиганда-ловушки ActIIВ вводят один раз в 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 дней. В определенных вариантах осуществления последующую дозу вводят один раз в 21 день. В определенных вариантах осуществления последующую дозу вводят два раза в неделю. В определенных вариантах осуществления последующую дозу вводят один раз в неделю. В определенных вариантах осуществления последующую дозу лиганда-ловушки ActIIВ вводят непрерывно и/или без ограничения срока.

**[00168]** В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушку ActRIIВ вводят субъекту подкожно. В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушку ActRIIВ

вводят субъекту подкожно в область плеча, живота или бедра субъекта. В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушку ActRIIB вводят субъекту каждый 21 день. В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушку ActRIIB вводят два раза в неделю. В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушку ActRIIB вводят один раз в неделю. В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушку ActRIIB вводят субъекту один раз в 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 дней. В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушку ActRIIB вводят субъекту один раз в 21 день подкожно в плечо, живот или бедро субъекта.

**[00169]** В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушка ActRIIB является частью композиции, как описано в разделе 6.6. В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушка ActRIIB представляет собой стерильный, не содержащий консервантов, лиофилизированный порошок, восстановленный в воде для инъекции. В определенных вариантах осуществления одну дозу лиганда-ловушки ActRIIB восстанавливают в объеме воды для инъекции, составляющем более чем 1 мл. В таких вариантах осуществления одна доза лиганда-ловушки ActRIIB вводится субъекту посредством двух инъекций равного объема восстановленного лиганда-ловушки ActRIIB. В определенных вариантах осуществления субъекту вводят две инъекции в разные участки, например, одну инъекцию в правое бедро и одну инъекцию в левое бедро.

#### **6.4.2 Режимы введения доз ингибитора mTOR**

**[00170]** В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой рапамицин. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат рапамицина. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой рапамицин. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат рапамицина. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой дефоролимус. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат дефоролимуса. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой эверолимус. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат эверолимуса. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой темсиролимус. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат темсиролимуса. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой

ридафоролимус. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат ридафоролимуса. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой такролимус (FK-506). В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат такролимуса (FK-506). В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой зотаролимус (ABT-578). В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат зотаролимуса (ABT-578).

**[00171]** В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой ингибирующее mTOR соединение, представляющее собой аналог, отличный от рапамицина. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат ингибирующего mTOR соединения, представляющего собой аналог, отличный от рапамицина. В определенных вариантах осуществления ингибирующие mTOR соединения, представляющие собой аналоги, отличные от рапамицина, включают без ограничения 3,3-дииндолилметан (DIM), 32 дезоксирапамицин (SAR943), 3-метиладенин, аренобуфагин, AZD 3147, AZD-2014 (вистусертиб), AZD8055, BC-LI-0186, BEZ235 (дактолисиб), бимиралисиб (PQR309), кофеин, CC-115, CC-223 (онатасертиб), хризофановую кислоту (хризофанол), циклопирокс оламин, CID3528206, CIDD 0067106, соединение 401 (см., например, Griffen et al., 2005, J. Med. Chem. 48:569), куркумин, CZ415, eCF 309, галлат эпигаллокатехина (EGCG), ETP 45658, ETP-46464, GDC-0084, GDC-0349, GDC-0980 (апитолисиб, RG7422), генистеин, GNE-477, GNE-493, GSK1059615, GSK-2126458 (омипалисиб), ICSN3250, INK-128 (MLN0128, сапанисертиб), KU-0063794, LY3023414 (самотолисиб), ME-344 (NV-344), метформин, МНУ1485, МТИ-31 (LXI-15029), ингибитор mTOR 10 (CAS № 1222999-54-3; см., например, Liu et al., 2011, Bioorg. Med. Chem. Lett. 21(13):4036-4040), mTOR/HDAC1-IN-121 ((R)-N-(4-(1-(7-(гидроксиамино)-7-оксогептил)-4-морфолино-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-6-ил)фенил)-2-метилморфолин-4-карбоксамид), mTORC1-IN-1 (2-(4-((2,4,6-триметил-3-(4-(3-(метилсульфонил)пиридин-2-ил)пиперазин-1-карбонил)фенил)амино)пиперидин-1-ил)бензонитрил), mTOR-IN-1 (CAS № 1207358-59-5), mTOR-IN-17 ((E)-6-(фенилдиазенил)-1Н-дипиразоло[1,5-а:4',3'-e]пиримидин-3,4,7-триамин), никлозамид, NV-128 (LY-303511), NVP-BGT226, омипалисиб, OSI-027, OSU-53, паломид 529 (P529), перифозин, PF 05212384, PF-04691502, PF-04979064, гидрохлорид PI 103, PKI-402, PKI-587 (гедатолисиб), PP 121, PP-242 (торкиниб), PP30, PQR-620, QL-IX-55, RapaLink, ресвератрол, SAR245409, LY294002, вортманнин, кверцетин, мирицетин,

стауроспорин, SF1126, SF2523, STK16-IN-1, сунитиниб, Torin 1, Torin 2, триацетил-алоэ-эмодин, VS-5584, WAY-600, WJD008, WYE-125132 (WYE-132), WYE-354, WYE-687, XL388, XL-765 (воксталисиб, SAR245409), (+)-усниновую кислоту, арникоlid D, малеат BGT226 (малеат NVP-BGT226), Cbz-B3A, гидрохлорид CC-115, цикловиробуксин D, дигидромирицетин (Ampelopsin или Ampeloptin), FT-1518, GNE-317, гедераколхисид A1, JR-AB2-011, KU-0060648, NSC781406, PI-103, полифиллин I, помиферин (NSC 5113), PQR-530, ингибитор Rheb NR1, ротундовую кислоту или дигидрохлорид WYE-687.

**[00172]** В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR выбран из группы, состоящей из рапамицина, дефоролимуса, эверолимуса, темсиролимуса, ридафоролимуса, такролимуса (FK-506), зотаролимуса (ABT-578), 3,3-дииндолилметана (DIM), 32 дезоксирапамицина (SAR943), 3-метиладенина, аренобуфагина, AZD 3147, AZD-2014 (вистусертиба), AZD8055, BC-LI-0186, BEZ235 (дактолисиба), бимиралисиба (PQR309), кофеина, CC-115, CC-223 (онатасертиба), хризофановой кислоты (хризофанола), циклопирокса оламина, CID3528206, CIDD 0067106, соединения 401, куркумина, CZ415, eCF 309, галлата эпигаллокатехина (EGCG), ETP 45658, ETP-46464, GDC-0084, GDC-0349, GDC-0980 (апитолисиба, RG7422), генистеина, GNE-477, GNE-493, GSK1059615, GSK-2126458 (омипалисиба), ICSN3250, INK-128 (MLN0128, сапанисертиба), KU-0063794, LY3023414 (самотолисиба), ME-344 (NV-344), метформина, MHY1485, MTI-31 (LXI-15029), ингибитора mTOR 10 (CAS № 1222999-54-3), mTOR/HDAC1-IN-121, mTORC1-IN-1, mTOR-IN-1, mTOR-IN-17, никлозамида, NV-128 (LY-303511), NVP-BGT226, омипалисиба, OSI-027, OSU-53, паломид 529 (P529), перифозина, PF 05212384, PF-04691502, PF-04979064, гидрохлорида PI 103, PKI-402, PKI-587 (гедатолисиба), PP 121, PP-242 (торкиниба), PP30, PQR-620, QL-IX-55, RapaLink, ресвератрола, SAR245409, LY294002, вортманнина, кверцетина, мирицетина, стауроспорина, SF1126, SF2523, STK16-IN-1, сунитиниба, Torin 1, Torin 2, триацетил-алоэ-эмодина, VS-5584, WAY-600, WJD008, WYE-125132 (WYE-132), WYE-354, WYE-687, XL388, XL-765 (воксталисиба, SAR245409), (+)-усниновой кислоты, арниколида D, малеата BGT226 (малеата NVP-BGT226), Cbz-B3A, гидрохлорида CC-115, цикловиробуксина D, дигидромирицетина (Ampelopsin или Ampeloptin), FT-1518, GNE-317, гедераколхисида A1, JR-AB2-011, KU-0060648, NSC781406, PI-103, полифиллина I, помиферина (NSC 5113), PQR-530, ингибитора Rheb NR1, ротундовой кислоты и дигидрохлорида WYE-687. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR выбран из группы, состоящей из рапамицина, дефоролимуса, эверолимуса, темсиролимуса, ридафоролимуса, такролимуса (FK-506) и зотаролимуса (ABT-578).

**[00173]** В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой АТФ-конкурентный ингибитор.

**[00174]** В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR (например, рапамицин) или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат вводят субъекту перорально. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR (например, рапамицин) или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат вводят субъекту ежедневно. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR (например, рапамицин) или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат вводят субъекту один раз в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 дней.

**[00175]** В определенных вариантах осуществления доза ингибитора mTOR (например, рапамицина) или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата составляет приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,2 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 0,4 мг/кг, приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 0,6 мг/кг, приблизительно 0,7 мг/кг, приблизительно 0,8 мг/кг, приблизительно 0,9 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 4 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 7 мг/кг, приблизительно 8 мг/кг, приблизительно 9 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг или приблизительно 15 мг/кг. В определенных вариантах осуществления доза ингибитора mTOR (например, рапамицина) или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата составляет от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 0,5 мг, от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 1,0 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 5 мг, от приблизительно 5 мг до приблизительно 10 мг или от приблизительно 10 мг до приблизительно 15 мг.

**[00176]** В определенных вариантах осуществления доза ингибитора mTOR (например, рапамицина) или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата представляет собой начальную дозу. В определенных вариантах осуществления начальная доза ингибитора mTOR (например, рапамицина) составляет приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,2 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 0,4 мг/кг, приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 0,6 мг/кг, приблизительно 0,7 мг/кг, приблизительно 0,8 мг/кг, приблизительно 0,9 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 4 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 7 мг/кг, приблизительно 8 мг/кг, приблизительно 9 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг или приблизительно 15 мг/кг. В определенных вариантах

осуществления начальная доза ингибитора mTOR (например, рапамицина) или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата составляет от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 1,0 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг или от приблизительно 15 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг.

**[00177]** В определенных вариантах осуществления доза ингибитора mTOR (например, рапамицина) или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата представляет собой последующую дозу. В определенных вариантах осуществления последующая доза ингибитора mTOR (например, рапамицина) или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата определяется в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе в данном разделе. В определенных вариантах осуществления последующая доза ингибитора mTOR или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата определяется исходя из разницы между показателями второго измерения концентрации гемоглобина, гематокрита, MCH, MCV, MCV, CHC, RDW, ретикулоцитов, размера селезенки или объема селезенки и первого измерения концентрации гемоглобина, гематокрита, MCH, MCV, MCV, CHC, RDW, ретикулоцитов, размера селезенки или объема селезенки. В определенных вариантах осуществления последующая доза ингибитора mTOR (например, рапамицина) или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата составляет приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,2 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 0,4 мг/кг, приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 0,6 мг/кг, приблизительно 0,7 мг/кг, приблизительно 0,8 мг/кг, приблизительно 0,9 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 4 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 7 мг/кг, приблизительно 8 мг/кг, приблизительно 9 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг или приблизительно 15 мг/кг. В определенных вариантах осуществления начальная доза ингибитора mTOR (например, рапамицина) или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата составляет от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 1,0 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг или от приблизительно 15 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг.

**[00178]** В определенных вариантах осуществления последующая доза ингибитора mTOR (например, рапамицина) или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата составляет

на приблизительно 0,5 мг, приблизительно 0,5 мг, приблизительно 0,6 мг, приблизительно 0,7 мг, приблизительно 0,8 мг, приблизительно 0,9 мг, приблизительно 1 мг, приблизительно 1,1 мг, приблизительно 1,2 мг, приблизительно 1,3 мг, приблизительно 1,4 мг, приблизительно 1,5 мг, приблизительно 1,6 мг, приблизительно 1,7 мг, приблизительно 1,8 мг, приблизительно 1,9 мг, приблизительно 2,0 мг, приблизительно 2,1 мг, приблизительно 2,2 мг, приблизительно 2,3 мг, приблизительно 2,4 мг, приблизительно 2,5 мг, приблизительно 2,5 мг, приблизительно 2,6 мг, приблизительно 2,7 мг, приблизительно 2,8 мг, приблизительно 2,9 мг, приблизительно 3,0 мг, приблизительно 3,5 мг, приблизительно 4,0 мг, приблизительно 4,5 мг, приблизительно 5 мг, приблизительно 6 мг, приблизительно 7 мг, приблизительно 8 мг, приблизительно 9 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 11 мг, приблизительно 12 мг, приблизительно 13 мг, приблизительно 14 мг, приблизительно 15 мг, приблизительно 16 мг, приблизительно 17 мг, приблизительно 18 мг, приблизительно 19 мг, приблизительно 20 мг или приблизительно 35 мг больше, чем начальная доза, или на приблизительно 0,05 мг/кг, приблизительно 0,06 мг/кг, приблизительно 0,07 мг/кг, приблизительно 0,08 мг/кг, приблизительно 0,09 мг/кг, приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,11 мг/кг, приблизительно 0,12 мг/кг, приблизительно 0,13 мг/кг, приблизительно 0,14 мг/кг, приблизительно 0,15 мг/кг, приблизительно 0,16 мг/кг, приблизительно 0,17 мг/кг, приблизительно 0,18 мг/кг, приблизительно 0,19 мг/кг, приблизительно 0,20 мг/кг, приблизительно 0,21 мг/кг, приблизительно 0,22 мг/кг, приблизительно 0,23 мг/кг, приблизительно 0,24 мг/кг, приблизительно 0,25 мг/кг, приблизительно 0,26 мг/кг, приблизительно 0,27 мг/кг, приблизительно 0,28 мг/кг, приблизительно 0,29 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 0,35 мг/кг, приблизительно 0,4 мг/кг, приблизительно 0,45 мг/кг или приблизительно 0,5 мг/кг больше, чем начальная доза ингибитора mTOR (например, рапамицина) или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата.

**[00179]** В определенных вариантах осуществления последующая доза ингибитора mTOR (например, рапамицина) или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата составляет на приблизительно 0,5 мг, приблизительно 0,5 мг, приблизительно 0,6 мг, приблизительно 0,7 мг, приблизительно 0,8 мг, приблизительно 0,9 мг, приблизительно 1 мг, приблизительно 1,1 мг, приблизительно 1,2 мг, приблизительно 1,3 мг, приблизительно 1,4 мг, приблизительно 1,5 мг, приблизительно 1,6 мг, приблизительно 1,7 мг, приблизительно 1,8 мг, приблизительно 1,9 мг, приблизительно 2,0 мг, приблизительно 2,1 мг, приблизительно 2,2 мг, приблизительно 2,3 мг, приблизительно

2,4 мг, приблизительно 2,5 мг, приблизительно 2,5 мг, приблизительно 2,6 мг, приблизительно 2,7 мг, приблизительно 2,8 мг, приблизительно 2,9 мг, приблизительно 3,0 мг, приблизительно 3,5 мг, приблизительно 4,0 мг, приблизительно 4,5 мг, приблизительно 5 мг, приблизительно 6 мг, приблизительно 7 мг, приблизительно 8 мг, приблизительно 9 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 11 мг, приблизительно 12 мг, приблизительно 13 мг, приблизительно 14 мг, приблизительно 15 мг, приблизительно 16 мг, приблизительно 17 мг, приблизительно 18 мг, приблизительно 19 мг, приблизительно 20 мг или приблизительно 35 мг меньше, чем начальная доза, или на приблизительно 0,05 мг/кг, приблизительно 0,06 мг/кг, приблизительно 0,07 мг/кг, приблизительно 0,08 мг/кг, приблизительно 0,09 мг/кг, приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,11 мг/кг, приблизительно 0,12 мг/кг, приблизительно 0,13 мг/кг, приблизительно 0,14 мг/кг, приблизительно 0,15 мг/кг, приблизительно 0,16 мг/кг, приблизительно 0,17 мг/кг, приблизительно 0,18 мг/кг, приблизительно 0,19 мг/кг, приблизительно 0,20 мг/кг, приблизительно 0,21 мг/кг, приблизительно 0,22 мг/кг, приблизительно 0,23 мг/кг, приблизительно 0,24 мг/кг, приблизительно 0,25 мг/кг, приблизительно 0,26 мг/кг, приблизительно 0,27 мг/кг, приблизительно 0,28 мг/кг, приблизительно 0,29 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 0,35 мг/кг, приблизительно 0,4 мг/кг, приблизительно 0,45 мг/кг или приблизительно 0,5 мг/кг меньше, чем начальная доза ингибитора mTOR (например, рапамицина) или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата.

## **6.5 Популяция пациентов**

**[00180]** Субъектами, получающими лечение в соответствии со способами, описанными в данном документе, могут являться любые млекопитающие, такие как грызуны и приматы, а в предпочтительном варианте осуществления человек.

**[00181]** В определенных вариантах осуществления субъект является зависимым от переливания крови.

**[00182]** В определенных вариантах осуществления субъект является независимым от переливания крови.

**[00183]** В определенных вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, могут применяться для лечения анемии, такой как анемия, ассоциированная с неэффективным эритропоезом или талассемией, у субъекта, описанного в данном документе.

**[00184]** В определенных вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, могут применяться для усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, описанного в данном документе.

**[00185]** В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, описанными в данном документе (см. раздел 6.3), имеется бета-талассемия. В определенных вариантах осуществления бета-талассемия представляет собой бета-талассемию, зависимую от переливания крови. Бета-талассемия, зависимая от переливания крови, также известна как "анемия Кули". В определенных вариантах осуществления бета-талассемия представляет собой большую бета-талассемию. В определенных вариантах осуществления бета-талассемия, зависимая от переливания крови, представляет собой большую бета-талассемию. В определенных вариантах осуществления бета-талассемия не является зависимой от переливания крови. В определенных вариантах осуществления бета-талассемия представляет собой промежуточную форму бета-талассемии. В определенных вариантах осуществления бета-талассемия, зависимая от переливания крови, не представляет собой промежуточную форму бета-талассемии. В определенных вариантах осуществления у субъекта имеется HbE/бета-талассемия. В определенных вариантах осуществления у субъекта имеется (i) большая бета-талассемия; (ii) имеется тяжелая форма HbE/бета-талассемии и (iii) зависимая от переливания крови форма. В определенных вариантах осуществления у субъекта имеется (i) промежуточная бета-талассемия; (ii) имеется легкая/умеренная HbE/бета-талассемия и (iii) не зависимая от переливания крови форма.

**[00186]** В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, описанными в данном документе (см. раздел 6.3), имеется бета-талассемия, зависимая от переливания крови. В определенных вариантах осуществления у субъекта была диагностирована бета-талассемия, зависимая от переливания крови. В определенных вариантах осуществления у субъекта были диагностированы бета-талассемия и гемоглобин E. В определенных вариантах осуществления диагноз был подтвержден генетическим анализом. В определенных вариантах осуществления бета-талассемия, зависимая от переливания крови, представляет собой большую бета-талассемию. В определенных вариантах осуществления бета-талассемия, зависимая от переливания крови, представляет собой большую бета-талассемию. В определенных вариантах осуществления субъект имеет генотип, предусматривающий гомозиготность или составную гетерозиготность по мутантному аллелю бета-глобина. В определенных вариантах осуществления гомозиготность предусматривает  $\beta^0/\beta^0$ , где  $\beta^0$  обозначает аллель,

ассоциированный с отсутствием синтеза цепи бета-глобина. В определенных вариантах осуществления гомозиготность предусматривает  $\beta^+/\beta^+$ , где  $\beta^+$  обозначает аллель, ассоциированный со сниженным синтезом цепи бета-глобина. В определенных вариантах осуществления составная гетерозиготность предусматривает  $\beta^0/\beta^+$ , где  $\beta^0$  обозначает аллель, ассоциированную с отсутствием синтеза цепи бета-глобина, и где  $\beta^+$  обозначает аллель, ассоциированный со сниженным синтезом цепи бета-глобина. В определенных вариантах осуществления составная гетерозиготность предусматривает  $\beta^0/\text{HbE}$ , где  $\beta^0$  обозначает аллель, ассоциированный с отсутствием синтеза цепи бета-глобина, и где HbE обозначает гемоглобин E. В определенных вариантах осуществления составная гетерозиготность предусматривает  $\beta^+/\text{HbE}$ , где  $\beta^+$  обозначает аллель, ассоциированный со сниженным синтезом цепи бета-глобина, и где HbE обозначает гемоглобин E. В определенных вариантах осуществления у субъекта имеется симптоматическая талассемия. В определенных вариантах осуществления у субъекта имеется сонаследственная дупликация гена альфа-глобина. В определенных вариантах осуществления у субъекта была диагностирована бета-талассемия, зависящая от переливания крови. В определенных вариантах осуществления диагноз был подтвержден с помощью генетического анализа. В определенных вариантах осуществления субъектом является человеческий младенец. В определенных вариантах осуществления у субъекта имеется наследственная персистенция фетального гемоглобина.

**[00187]** В определенных вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, могут применяться для лечения MDS и/или непролиферативного CMML у субъекта, описанного в данном документе.

**[00188]** В определенных вариантах осуществления анемия, подвергаемая лечению посредством способов, описанных в данном документе, представляет собой анемию, обусловленную осаждением белка, агрегацией белка и изменением конформации белка.

**[00189]** В определенном варианте осуществления способы, описанные в данном документе, могут применяться для лечения других гемоглобинопатий, таких как серповидноклеточная анемия.

**[00190]** В определенном варианте осуществления способы, описанные в данном документе, могут применяться для лечения любой анемии, которая является резистентной к любому средству, стимулирующему эритропоэз, или эритропоэтину (EPO).

**[00191]** В определенных вариантах осуществления процентная доля эритробластов у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, которые представляют собой кольцевидные сидеробласты, составляет по

меньшей мере 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или по меньшей мере 20%. В определенных вариантах осуществления процентная доля эритробластов у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, которые представляют собой кольцевидные сидеробласты, составляет по меньшей мере 15%. В определенных вариантах осуществления процентная доля эритробластов у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, которые представляют собой кольцевидные сидеробласты, составляет приблизительно 15%. В определенных вариантах осуществления процентная доля эритробластов у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, которые представляют собой кольцевидные сидеробласты, составляет от приблизительно 10% до приблизительно 20%. В определенных вариантах осуществления процентная доля эритробластов у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, которые представляют собой кольцевидные сидеробласты, составляет от приблизительно 12% до 17%. В определенных вариантах осуществления субъект, получающий лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, характеризуется соотношением кольцевидных сидеробластов и нормальных эритробластов, составляющим по меньшей мере 1:10, по меньшей мере 1:7 или по меньшей мере 1:5.

**[00192]** В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, имеется нарушение, связанное с кровью. В определенных вариантах осуществления нарушение, связанное с кровью, представляет собой анемию. В определенных вариантах осуществления нарушение, связанное с кровью, представляет собой анемию, требующую переливания крови. В определенных вариантах осуществления нарушение, связанное с кровью, представляет собой MDS. В определенных вариантах осуществления нарушение, связанное с кровью, представляет собой непролиферативный CMML.

**[00193]** В определенных вариантах осуществления субъект, получающий лечение в соответствии со способами, описанными в данном документе, может быть любого возраста. В определенных вариантах осуществления возраст субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, описанными в данном документе, составляет менее чем 18 лет. В конкретном варианте осуществления возраст субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, описанными в данном документе, составляет менее чем 13 лет. В другом конкретном варианте осуществления возраст субъекта, получающего лечение в

соответствии со способами, описанными в данном документе, составляет менее чем 12, менее чем 11, менее чем 10, менее чем 9, менее чем 8, менее чем 7, менее чем 6 или менее чем 5 лет. В другом конкретном варианте осуществления возраст субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, описанными в данном документе, составляет 1-3 года, 3-5 лет, 5-7 лет, 7-9 лет, 9-11 лет, 11-13 лет, 13-15 лет, 15-20 лет, 20-25 лет, 25-30 лет или более чем 30 лет. В другом конкретном варианте осуществления возраст субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, описанными в данном документе, составляет 30-35 лет, 35-40 лет, 40-45 лет, 45-50 лет, 50-55 лет, 55-60 лет или более чем 60 лет. В другом конкретном варианте осуществления возраст субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, описанными в данном документе, составляет 60-65 лет, 65-70 лет, 70-75 лет, 75-80 лет или более чем 80 лет.

**[00194]** В определенных вариантах осуществления субъекту необходимы регулярные пожизненные переливания эритроцитов. В определенных вариантах осуществления субъект характеризуется большой трансфузионной нагрузкой. В определенных вариантах осуществления высокая трансфузионная нагрузка составляет 12 или больше единиц эритроцитов за 24 недели до лечения в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе. В определенных вариантах осуществления субъект характеризуется низкой трансфузионной нагрузкой. В определенных вариантах осуществления низкая трансфузионная нагрузка составляет 7-12 единиц эритроцитов за 24 недели до лечения в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе.

**[00195]** В определенных вариантах осуществления у субъекта имеется одно или несколько клинических осложнений бета-талассемии, зависимой от переливания крови. Неограничивающие примеры клинических осложнений бета-талассемии, зависимой от переливания крови, включают задержку роста, бледность, желтуху, плохое развитие мышц, X-образное искривление ног, гепатоспленомегалию, язвы нижних конечностей, развитие масс из экстрамедуллярного гемопоэза и изменения скелета в результате увеличения костного мозга. В определенных вариантах осуществления у субъекта имеется одно или несколько осложнений от длительных переливаний эритроцитов. Неограничивающие примеры осложнений от длительных переливаний эритроцитов включают инфекции, ассоциированные с переливанием крови, такие как, например, инфекция, вызванная вирусом гепатита В, инфекция, вызванная вирусом гепатита С, и инфекция, вызванная вирусом иммунодефицита человека, аллоиммунизация и повреждение органов, обусловленное перенасыщением железом, такое как, например, повреждение печени, повреждение сердца и повреждение эндокринных желез.

**[00196]** В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, описанными в данном документе (см. раздел 6.3), имеется бета-талассемия, независимая от переливания крови. В определенных вариантах осуществления у субъекта была диагностирована бета-талассемия. В определенных вариантах осуществления у субъекта были диагностированы бета-талассемия и гемоглобин E. В определенных вариантах осуществления бета-талассемия была подтверждена посредством генетического анализа. В определенных вариантах осуществления бета-талассемия, независимая от переливания крови, представляет собой промежуточную форму бета-талассемии. В определенных вариантах осуществления бета-талассемия, независимая от переливания крови, представляет собой гемоглобин E/бета-талассемию от легкой до умеренной степени тяжести. В определенных вариантах осуществления бета-талассемия, независимая от переливания крови, не требует регулярного переливания эритроцитов. В определенных вариантах осуществления субъекту редко требуются переливания эритроцитов. В определенных вариантах осуществления бета-талассемия, независимая от переливания крови, требует регулярного переливания эритроцитов на более поздних этапах жизни. В определенных вариантах осуществления субъект получил 0–6 единиц эритроцитов в течение 24 недель до лечения в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе. В определенных вариантах осуществления субъект характеризуется средним исходным уровнем гемоглобина, составляющим менее чем 10,0 г/дл.

**[00197]** В определенных вариантах осуществления бета-талассемия представляет собой бета-талассемию, независимую от переливания крови. В определенных вариантах осуществления бета-талассемия представляет собой промежуточную форму бета-талассемии. В определенных вариантах осуществления бета-талассемия, зависимая от переливания крови, не представляет собой промежуточную форму бета-талассемии. В определенных вариантах осуществления субъект имеет генотип, предусматривающий составную гетерозиготность. В определенных вариантах осуществления составная гетерозиготность предусматривает аллель  $\beta^0$ , где  $\beta^0$  обозначает аллель, ассоциированную с отсутствием синтеза цепи бета-глобина. В определенных вариантах осуществления составная гетерозиготность предусматривает аллель  $\beta^+$ , где  $\beta^+$  обозначает аллель, ассоциированную со сниженным синтезом цепи бета-глобина. В определенных вариантах осуществления составная гетерозиготность предусматривает  $\beta^0/\beta^+$ , где  $\beta^0$  обозначает аллель, ассоциированную с отсутствием синтеза цепи бета-глобина, и где  $\beta^+$  обозначает аллель, ассоциированную со сниженным синтезом цепи бета-глобина. В определенных

вариантах осуществления составная гетерозиготность предусматривает один или несколько вариантов гемоглобина. В определенных вариантах осуществления вариант гемоглобина представляет собой гемоглобин E. В определенных вариантах осуществления субъект (i) имеет генотип, предусматривающий совместное наследование двух тяжелых мутаций цепи бета-глобина, и (ii) характеризуется наличием альфа-талассемии. В определенных вариантах осуществления субъект (i) имеет генотип, предусматривающий совместное наследование двух тяжелых мутаций цепи бета-глобина, и (ii) характеризуется наследственной персистенцией фетального гемоглобина. В определенных вариантах осуществления у субъекта имеется симптоматическая талассемия. В определенных вариантах осуществления у субъекта имеется сонаследственная дупликация гена альфа-глобина. В определенных вариантах осуществления у субъекта была диагностирована бета-талассемия. В определенных вариантах осуществления диагноз был подтвержден с помощью генетического анализа.

**[00198]** В определенных вариантах осуществления субъект демонстрирует одно или несколько клинических осложнений бета-талассемии, независимой от переливания крови. Неограничивающие примеры клинических осложнений бета-талассемии, независимой от переливания крови, включают эндокринные нарушения, такие как, например, сахарный диабет, гипотиреоз, гипогонадизм, тромботические явления, легочную гипертензию, гиперкоагуляцию, развитие зависимости от переливания крови на более поздних этапах жизни, неэффективный эритропоэз, увеличение гемопозитической ткани за пределами мозгового вещества костного мозга, образование масс экстрамедуллярного гемопоэза, деформации скелета, остеопению, остеопороз, боли в костях, камни в желчном пузыре и язвы нижних конечностей. В определенных вариантах осуществления субъект демонстрирует аллоиммунизацию.

**[00199]** В определенных вариантах осуществления субъект демонстрирует легкие симптомы бета-талассемии. В определенных вариантах осуществления субъект характеризуется почти нормальным ростом.

**[00200]** В определенных вариантах осуществления субъект с бета-талассемией, независимой от переливания крови, демонстрирует тяжелые симптомы. Неограничивающие примеры тяжелых симптомов включают задержку роста, задержку развития и деформации скелета.

**[00201]** В определенных вариантах осуществления у субъекта имеется спленомегалия. В определенных вариантах осуществления спленомегалия развивается в течение первых 6-12 месяцев жизни субъекта.

**[00202]** В определенных вариантах осуществления субъект характеризуется нарушением роста в течение первых 10 лет жизни субъекта.

**[00203]** В определенных вариантах осуществления субъект демонстрирует наличие микроцитарной гипохромной анемии. В определенных вариантах осуществления уровни гемоглобина A2 у субъекта до лечения субъекта в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, являются повышенными по сравнению с уровнями гемоглобина A2 в эталонной популяции (например, эталонной популяции, описанной в разделе 6.9). В определенных вариантах осуществления уровни фетального гемоглобина у субъекта до лечения субъекта в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, являются повышенными по сравнению с уровнями фетального гемоглобина в эталонной популяции (например, эталонной популяции, описанной в разделе 6.9).

**[00204]** В определенных вариантах осуществления у субъекта не экспрессируется гемоглобин S.

**[00205]** В определенных вариантах осуществления у субъекта не экспрессируется гемоглобин S. В определенных вариантах осуществления субъект не получал переливаний эритроцитов в пределах 12 недель до лечения в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе (см. раздел 6.3), при этом у субъекта имеется бета-талассемия, независимая от переливания крови. В определенных вариантах осуществления субъект не характеризуется наличием активной инфекции, вызванной вирусом гепатита C. В определенных вариантах осуществления субъект не характеризуется наличием активной инфекции, вызванной вирусом гепатита B. В определенных вариантах осуществления субъект не является положительным в отношении вируса иммунодефицита человека. В определенных вариантах осуществления субъект не характеризуется наличием инсулинозависимого диабета. В определенных вариантах осуществления субъекту не вводилось средство, стимулирующее эритропоэз, в пределах 3 месяцев до лечения в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе. В определенных вариантах осуществления субъект не подвергался терапии, предусматривающей хелатирование железа, в пределах 168 дней до лечения в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе. В определенных вариантах осуществления субъект не подвергался лечению гидроксимочевинной в пределах 168 дней до лечения в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе. В определенных вариантах осуществления субъекту не вводились бисфосфонаты в пределах 168 дней до лечения в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе. В определенных вариантах осуществления субъект не характеризуется наличием

неконтролируемой гипертензии. Неконтролируемая гипертензия относится к > 1 степени в соответствии с NCI CTCAE версии 4.0. В определенных вариантах осуществления субъект не характеризуется наличием заболевания печени с показателем АЛТ выше, чем таковой, 3-кратно превышающий верхнюю границу нормы. В определенных вариантах осуществления субъект не характеризуется наличием заболевания печени с патоморфологическими признаками цирроза/фиброза печени, определенными посредством биопсии печени. В определенных вариантах осуществления субъект не характеризуется наличием заболевания сердца. Заболевание сердца или сердечная недостаточность могут относиться к 3 классификационной группе или выше согласно классификации Нью-Йоркской ассоциации кардиологов. В определенных вариантах осуществления субъект не характеризуется наличием аритмии, требующей лечения. В определенных вариантах осуществления субъект не характеризуется наличием заболевания легких. Неограничивающие примеры заболевания легких включают фиброз легких и легочную гипертензию. В определенных вариантах осуществления субъект не характеризуется показателем клиренса креатинина, составляющим менее чем 60 мл/мин, как определено посредством способа Кокрофта-Голта. В определенных вариантах осуществления субъект не характеризуется наличием дефицита фолиевой кислоты. В определенных вариантах осуществления субъект не характеризуется наличием протеинурии 3 степени или выше. В определенных вариантах осуществления субъект не характеризуется наличием надпочечниковой недостаточности. В определенных вариантах осуществления субъект не подвергался серьезному хирургическому вмешательству в пределах 30 дней до лечения в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, за исключением случаев, где серьезное хирургическое вмешательство представляет собой спленэктомию. В определенных вариантах осуществления субъект не характеризуется наличием в анамнезе тяжелых аллергических или анафилактических реакций или гиперчувствительностью к рекомбинантным белкам. В определенных вариантах осуществления субъект не подвергался долгосрочной терапии антикоагулянтами. Неограничивающие примеры терапии антикоагулянтами включают гепарин и варфарин. В определенных вариантах осуществления субъект не подвергается лечению с помощью цитотоксических средств, системных кортикостероидов, иммуносупрессоров или терапии антикоагулянтами в пределах 28 дней до лечения в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе.

**[00206]** В определенных вариантах осуществления субъект подвергается другим лечебным вмешательствам. Неограничивающие примеры других лечебных вмешательств

включают спленэктомию, трансфузионную терапию, терапию, предусматривающую хелатирование железа, и средства, индуцирующие выработку фетального гемоглобина. В определенных вариантах осуществления субъекту требуется терапия, предусматривающая хелатирование железа. См. раздел 6.3.1 для описания видов комбинированной терапии.

**[00207]** В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе (см. раздел 6.3), был диагностирован MDS, определенный согласно IPSS-R. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, был диагностирован MDS, определенный согласно IPSS-R, и по меньшей мере 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или по меньшей мере 20% эритробластов у субъекта представляют собой кольцевидные сидеробласты. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере 15% эритробластов у субъекта представляют собой кольцевидные сидеробласты.

**[00208]** IPSS-R обозначает пересмотренную Международную прогностическую балльную систему, которая используется при оценке прогноза при миелодиспластических синдромах. См., например, Greenberg et al., 2012, Blood 120(12):2454-2465 и Erratum in Blood, 1998; 91:1100. В IPSS-R используется система балльной оценки критериев для характеристики исходов для пациента с миелодиспластическим синдромом как относящихся к группе очень низкого риска (показатель меньше или равен 1,5 балла; средняя выживаемость 8,8 года), низкого риска (показатель больше 1,5 балла, меньше или равен 3 баллам; средняя выживаемость 5,3 года); промежуточного риска (показатель больше 3 баллов, меньше или равен 4,5 балла; средняя выживаемость 3 года); высокого риска (показатель больше 4,5 балла, меньше или равен 6 баллам; средняя выживаемость 1,6 года) или очень высокого риска (показатель больше 6 баллов; средняя выживаемость 0,8 года). В системе балльной оценки оценивается, среди прочего, (i) процентная доля бластов костного мозга у субъекта; (ii) кариотип субъекта и (iii) цитопении у субъекта (определенные как концентрация гемоглобина, составляющая менее чем 10 г/дл, абсолютное количество нейтрофилов, составляющее менее чем 1800/мкл, и количество тромбоцитов, составляющее менее чем 100000/мкл).

**[00209]** В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе (см. раздел 6.3), был диагностирован непролиферативный CMML. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, был диагностирован непролиферативный CMML и по меньшей мере 10%, 11%,

12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или по меньшей мере 20% эритробластов у субъекта представляют собой кольцевидные сидеробласты.

**[00210]** В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе (см. раздел 6.3), имеется MDS. В определенных вариантах осуществления MDS представляет собой MDS, определенный согласно IPSS как относящийся к группе низкого риска. В определенных вариантах осуществления MDS представляет собой MDS, определенный согласно IPSS как относящийся к группе промежуточного-1 риска. В определенных вариантах осуществления MDS представляет собой MDS, определенный согласно IPSS как относящийся к группе промежуточного-2 риска. В определенных вариантах осуществления MDS представляет собой MDS, определенный согласно IPSS как относящийся к группе высокого риска. В определенных вариантах осуществления MDS представляет собой MDS, определенный согласно IPSS-R как относящийся к группе очень низкого риска. В определенных вариантах осуществления MDS представляет собой MDS, определенный согласно IPSS-R как относящийся к группе низкого риска. В определенных вариантах осуществления MDS представляет собой MDS, определенный согласно IPSS-R как относящийся к группе промежуточного риска. В определенных вариантах осуществления MDS представляет собой MDS, определенный согласно IPSS-R как относящийся к группе высокого риска. В определенных вариантах осуществления MDS представляет собой MDS, определенный согласно IPSS-R как относящийся к группе очень высокого риска. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется MDS и (ii) имеется RARS. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется MDS и (ii) имеется RCMD-RS. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется MDS, (ii) имеется RARS и (iii) имеется RCMD-RS. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется MDS и (ii) по меньшей мере 15% эритробластов у субъекта представляют собой кольцевидные сидеробласты. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется MDS, (ii) имеется RARS и (iii) по меньшей мере 15% эритробластов у субъекта представляют собой кольцевидные сидеробласты. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего

лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется MDS, (ii) имеется RCMD-RS и (iii) по меньшей мере 15% эритробластов у субъекта представляют собой кольцевидные сидеробласты. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется MDS, (ii) имеется RARS, (iii) имеется RCMD-RS и (iv) по меньшей мере 15% эритробластов у субъекта представляют собой кольцевидные сидеробласты. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется MDS, (ii) имеется RARS и (iii) экспрессируется SF3B1 с одной или несколькими мутациями. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется MDS, (ii) имеется RCMD-RS и (iii) экспрессируется SF3B1 с одной или несколькими мутациями. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется MDS, (ii) имеется RARS, (iii) имеется RCMD-RS и (iv) экспрессируется SF3B1 с одной или несколькими мутациями. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется MDS, (ii) по меньшей мере 15% эритробластов у субъекта представляют собой кольцевидные сидеробласты и (iii) экспрессируется SF3B1 с одной или несколькими мутациями. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется MDS, (ii) имеется RARS, (iii) по меньшей мере 15% эритробластов у субъекта представляют собой кольцевидные сидеробласты и (iv) экспрессируется SF3B1 с одной или несколькими мутациями. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется MDS, (ii) имеется RARS, (iii) по меньшей мере 15% эритробластов у субъекта представляют собой кольцевидные сидеробласты и (iv) экспрессируется SF3B1 с одной или несколькими мутациями. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется MDS, (ii) имеется RARS, (iii) имеется RCMD-RS, (iv) по меньшей мере 15% эритробластов у субъекта представляют собой кольцевидные сидеробласты и (v) экспрессируется SF3B1 с одной или несколькими мутациями.

**[00211]** В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе (см. раздел 6.3), имеется непролиферативный CMML. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется непролиферативный CMML и (ii) имеется RARS. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется непролиферативный CMML и (ii) имеется RCMD-RS. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется непролиферативный CMML, (ii) имеется RARS и (iii) имеется RCMD-RS. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется непролиферативный CMML и (ii) по меньшей мере 15% эритробластов у субъекта представляют собой кольцевидные сидеробласты. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется непролиферативный CMML, (ii) имеется RARS и (iii) по меньшей мере 15% эритробластов у субъекта представляют собой кольцевидные сидеробласты. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется непролиферативный CMML, (ii) имеется RCMD-RS и (iii) по меньшей мере 15% эритробластов у субъекта представляют собой кольцевидные сидеробласты. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется непролиферативный CMML, (ii) имеется RARS, (iii) имеется RCMD-RS и (iv) по меньшей мере 15% эритробластов у субъекта представляют собой кольцевидные сидеробласты. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется непролиферативный CMML и (ii) экспрессируется SF3B1 с одной или несколькими мутациями. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется непролиферативный CMML, (ii) имеется RARS и (iii) экспрессируется SF3B1 с одной или несколькими мутациями. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется непролиферативный CMML, (ii) имеется RCMD-RS и (iii) экспрессируется SF3B1 с одной или несколькими мутациями. В

определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется непролиферативный CMML, (ii) имеется RARS, (iii) имеется RCMD-RS и (iv) экспрессируется SF3B1 с одной или несколькими мутациями. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется непролиферативный CMML, (ii) по меньшей мере 15% эритробластов у субъекта представляют собой кольцевидные сидеробласты и (iii) экспрессируется SF3B1 с одной или несколькими мутациями. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется непролиферативный CMML, (ii) имеется RARS, (iii) по меньшей мере 15% эритробластов у субъекта представляют собой кольцевидные сидеробласты и (iv) экспрессируется SF3B1 с одной или несколькими мутациями. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется непролиферативный CMML, (ii) имеется RCMD-RS, (iii) по меньшей мере 15% эритробластов у субъекта представляют собой кольцевидные сидеробласты и (iv) экспрессируется SF3B1 с одной или несколькими мутациями. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, (i) имеется непролиферативный CMML, (ii) имеется RARS, (iii) имеется RCMD-RS, (iv) по меньшей мере 15% эритробластов у субъекта представляют собой кольцевидные сидеробласты и (v) экспрессируется SF3B1 с одной или несколькими мутациями.

**[00212]** В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе (см. раздел 6.3), экспрессируется ген с мутацией, ассоциированной с неэффективным эритропозом. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, экспрессируется один или несколько генов фактора сплайсинга, содержащих одну или несколько мутаций. В конкретном варианте осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, экспрессируется SF3B1 с одной или несколькими мутациями. В определенных вариантах осуществления одна или несколько мутаций располагаются в некодирующей области. В определенных вариантах осуществления SF3B1 представляет собой ген, кодирующий SB3B1. В определенных вариантах осуществления одна или несколько мутаций располагаются в кодирующей

области. В определенных вариантах осуществления SF3B1 представляет собой белок SF3B1. В определенных вариантах осуществления одна или несколько мутаций в белке SF3B1 выбраны из группы, состоящей из E622D, R625C, H662Q, H662D, K66N, K666T, K666Q, K666E, A672D, K700E, I704N. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, экспрессируется белок SF3B1 с мутацией E622D. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, экспрессируется белок SF3B1 с мутацией R625C. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, экспрессируется белок SF3B1 с мутацией H662Q. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, экспрессируется белок SF3B1 с мутацией H662D. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, экспрессируется белок SF3B1 с мутацией K66N. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, экспрессируется белок SF3B1 с мутацией K666T. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, экспрессируется белок SF3B1 с мутацией K666Q. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, экспрессируется белок SF3B1 с мутацией K666E. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, экспрессируется белок SF3B1 с мутацией A672D. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, экспрессируется SF3B1 с мутацией K700E. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, экспрессируется белок SF3B1 с мутацией I704N. В конкретном варианте осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, экспрессируется SRSF2 с одной или несколькими мутациями. В конкретном варианте осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, экспрессируется DNMT3A с одной или несколькими мутациями. В конкретном варианте

осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, экспрессируется TET2 с одной или несколькими мутациями. В конкретном варианте осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, экспрессируется SETBP1 с одной или несколькими мутациями.

**[00213]** В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе (см. раздел 6.3), имеется тромбоцитопения. В определенных вариантах осуществления субъект, получающий лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, характеризуется менее чем  $1 \times 10^{11}$  тромбоцитов на литр. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, имеется нейтропения. В определенных вариантах осуществления субъект, получающий лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, характеризуется абсолютным количеством нейтрофилов, составляющим менее чем  $1 \times 10^9$  на литр.

**[00214]** В определенных вариантах осуществления субъект, получающий лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, характеризуется менее чем 13000 лейкоцитов на мкл, менее чем 12000 лейкоцитов на мкл, менее чем 11000 лейкоцитов на мкл, менее чем 10000 лейкоцитов на мкл, менее чем 7500 лейкоцитов на мкл или менее чем 500 лейкоцитов на мкл.

**[00215]** В определенных вариантах осуществления уровни гемоглобина у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, составляют менее чем 10 г/дл, 9 г/дл, 8 г/дл или 7 г/дл. В определенных вариантах осуществления уровни гемоглобина у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, составляют от 7 г/дл до 7,5 г/дл, от 7,5 г/дл до 8 г/дл, от 8 г/дл до 8,5 г/дл, от 8,5 г/дл до 9,0 г/дл, от 9,0 г/дл до 9,5 г/дл или от 9,5 г/дл до 10,0 г/дл.

**[00216]** В определенных вариантах осуществления субъект, получающий лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе (см. раздел 6.3), характеризуется низкой трансфузионной нагрузкой. В определенных вариантах осуществления субъекту с низкой трансфузионной нагрузкой, получающему лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, необходимо не более чем 0, 1, 2 или 3 единицы эритроцитов за 8 недель. В определенных вариантах осуществления субъект, получающий лечение в соответствии со способами,

предусмотренными в данном документе (см. раздел 6.3), характеризуется высокой трансфузионной нагрузкой. В определенных вариантах осуществления субъекту с высокой трансфузионной нагрузкой, получающему лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, необходимо по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 единиц эритроцитов за 8 недель.

**[00217]** В определенных вариантах осуществления субъект, получающий лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, характеризуется отсутствием ответа, утратой ответа или низкой вероятностью ответа на одно или несколько ESA.

**[00218]** В определенных вариантах осуществления субъект, получающий лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе (см. раздел 6.3), ранее подвергался лечению одним или несколькими ESA или в настоящее время подвергается лечению одним или несколькими ESA. В определенных вариантах осуществления субъект, получающий лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, ранее подвергался лечению гипометилирующими средствами. В определенных вариантах осуществления субъект, получающий лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, ранее подвергался лечению леналидомидом. В определенных вариантах осуществления субъект, получающий лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, не подвергался лечению азациитидином, децитабином, ESA, G-CSF, GM-CSG или леналидомидом. В определенных вариантах осуществления субъект, получающий лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, не отвечает на лечение одним или несколькими ESA. В определенных вариантах осуществления субъект, получающий лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, является рефрактерным в отношении лечения одним или несколькими ESA. В определенных вариантах осуществления субъект, получающий лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, становится рефрактерным в отношении лечения одним или несколькими ESA. В определенных вариантах осуществления субъект, получающий лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, является рефрактерным в отношении предшествующего лечения ESA. В определенных вариантах осуществления субъект, получающий лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, представляет собой субъекта, который является рефрактерным в отношении предшествующего лечения с помощью ESA, характеризуется зарегистрированным отсутствием ответа или ответом, который больше не

поддерживается с помощью предшествующего режима лечения, предусматривающего ESA, либо в качестве монотерапии, либо в комбинации (например, с G-CSF); режим, предусматривающий ESA, должен был представлять собой (а) рекомбинантный человеческий эритропоэтин в дозе более чем 40000 МЕ/неделя в количестве по меньшей мере 8 доз или эквивалент, или (b) дарбэпоэтин-альфа в дозе более чем 500 мкг один раз в три недели в количестве по меньшей мере 4 доз или эквивалент. В определенных вариантах осуществления субъект, получающий лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, характеризуется непереносимостью в отношении предшествующего лечения с помощью ESA. В определенных вариантах осуществления субъект, получающий лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, представляет собой субъекта, который характеризуется непереносимостью в отношении предшествующего лечения с помощью ESA, характеризуется зарегистрированным прекращением предшествующего режима лечения, предусматривающего ESA, либо в качестве монотерапии, либо в комбинации (например, с G-CSF), в любой момент времени после начала лечения вследствие непереносимости или нежелательного явления. В определенных вариантах осуществления субъекту, получающему лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, не подходит для ESA. В определенных вариантах осуществления субъект, получающий лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, представляет собой субъекта, который не подходит для ESA, характеризуется низкой вероятностью ответа на ESA на основании уровня эндогенного эритропоэтина в сыворотке крови, составляющего более чем 200 Ед/л, для субъектов, ранее не подвергавшихся лечению с помощью ESA.

**[00219]** В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, описанными в данном документе (см. раздел 6.3), имеется MDS. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, описанными в данном документе, имеется MDS и интактная хромосома 5q. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, имеется MDS, интактная хромосома 5q и отсутствует зарегистрированное отсутствие эффекта от лечения леналидомидом. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, имеется MDS, интактная хромосома 5q и зарегистрированное отсутствие эффекта от лечения леналидомидом. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего

лечение в соответствии со способами описанными в данном документе, имеется MDS с делецией в хромосоме 5q. MDS с делецией в хромосоме 5q предусматривает делецию длинного плеча хромосомы 5 и характеризуется, среди прочего, макроцитарной анемией с овальными макроцитами, количеством лейкоцитов от нормального до слегка сниженного, количеством тромбоцитов от нормального до повышенного и менее чем 5% бластов в костном мозге и крови. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, имеется MDS с делецией в хромосоме 5q и отсутствует зарегистрированное отсутствие эффекта от лечения леналидомидом. В определенных вариантах осуществления у субъекта, получающего лечение в соответствии со способами, предусмотренными в данном документе, имеется MDS с делецией в хромосоме 5q и зарегистрированное отсутствие эффекта от лечения леналидомидом. В определенных вариантах осуществления отсутствие эффекта от лечения леналидомидом предусматривает утрату ответа на леналидомид, отсутствие ответа на леналидомид через 4 месяца лечения леналидомидом, непереносимость лечения леналидомидом или цитопению, препятствующую лечению леналидомидом.

#### **6.6 Фармацевтические композиции**

[00220] В определенных вариантах осуществления лиганды-ловушки ActRIIB и ингибиторы mTOR составлены так, чтобы они подходили для комбинированного лечения, описанного в данном документе.

[00221] В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушка ActRIIB и ингибитор mTOR составлены вместе с фармацевтически приемлемым носителем для применения со способами, описанными в данном документе.

[00222] В определенных вариантах осуществления лиганды-ловушки ActRIIB и ингибиторы mTOR составлены вместе для парентерального введения.

[00223] В определенных вариантах осуществления лиганды-ловушки ActRIIB и ингибиторы mTOR составлены вместе для подкожного введения.

[00224] В определенных вариантах осуществления лиганды-ловушки ActRIIB составлены с фармацевтически приемлемым носителем для применения со способами, описанными в данном документе.

[00225] В предпочтительном варианте осуществления лиганд-ловушка ActRIIB составлен для подкожного введения.

[00226] В другом предпочтительном варианте осуществления лиганд-ловушка ActRIIB упакован в контейнер в виде стерильного лиофилизированного порошка или массы без

консервантов. В определенных вариантах осуществления контейнер содержит 25 мг лиганда-ловушки ActRIIB. В определенных вариантах осуществления контейнер, содержащий 25 мг лиганда-ловушки ActRIIB, содержит всего 37,5 мг белка. В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушку ActRIIB в контейнере, содержащем 25 мг лиганда-ловушки ActRIIB, восстанавливают с помощью 0,68 мл воды для инъекций. В определенных вариантах осуществления контейнер содержит 75 мг лиганда-ловушки ActRIIB. В определенных вариантах осуществления контейнер, содержащий 75 мг лиганда-ловушки ActRIIB, содержит всего 87,5 мг белка. В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушку ActRIIB в контейнере, содержащем 75 мг лиганда-ловушки ActRIIB, восстанавливают с помощью 1,6 мл воды для инъекций. В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушку ActRIIB в контейнере восстанавливают с помощью объема воды для инъекций таким образом, чтобы конечная концентрация восстановленного лиганда-ловушки ActRIIB в воде для инъекций составляла 50 мг/мл при pH примерно 6,5. В определенных вариантах осуществления контейнер хранится при температуре от 2°C до 8°C. В определенных вариантах осуществления контейнер представляет собой стеклянный флакон объемом 3 мл с серой пробкой с бутиловым покрытием.

**[00227]** В определенных вариантах осуществления терапевтические способы, предусмотренные в данном документе, включают введение композиции (содержащей лиганд-ловушку ActRIIB) системно или местно в виде имплантата или устройства. При введении терапевтическая композиция для путей применения, предусмотренных в данном документе, находится в апирогенной, физиологически приемлемой форме. Терапевтически применимые средства, отличные от лиганда-ловушки ActRIIB, которые также могут быть необязательно включены в композицию, описанную выше, можно вводить одновременно или последовательно с рассматриваемыми соединениями (например, лигандом-ловушкой ActRIIB, см. раздел 6.7)).

**[00228]** В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушку ActRIIB вводят парентерально. В предпочтительном варианте осуществления лиганд-ловушку ActRIIB вводят подкожно. Фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, могут содержать один или несколько полипептидов ActRIIB в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями, или эмульсиями, или стерильными порошками, которые могут быть преобразованы в стерильные инъекционные растворы или дисперсии непосредственно перед применением, которые могут содержать

антиоксиданты, буферы, бактериостаты, растворенные вещества, которые делают состав изотоническим с кровью предполагаемого реципиента, или суспендирующие или загущающие средства. Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно применять в фармацевтических композициях для применения в способах, описанных в данном документе, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет применения материалов для нанесения покрытия, таких как лецитин, за счет поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий и за счет применения поверхностно-активных веществ.

**[00229]** Композиции, описанные в данном документе, также могут содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие средства, эмульгаторы и диспергирующие средства. Предупреждение действия микроорганизмов может быть обеспечено включением в состав различных противобактериальных и противогрибковых средств, например, парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т. п. Также может быть желательным включение в композиции изотонических средств, таких как сахара, хлорид натрия и т. п. Кроме того, пролонгированная абсорбция инъецируемой фармацевтической формы может быть вызвана включением средств, которые замедляют абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

**[00230]** Понятно, что режим введения доз будет определяться лечащим врачом с учетом различных факторов, которые модифицируют действие соединений, описанных в данном документе (например, лиганда-ловушки ActRIIB (см. раздел 6.7)).

**[00231]** В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушка ActRIIB является по сути чистым в фармацевтической композиции. В частности, не более чем 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,1% или не более чем 0,05% соединений в фармацевтической композиции представляют собой соединения, отличные от лиганда-ловушки ActRIIB и фармацевтически приемлемого носителя.

**[00232]** В определенных вариантах осуществления ингибиторы mTOR (например, рапамицин) составлены с фармацевтически приемлемым носителем для применения со способами, описанными в данном документе.

**[00233]** В предпочтительном варианте осуществления ингибитор mTOR (например, рапамицин) составлен для перорального введения.

**[00234]** В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR (например, рапамицин) составлен для парентерального введения. В другом предпочтительном варианте осуществления ингибитор mTOR (например, рапамицин) упакован в контейнер в виде стерильного лиофилизированного порошка или массы без консервантов.

**[00235]** В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR (например, рапамицин) находится в форме капсулы или таблетки. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR (например, рапамицин) находится в форме микротаблеток или микропеллет, при этом микротаблетки или микропеллеты имеют кишечнорастворимое покрытие. В определенных вариантах осуществления микротаблетки или микропеллеты содержатся в капсуле.

## **6.7 Лиганд-ловушка ActRIIB**

**[00236]** В определенных вариантах осуществления лиганды-ловушки ActRIIB, описанные в данном разделе, могут применяться в способах, предусмотренных в данном документе (см. раздел 6.3). В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушка ActRIIB для применения в способах по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:11. В определенных вариантах осуществления лиганд-ловушка ActRIIB для применения в способах по настоящему изобретению представляет собой продукт, полученный в результате экспрессии из открытой рамки считывания с нуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO:34 или вырожденной версией SEQ ID NO:34, которая кодирует SEQ ID NO:11.

**[00237]** Как используется в данном документе, термин "ActRIIB" обозначает семейство белков рецептора активина типа IIB (ActRIIB) из любых видов и варианты, полученные из таких белков ActRIIB путем мутагенеза или другой модификации. Ссылка на ActRIIB в данном документе понимается как ссылка на любую из идентифицированных в настоящее время форм рецептора. Как правило, члены семейства ActRIIB представляют собой трансмембранные белки, состоящие из лиганд-связывающего внеклеточного домена с богатой на цистеин областью, трансмембранного домена и цитоплазматического домена с предполагаемой активностью серин-/треонинкиназы.

**[00238]** Лиганды-ловушки ActRIIB, применяемые в композициях и способах, описанных в данном документе, включают без ограничения активин-связывающие растворимые полипептиды ActRIIB; антитела, которые связываются с активином (в частности, с субъединицами активина А или В, также называемыми бета-А или бета-В) и нарушают связывание ActRIIB; антитела, которые связываются с ActRIIB и нарушают связывание активина; белки, не принадлежащие к антителам, выбранные для связывания активина или

ActRIIB; и рандомизированные пептиды, выбранные для связывания активина или ActRIIB, которые могут конъюгироваться с Fc-доменом.

**[00239]** В определенных вариантах осуществления два или более разных белка (или другие фрагменты) с активностью связывания активина или ActRIIB, особенно связывающие активин, которые блокируют участки связывания типа I (например, растворимый рецептор активина типа I) и типа II (например, растворимый рецептор активина типа II) соответственно, можно связывать вместе с созданием бифункциональной или многофункциональной связывающей молекулы, которая ингибирует ActRIIB, и таким образом могут применяться в композициях и способах, описанных в данном документе. В определенных вариантах осуществления антагонисты сигнальной оси активин-ActRIIB, которые ингибируют ActRIIB, включают аптамеры нуклеиновых кислот, малые молекулы и другие средства, используемые в композициях и способах, включая описанные в данном документе.

**[00240]** Такие лиганды-ловушки ActRIIB можно создавать и модифицировать, как описано ранее в разделе 5.5.2 Международной публикации № WO 2014/066486, которая включена в данный документ во всей своей полноте.

**(a) Лиганды-ловушки ActRIIB, содержащие антитела к ActRIIB**

**[00241]** В определенных вариантах осуществления лиганды-ловушки ActRIIB, подлежащие применению в композициях и способах, описанных в данном документе, включают антитела, которые связываются с активинем (в частности с субъединицами активина A или B) и нарушают связывание ActRIIB.

**(b) Лиганды-ловушки ActRIIB, содержащие полипептиды ActRIIB**

**[00242]** Как используется в данном документе, термин "полипептид ActRIIB" обозначает полипептиды, содержащие любой встречающийся в природе полипептид члена семейства ActRIIB, а также любые его варианты (включая мутанты, фрагменты, гибриды и пептидомиметические формы), которые сохраняют полезную активность. Например, полипептиды ActRIIB включают полипептиды, полученные из последовательности любого известного рецептора ActRIIB, имеющего последовательность, на по меньшей мере приблизительно 80% идентичную последовательности полипептида ActRIIB, и необязательно с идентичностью, составляющей по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или выше. Например, полипептид ActRIIB может связываться с белком ActRIIB и/или активинем и ингибировать их функцию. Пример полипептида ActRIIB включает полипептид-предшественник человеческого ActRIIB (SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14). Что касается полипептида-предшественника ActRIIB, аминокислотная

последовательность которого представлена как SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14 (т. е. полипептида-предшественника человеческого ActRIIB), то сигнальный пептид полипептида-предшественника ActRIIB расположен в аминокислотах 1-18; внеклеточный домен расположен в аминокислотах 19-134, а потенциальные участки N-связанного гликозилирования расположены в аминокислотных положениях 42 и 65. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид-предшественник человеческого ActRIIB под SEQ ID NO:2, раскрыта как SEQ ID NO:5 (SEQ ID NO:5 содержит аланин в кодоне, соответствующем аминокислотному положению 64, но может быть легко модифицирована специалистом в данной области с применением способов, известных из уровня техники, с получением вместо этого аргинина в кодоне, соответствующем аминокислотному положению 64). В отношении описания последовательностей см. таблицу 1.

**[00243]** Нумерация аминокислот для всех описанных в данном документе полипептидов, родственных ActRIIB, основана на нумерации аминокислот для SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:14 (которые отличаются только аминокислотой, экспрессируемой в положении 64), если конкретно не указано иное. Например, если полипептид ActRIIB описан как содержащий замену/мутацию в аминокислотном положении 79, то следует понимать, что положение 79 обозначает 79-ю аминокислоту в SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14, из которых получен полипептид ActRIIB. Аналогичным образом, если полипептид ActRIIB описан как содержащий аланин или аргинин в аминокислотном положении 64, то следует понимать, что положение 64 обозначает 64-ю аминокислоту в SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14, из которых получен полипептид ActRIIB.

**[00244]** В определенных вариантах осуществления лиганды-ловушки ActRIIB, применяемые в композициях и способах, описанных в данном документе, содержат полипептиды, содержащие активин-связывающий домен ActRIIB. В определенных вариантах осуществления активин-связывающие домены ActRIIB содержат внеклеточный домен ActRIIB или его часть. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный домен или его часть ActRIIB являются растворимыми. Иллюстративные модифицированные формы полипептидов ActRIIB раскрыты в публикациях заявок на патенты США №№ 20090005308 и 20100068215, описания которых включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

**[00245]** В конкретных вариантах осуществления лиганды-ловушки ActRIIB, применяемые в композициях и способах, описанных в данном документе, представляют собой растворимые полипептиды ActRIIB. Термин "растворимый полипептид ActRIIB"

обычно обозначает полипептиды, содержащие внеклеточный домен белка ActRIIB, включая любой встречающийся в природе внеклеточный домен белка ActRIIB, а также любые его варианты (включая мутанты, фрагменты и пептидомиметические формы). Растворимые полипептиды ActRIIB могут связываться с активином; однако белок ActRIIB дикого типа не проявляет значительной селективности в связывании с активином по сравнению с GDF8/11. В определенных вариантах осуществления в способах, представленных в данном документе, могут применяться измененные формы ActRIIB с другими свойствами связывания. Такие измененные формы раскрыты, например, в публикациях международных заявок на патенты №№ WO 2006/012627 и WO 2010/019261, описания которых включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте. Нативным или измененным белкам ActRIIB можно придать дополнительную специфичность в отношении активина путем связывания их со вторым активин-селективным связывающим средством. Иллюстративные растворимые полипептиды ActRIIB включают внеклеточный домен полипептида человеческого ActRIIB (например, SEQ ID NO: 3, 4, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28 и 29).

**[00246]** Слитый белок Fc, имеющий внеклеточную последовательность ActRIIB, раскрытую Hilden et al. (Blood, 1994, 83(8):2163-70), которая содержит аланин в положении, соответствующем аминокислоте 64 аминокислотной последовательности предшественника ActRIIB, т. е. SEQ ID NO:2 (обозначенная в данном документе как "A64"), как было продемонстрировано, обладает относительно низкой аффинностью в отношении активина и GDF-11. Напротив, слитый белок Fc с аргинином в положении 64 аминокислотной последовательности предшественника ActRIIB (обозначенный в данном документе как "R64") обладает аффинностью в отношении активина и GDF-11 в диапазоне от низких наномолярных до высоких пикомолярных значений (см., например, публикацию заявки на патент США № 20100068215, раскрытие которой включено в данный документ во всей своей полноте). Аминокислотная последовательность предшественника ActRIIB с аргинином в положении 64 представлена под SEQ ID NO:14. Таким образом, в определенных вариантах осуществления полипептиды ActRIIB, применяемые в соответствии с композициями и способами, описанными в данном документе, могут содержать либо (i) аланин в положении, соответствующем аминокислоте 64 аминокислотной последовательности предшественника ActRIIB, т. е. SEQ ID NO:2; либо (ii) аргинин в положении 64 аминокислотной последовательности предшественника ActRIIB, т. е. SEQ ID NO: 14. В других вариантах осуществления полипептиды ActRIIB, применяемые в соответствии с композициями и способами, описанными в данном

документе, могут содержать аминокислоту, которая не является аланином или аргинином, в положении, соответствующем аминокислоте 64 аминокислотной последовательности предшественника ActRIIB, т. е. SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO:14.

**[00247]** Было показано, что делеция пролинового узла на С-конце внеклеточного домена ActRIIB снижает сродство рецептора к активину (см., например, Attisano et al., Cell, 1992, 68(1):97-108). Слитый белок ActRIIB-Fc, содержащий аминокислоты 20-119 из SEQ ID NO: 14 (т. е. SEQ ID NO:18), "ActRIIB(20-119)-Fc" характеризуется сниженным связыванием с GDF-11 и активином по сравнению со слитым белком ActRIIB-Fc, содержащим аминокислоты 20-134 из SEQ ID NO: 14 (т. е. SEQ ID NO:17), "ActRIIB(20-134)-Fc", который включает область пролинового узла и полный околочелюстной домен. Однако слитый белок ActRIIB-Fc, содержащий аминокислоты 20-129 из SEQ ID NO: 14, "ActRIIB(20-129)-Fc" сохраняет подобную, но несколько сниженную активность по сравнению с неусеченным внеклеточным доменом ActRIIB, даже несмотря на то, что область пролинового узла разрушена. Таким образом, ожидается, что все полипептиды ActRIIB, содержащие внеклеточные домены, которые заканчиваются на аминокислоте 134, 133, 132, 131, 130 и 129 под SEQ ID NO: 14 (или SEQ ID NO:2), будут активными, однако конструкции, заканчивающиеся на аминокислоте 134 или 133, могут быть наиболее активными. Аналогичным образом, мутации в любом из остатков 129-134, как ожидается, не изменят аффинность связывания лиганда в широких пределах, на что указывает тот факт, что мутации P129 и P130 из SEQ ID NO: 14 не уменьшают связывание лиганда в значительной степени. Таким образом, полипептиды ActRIIB, применяемые в соответствии с описанными в данном документе способами и композициями, могут заканчиваться уже аминокислотой 109 (т. е. конечным остатком цистеина) из SEQ ID NO:14 (или SEQ ID NO:2), однако формы, оканчивающиеся между аминокислотными положениями 109 и 119 из SEQ ID NO:14 (или SEQ ID NO:2) или на них, как ожидается, характеризуются сниженной способностью связывания лиганда.

**[00248]** Аминокислота 29 из SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:14 представляет собой исходный остаток цистеина в последовательности предшественника ActRIIB. Ожидается, что полипептид ActRIIB, начинающийся с аминокислоты 29 из N-конца SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14 или перед этими аминокислотными положениями, будет сохранять лигандсвязывающую активность. Мутация аланина с заменой на аспарагин в положении 24 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14 обеспечивает введение N-связанной последовательности гликозилирования без существенного влияния на связывание лиганда. Это подтверждает, что мутации в области между сигнальным пептидом расщепления и областью, сшитой

цистеином, соответствующие аминокислотам 20-29 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14, являются хорошо переносимыми. В частности, полипептиды ActRIIB, начинающиеся с аминокислотных положений 20, 21, 22, 23 и 24 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14, сохраняют активность и полипептиды ActRIIB, начинающиеся с аминокислотных положений 25, 26, 27, 28 и 29 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14, как ожидается, также сохраняют активность. Полипептид ActRIIB, начинающийся с аминокислотного положения 22, 23, 24 или 25 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14, будет иметь наибольшую активность.

**[00249]** В совокупности активные части (т. е. полипептиды ActRIIB) белка-предшественника ActRIIB (т. е. SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14), подлежащие применению в соответствии с описанными в данном документе способами и композициями, как правило, будут содержать аминокислоты 29-109 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14, и такие полипептиды ActRIIB могут, например, начинаться с остатка, соответствующего любой из аминокислот 19-29 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14, и заканчиваются в положении, соответствующем любой из аминокислот 109-134 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14. Конкретные примеры полипептидов ActRIIB, охваченных в данном документе, включают полипептиды, которые начинаются в аминокислотном положении 19-29, 20-29 или 21-29 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14 и заканчиваются в аминокислотном положении 119-134, 119-133 или 129-134, 129-133 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14. Другие конкретные примеры полипептидов ActRIIB, охваченных в данном документе, включают полипептиды, которые начинаются в аминокислотном положении 20-24 (или 21-24, или 22-25) из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14 и заканчиваются в аминокислотном положении 109-134 (или 109-133), 119-134 (или 119-133) или 129-134 (или 129-133) из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14. Также рассматриваются варианты полипептидов ActRIIB, попадающие в эти диапазоны, в частности те, которые характеризуются по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности или гомологией последовательности с соответствующей частью SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14.

**[00250]** В определенных вариантах осуществления лиганды-ловушки ActRIIB, применяемые в композициях и способах, описанных в данном документе, содержат усеченную форму внеклеточного домена ActRIIB. Усечение может быть на карбокси-конце и/или на амино-конце полипептида ActRIIB. В определенных вариантах осуществления длина усечения может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот относительно внеклеточного домена зрелого полипептида ActRIIB. В определенных вариантах осуществления усечение может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25

N-концевых аминокислот внеклеточного домена зрелого полипептида ActRIIB. В определенных вариантах осуществления усечение может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 C-концевых аминокислот внеклеточного домена зрелого полипептида ActRIIB. Например, усеченные формы ActRIIB включают полипептиды с аминокислотами 20-119; 20-128; 20-129; 20-130; 20-131; 20-132; 20-133; 20-134; 20-131; 21-131; 22-131; 23-131; 24-131 и 25-131, где аминокислотные положения относятся к аминокислотным положениям в SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14.

**[00251]** Дополнительные иллюстративные усеченные формы ActRIIB включают (i) полипептиды, начиная с любой из аминокислот 21-29 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14 (необязательно начиная с 22-25 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14) и заканчивая любой из аминокислот 109-134 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14; (ii) полипептиды, начиная с любой из аминокислот 20-29 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14 (необязательно начиная с 22-25 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14) и заканчивая любой из аминокислот 109-133 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14; (iii) полипептиды, начиная с любой из аминокислот 20-24 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14 (необязательно начиная с 22-25 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14) и заканчивая любой из аминокислот 109-133 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14; (iv) полипептиды, начиная с любой из аминокислот 21-24 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14 и заканчивая любой из аминокислот 109-134 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14; (v) полипептиды, начиная с любой из аминокислот 20-24 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14 и заканчивая любой из аминокислот 118-133 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14; (vi) полипептиды, начиная с любой из аминокислот 21-24 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14 и заканчивая любой из аминокислот 118-134 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14; (vii) полипептиды, начиная с любой из аминокислот 20-24 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14 и заканчивая любой из аминокислот 128-133 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14; (viii) полипептиды, начиная с любой из аминокислот 20-24 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14 и заканчивая любой из аминокислот 128-133 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14; (ix) полипептиды, начиная с любой из аминокислот 21-29 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14 и заканчивая любой из аминокислот 118-134 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14; (x) полипептиды, начиная с любой из аминокислот 20-29 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14 и заканчивая любой из аминокислот 118-133 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14; (xi) полипептиды, начиная с любой из аминокислот 21-29 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14 и заканчивая любой из аминокислот 128-134 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14; и (xii) полипептиды, начиная с любой из аминокислот 20-29 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14 и заканчивая любой из аминокислот 128-133 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14, В

конкретном варианте осуществления полипептиды ActRIIB содержат, по существу состоят или состоят из аминокислотной последовательности, начинающейся в аминокислотном положении 25 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14 и заканчивающейся в аминокислотном положении 131 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14. В другом конкретном варианте осуществления полипептид ActRIIB состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:3, 4, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28 или 29.

**[00252]** Любой из полипептидов ActRIIB, применяемых в композициях и способах, описанных в данном документе, может быть получен в виде гомодимера. Любой из полипептидов ActRIIB, применяемых в композициях и способах, описанных в данном документе, может быть составлен в виде слитого белка, имеющего гетерологичную часть, которая содержит константную область из тяжелой цепи IgG, такую как Fc-домен. Любой из полипептидов ActRIIB, применяемых в композициях и способах, описанных в данном документе, может содержать кислую аминокислоту в положении, соответствующем положению 79 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14, необязательно в комбинации с одной или несколькими дополнительными аминокислотными заменами, делециями или вставками относительно SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14.

**[00253]** В конкретных вариантах осуществления лиганды-ловушки ActRIIB, применяемые в композициях и способах, описанных в данном документе, содержат внеклеточный домен ActRIIB с одной или несколькими аминокислотными заменами/мутациями. Такая аминокислотная замена/мутация может представлять собой, например, замену лейцина в аминокислотном положении 79 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14 на кислую аминокислоту, такую как аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота. Например, положение L79 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14 может быть изменено в полипептидах внеклеточного домена ActRIIB для придания измененных свойств связывания активина-миостатина (GDF-11). Мутации L79A и L79P снижают связывание GDF-11 в большей степени, чем связывание активина. Мутации L79E и L79D сохраняют связывание GDF-11, демонстрируя при этом значительно сниженное связывание активина.

**[00254]** В определенных вариантах осуществления лиганды-ловушки ActRIIB, применяемые в композициях и способах, описанных в данном документе, содержат усеченную форму внеклеточного домена ActRIIB, который также несет аминокислотную замену, например, замену лейцина в аминокислотном положении 79 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14 на кислую аминокислоту, такую как аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота. В конкретном варианте осуществления усеченной формой

внеклеточного домена полипептида ActRIIB, который также несет аминокислотную замену, применяемую в композициях и способах, описанных в данном документе, является SEQ ID NO:9. Формы ActRIIB, которые являются усеченными и/или содержат одну или несколько аминокислотных замен, могут быть связаны с Fc-доменом антитела, как обсуждалось выше.

**[00255]** Функционально активные фрагменты полипептидов ActRIIB могут быть получены, например, путем скрининга полипептидов, полученных рекомбинантно из соответствующего фрагмента нуклеиновой кислоты, кодирующего полипептид ActRIIB. Кроме того, фрагменты могут быть химически синтезированы с применением методик, известных из уровня техники, таких как традиционный химический метод твердофазного пептидного синтеза Меррифилда f-Мос или t-Вос. Фрагменты могут быть получены (рекомбинантно или путем химического синтеза) и протестированы для идентификации тех пептидных фрагментов, которые могут функционировать как антагонисты (ингибиторы) белка ActRIIB или передачи сигнала, опосредованной активинном.

**[00256]** Кроме того, функционально активные варианты полипептидов ActRIIB могут быть получены, например, путем скрининга библиотек модифицированных полипептидов, полученных рекомбинантным путем из соответствующих мутагенизированных нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид ActRIIB. Варианты могут быть получены и протестированы для идентификации тех, которые могут функционировать как антагонисты (ингибиторы) белка ActRIIB или передачи сигнала, опосредованной активинном. В определенных вариантах осуществления функциональный вариант полипептидов ActRIIB содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3, 4, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28 и 29. В определенных вариантах осуществления функциональный вариант содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO:3, 4, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28 и 29.

**[00257]** Было продемонстрировано, что лигандсвязывающий карман ActRIIB определяется остатками от Y31, N33, N35, L38 до T41, E47, E50, от Q53 до K55, L57, H58, Y60, S62, K74, от W78 до N83, Y85, R87, A92 и от E94 до F101 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14. Ожидается, что в этих положениях будут переносимыми консервативные мутации, хотя мутация K74A хорошо переносится, как и R40A, K55A, F82A и мутации в положении L79. R40 представляет собой K в Xenopus, что указывает на то, что основные аминокислоты

в этом положении будут переносимыми. Q53 представляет собой R в бычьем ActRIIB и K в ActRIIB Xenopus, и поэтому аминокислоты, включая R, K, Q, N и H, являются переносимыми в данном положении. Таким образом, общая формула полипептида ActRIIB для применения в способах и композициях, описанных в данном документе, представляет собой формулу, которая предусматривает аминокислоты 29-109 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14, но необязательно начиная с аминокислотного положения, находящегося в диапазоне от 20-24 или 22-25 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14 и заканчивая аминокислотным положением в диапазоне 129-134 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14, и содержащие не более чем 1, 2, 5 или 15 консервативных аминокислотных изменений в лигандсвязывающем кармане и ноль, одну или несколько неконсервативных замен в аминокислотных положениях 40, 53, 55, 74, 79 и/или 82 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14 в лигандсвязывающем кармане. Такой полипептид ActRIIB может сохранять более чем 80%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности или гомологию последовательности с последовательностью аминокислот 29-109 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14. Участки вне связывающего кармана, в которых вариабельность может являться особенно хорошо переносимой, включают амино- и карбоксиконцы внеклеточного домена ActRIIB и положения 42-46 и 65-73. Замена аспарагина на аланин в положении 65 из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 14 (N65A) фактически улучшает связывание лиганда в окружении A64 и, таким образом, ожидается, что оно не оказывает вредного эффекта в отношении связывания лиганда в окружении R64. Это изменение, вероятно, устраняет гликозилирование в N65 в окружении A64, демонстрируя тем самым, что значительное изменение в этой области, вероятно, является переносимым. В то время как изменение R64A является плохо переносимым, R64K является хорошо переносимым, и, следовательно, другой основной остаток, такой как H, может являться переносимым в положении 64.

**[00258]** В конкретных вариантах осуществления лиганды-ловушки ActRIIB, применяемые в композициях и способах, описанных в данном документе, содержат конъюгированный/слитый белок, содержащий внеклеточный домен (например, активинсвязывающий домен) рецептора ActRIIB, связанного с Fc-фрагментом антитела. Такие конъюгированные/слитые белки могут содержать любые полипептиды ActRIIB, раскрытые в данном документе (например, любую из SEQ ID NO:3, 4, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28 и 29), любые полипептиды ActRIIB, известные из уровня техники, или любые полипептиды ActRIIB, полученные с применением способов, известных из уровня техники и/или предусмотренных в данном документе.

**[00259]** В определенных вариантах осуществления внеклеточный домен связан с Fc-частью антитела посредством линкера, например, пептидного линкера. Иллюстративные линкеры включают короткие полипептидные последовательности, такие как 2-10, 2-5, 2-4, 2-3 аминокислотных остатка (например, остатки глицина), такие как, например, линкер Gly-Gly-Gly. В конкретном варианте осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность Gly-Gly-Gly (GGG). В другом конкретном варианте осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность Thr-Gly-Gly-Gly (TGGG). Необязательно Fc-домен имеет одну или несколько мутаций в остатках, таких как Asp-265, лизин 322 и Asn-434. В определенных случаях мутантный Fc-домен, имеющий одну или несколько из этих мутаций (например, мутацию Asp-265), характеризуется сниженной способностью связываться с рецептором Fcγ по сравнению с Fc-доменом дикого типа. В других случаях мутантный Fc-домен, имеющий одну или несколько из этих мутаций (например, мутацию Asn-434), характеризуется повышенной способностью связываться с Fc-рецептором, родственным MHC класса I (FcRN), относительно Fc-домена дикого типа. Иллюстративные слитые белки, содержащие растворимый внеклеточный домен ActRIIB, слитый с Fc-доменом, изложены под SEQ ID NO: 6, 7, 10, 11, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 30, 32 и 33.

**[00260]** В конкретном варианте осуществления лиганды-ловушки ActRIIB, применяемые в композициях и способах, описанных в данном документе, содержат внеклеточный домен ActRIIB или его часть, связанные с Fc-частью антитела, где указанный лиганд-ловушка ActRIIB содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 6, 7, 10, 11, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 30, 32 и 33. В другом конкретном варианте лиганды-ловушки ActRIIB, применяемые в композициях и способах, описанных в данном документе, содержат внеклеточный домен ActRIIB или его часть, связанные с Fc-частью антитела, где указанная лиганд-ловушка ActRIIB содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 6, 7, 10, 11, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 30, 32 и 33.

**[00261]** В конкретном варианте осуществления лиганды-ловушки ActRIIB, подлежащие применению в композициях и способах, описанных в данном документе, представляют собой слитый белок между внеклеточным доменом рецептора человеческого ActRIIB и Fc-частью IgG1. В другом конкретном варианте осуществления лиганд-ловушка ActRIIB, подлежащая применению в композициях и способах, описанных в данном документе, представляет собой слитый белок между усеченным внеклеточным доменом рецептора

человеческого ActRIIB и Fc-частью IgG1. В другом конкретном варианте осуществления лиганд-ловушка ActRIIB, подлежащая применению в композициях и способах, описанных в данном документе, представляет собой слитый белок между усеченным внеклеточным доменом рецептора человеческого ActRIIB и Fc-частью IgG1, где усеченный внеклеточный домен человеческого рецептора ActRIIB содержит аминокислотную замену в аминокислотном положении, соответствующей аминокислоте 79 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14. В одном варианте осуществления аминокислотная замена в аминокислотном положении, соответствующем аминокислоте 79 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14, представляет собой замену лейцина на аспарагиновую кислоту (т. е. мутацию L79D).

**[00262]** В конкретном варианте осуществления лиганд-ловушка ActRIIB, подлежащий применению в композициях и способах, описанных в данном документе, представляет собой SEQ ID NO:10 или 11, которая представляет слитый белок между внеклеточным доменом рецептора человеческого ActRIIB и Fc-частью IgG1, где указанный внеклеточный домен ActRIIB содержит аминокислоты 25–131 из SEQ ID NO:14 с мутацией L79D. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок ActRIIB-Fc под SEQ ID NO:10, представлена в SEQ ID NO:31.

**[00263]** В другом конкретном варианте осуществления лиганд-ловушка ActRII, подлежащий применению в композициях и способах, описанных в данном документе, представляет собой полипептид, содержащий (i) фрагмент внеклеточного домена ActRIIB, где фрагмент состоит из последовательности аминокислот 25–131 под SEQ ID NO:14 и где фрагмент несет аминокислотную замену L79D; (ii) линкер и (iii) Fc из IgG.

**[00264]** В другом конкретном варианте осуществления лиганд-ловушка ActRIIB, подлежащий применению в композициях и способах, описанных в данном документе, представляет собой SEQ ID NO:20 или 21, которая представляет собой слитый белок между внеклеточным доменом рецептора человеческого ActRIIB и Fc-частью IgG1, где указанный внеклеточный домен ActRIIB содержит аминокислоты 25-131 под SEQ ID NO:2 с мутацией L79D.

**[00265]** В конкретных вариантах осуществления мутированные полипептиды ActRIIB, предусматривающие добавление дополнительного участка N-связанного гликозилирования (NXS/T), который увеличивает время полужизни в сыворотке крови слитого белка ActRIIB-Fc относительно формы ActRIIB(R64)-Fc, могут применяться в способах и композициях, описанных в данном документе. В конкретном варианте осуществления введение аспарагина в положение 24 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14 (A24N) приводит в результате к созданию последовательности NXT, которая обеспечивает более длительное

время полужизни. Другие последовательности NX(T/S) можно найти в положениях 42-44 (NQS) и 65-67 (NSS), хотя последние могут быть неэффективно гликозилированы с помощью R в положении 64 (т. е. в полипептидах R64). Последовательности NXS/T обычно могут быть введены вне лигандсвязывающего кармана ActRIIB, что подробно описано выше. В частности, подходящие участки для введения неэндогенных последовательностей NXS/T включают аминокислоты 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 или 129-134 из SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14. Последовательности NXS/T также могут быть введены в линкер между последовательностью ActRIIB и Fc или другим слитым компонентом. Такой участок можно ввести с минимальным усилием путем введения N в правильное положение по отношению к ранее существовавшим S или T или путем введения S или T в положение, соответствующее ранее существовавшему N. Таким образом, требуемые изменения которые обеспечили бы создание N-связанного участка гликозилирования, являются следующими: A24N, R64N, S67N (возможно, в комбинации с заменой N65A), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S и R112T (со всеми аминокислотными положениями, соответствующими положениям, которые могут быть найдены в SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:14). Любой S, который, как предполагается, будет гликозилирован, может быть заменен на T без создания иммуногенного участка из-за защиты, обеспечиваемой гликозилированием. Аналогично, любой T, который, как предполагается, является гликозилированным, может быть заменен на S. Таким образом, замены S67T и S44T охватываются данным документом. Аналогично, в варианте A24N может использоваться замена S26T. Соответственно, полипептид ActRIIB может включать одну или несколько дополнительных неэндогенных N-связанных консенсусных последовательностей гликозилирования.

**[00266]** В определенных вариантах осуществления в способах и композициях, описанных в данном документе, применяются выделенные или очищенные полипептиды ActRIIB, т. е. могут применяться полипептиды ActRIIB, которые выделены из других белков или иным образом фактически не содержат их, с применением способов и композиций, описанных в данном документе. Полипептиды ActRIIB обычно получают путем экспрессии из рекомбинантных нуклеиновых кислот.

**[00267]** В определенных аспектах полипептиды ActRIIB, применяемые в способах и композициях, описанных в данном документе, кодируются выделенными и/или рекомбинантными нуклеиновыми кислотами, включая фрагменты, функциональные варианты и слитые белки, раскрытые в данном документе. Например, SEQ ID NO:5 кодирует встречающийся в природе полипептид-предшественник человеческого ActRIIB.

Рассматриваемые нуклеиновые кислоты могут являться однонитевыми или двухнитевыми. Такие нуклеиновые кислоты могут представлять собой молекулы ДНК или РНК. Эти нуклеиновые кислоты можно применять, например, в способах получения полипептидов ActRIIB или в качестве непосредственных терапевтических средств (например, в подходе с использованием генной терапии).

**[00268]** В определенных аспектах нуклеиновые кислоты, которые могут применяться для получения полипептидов ActRIIB, подходящих для применения в способах и композициях, описанных в данном документе, дополнительно рассматриваются как включающие нуклеиновые кислоты, которые представляют собой варианты SEQ ID NO:5, а также варианты тех последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют растворимые полипептиды ActRIIB (например, нуклеиновые кислоты, которые кодируют SEQ ID NO: 3, 4, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28 и 29). Варианты нуклеотидных последовательностей включают последовательности, отличающиеся одной или несколькими нуклеотидными заменами, добавлениями или делециями, такие как аллельные варианты.

**[00269]** В определенных вариантах осуществления выделенные или рекомбинантные последовательности нуклеиновых кислот, которые могут применяться для получения полипептидов ActRIIB, подходящих для применения в способах и композициях, описанных в данном документе, являются на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичными SEQ ID NO:5 или теми последовательностями нуклеиновых кислот, которые кодируют растворимые полипептиды ActRIIB (например, нуклеиновых кислот, которые кодируют SEQ ID NO: 3, 4, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28 и 29). Специалисту в данной области будет понятно, что последовательности нуклеиновых кислот, комплементарные SEQ ID NO:5, или те последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют растворимые полипептиды ActRIIB (например, нуклеиновых кислот, которые кодируют SEQ ID NO: 3, 4, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28 и 29) и варианты SEQ ID NO:5, или те последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют растворимые полипептиды ActRIIB (например, нуклеиновых кислот, которые кодируют SEQ ID NO: 3, 4, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 28 и 29) могут применяться со способами и композициями, описанными в данном документе. В дополнительных вариантах осуществления последовательности нуклеиновых кислот могут быть выделены, рекомбинированы и/или слиты с гетерологичной нуклеотидной последовательностью или в библиотеке ДНК.

## **6.8 Ингибиторы mTOR**

**[00270]** В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой рапамицин. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат рапамицина. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой дефоролимус. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат дефоролимуса. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой эверолимус. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат эверолимуса. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой темсиролимус. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат темсиролимуса. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой ридафоролимус. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат ридафоролимуса. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой такролимус (FK-506). В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат такролимуса (FK-506). В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой зотаролимус (ABT-578). В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат зотаролимуса (ABT-578).

**[00271]** В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой ингибирующее mTOR соединение, представляющее собой аналог, отличный от рапамицина. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат ингибирующего mTOR соединения, представляющего собой аналог, отличный от рапамицина. В определенных вариантах осуществления ингибирующие mTOR соединения, представляющие собой аналоги, отличные от рапамицина, включают без ограничения 3,3-дииндолилметан (DIM), 32 дезоксирапамицин (SAR943), 3-метиладенин, аренобуфагин, AZD 3147, AZD-2014 (вистусертиб), AZD8055, BC-LI-0186, BEZ235 (дактолисиб), бимиралисиб (PQR309), кофеин, CC-115, CC-223 (онатасертиб), хризофановую кислоту (хризофанол), циклопирокс оламин, CID3528206, CIDD 0067106, соединение 401 (см., например, Griffen et al., 2005, J. Med. Chem. 48:569), куркумин, CZ415, eCF 309, галлат эпигаллокатехина (EGCG), ETP 45658, ETP-46464, GDC-0084, GDC-0349, GDC-0980 (апитолисиб, RG7422), генистеин,

GNE-477, GNE-493, GSK1059615, GSK-2126458 (омипалисиб), ICSN3250, INK-128 (MLN0128, сапанисертиб), KU-0063794, LY3023414 (самотолисиб), ME-344 (NV-344), метформин, МНУ1485, МТИ-31 (LXI-15029), ингибитор mTOR 10 (CAS № 1222999-54-3; см., например, Liu et al., 2011, Bioorg. Med. Chem. Lett. 21(13):4036-4040), mTOR/HDAC1-IN-121 ((R)-N-(4-(1-(7-(гидроксиамино)-7-оксогептил)-4-морфолино-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-6-ил)фенил)-2-метилморфолин-4-карбоксамид), mTORC1-IN-1 (2-(4-((2,4,6-триметил-3-(4-(3-(метилсульфонил)пиридин-2-ил)пиперазин-1-карбонил)фенил)амино)пиперидин-1-ил)бензонитрил), mTOR-IN-1 (CAS № 1207358-59-5), mTOR-IN-17 ((E)-6-(фенилдиазенил)-1Н-дипиразоло[1,5-а:4',3'-е]пиримидин-3,4,7-триамин), никлозамид, NV-128 (LY-303511), NVP-BGT226, омипалисиб, OSI-027, OSU-53, паломид 529 (P529), перифозин, PF 05212384, PF-04691502, PF-04979064, гидрохлорид PI 103, PKI-402, PKI-587 (гедатолисиб), PP 121, PP-242 (торкиниб), PP30, PQR-620, QL-IX-55, RapaLink, ресвератрол, SAR245409, LY294002, вортманнин, кверцетин, мирицетин, стауроспорин, SF1126, SF2523, STK16-IN-1, сунитиниб, Torin 1, Torin 2, триацетил-алоэ-эмодин, VS-5584, WAY-600, WJD008, WYE-125132 (WYE-132), WYE-354, WYE-687, XL388, XL-765 (воксталисиб, SAR245409), (+)-усниновую кислоту, арникоlid D, малеат BGT226 (малеат NVP-BGT226), Cbz-B3A, гидрохлорид CC-115, цикловиробуксин D, дигидромирицетин (Ampelopsin или Ampeloptin), FT-1518, GNE-317, гедераколхисид A1, JR-AB2-011, KU-0060648, NSC781406, PI-103, полифиллин I, помиферин (NSC 5113), PQR-530, ингибитор Rheb NR1, ротундовую кислоту или дигидрохлорид WYE-687.

**[00272]** В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR выбран из группы, состоящей из рапамицина, дефоролимуса, эверолимуса, темсиролимуса, ридафоролимуса, такролимуса (FK-506), зотаролимуса (ABT-578), 3,3-дииндолилметана (DIM), 32 дезоксирапамицина (SAR943), 3-метиладенина, аренобуфагина, AZD 3147, AZD-2014 (вистусертиба), AZD8055, BC-LI-0186, BEZ235 (дактолисиба), бимиралисиба (PQR309), кофеина, CC-115, CC-223 (онатасертиба), хризофановой кислоты (хризофанола), циклопирокса оламина, CID3528206, CIDD 0067106, соединения 401, куркумина, CZ415, eCF 309, галлата эпигаллокатехина (EGCG), ETP 45658, ETP-46464, GDC-0084, GDC-0349, GDC-0980 (апитолисиба, RG7422), генистеина, GNE-477, GNE-493, GSK1059615, GSK-2126458 (омипалисиба), ICSN3250, INK-128 (MLN0128, сапанисертиба), KU-0063794, LY3023414 (самотолисиба), ME-344 (NV-344), метформина, МНУ1485, МТИ-31 (LXI-15029), ингибитора mTOR 10 (CAS № 1222999-54-3), mTOR/HDAC1-IN-121, mTORC1-IN-1, mTOR-IN-1, mTOR-IN-17, никлозамида, NV-128 (LY-303511), NVP-BGT226, омипалисиба, OSI-027, OSU-53, паломид 529 (P529), перифозина, PF 05212384, PF-

04691502, PF-04979064, гидрохлорида PI 103, PKI-402, PKI-587 (гедатолисиба), PP 121, PP-242 (торкиниба), PP30, PQR-620, QL-IX-55, Rapalink, ресвератрола, SAR245409, LY294002, вортманнина, кверцетина, мирицетина, стауроспорина, SF1126, SF2523, STK16-IN-1, сунитиниба, Torin 1, Torin 2, триацетил-алоэ-эмодин, VS-5584, WAY-600, WJD008, WYE-125132 (WYE-132), WYE-354, WYE-687, XL388, XL-765 (воксталисиба, SAR245409), (+)-усниновой кислоты, арниколида D, малеата BGT226 (малеата NVP-BGT226), Cbz-B3A, гидрохлорида CC-115, цикловиробуксина D, дигидромирицетина (Ampelopsin или Ampeloptin), FT-1518, GNE-317, гедераколхисида A1, JR-AB2-011, KU-0060648, NSC781406, PI-103, полифиллина I, помиферина (NSC 5113), PQR-530, ингибитора Rheb NR1, ротундовой кислоты и дигидрохлорида WYE-687. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR выбран из группы, состоящей из рапамицина, дефоролимуса, эверолимуса, темсиролимуса, ридафоролимуса, такролимуса (FK-506) и зотаролимуса (ABT-578).

**[00273]** В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой АТФ-конкурентный ингибитор.

#### **6.9 Эталонная популяция**

**[00274]** В определенных вариантах осуществления размер эталонной популяции может составлять 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из произвольно выбранных добровольцев. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из здоровых людей. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и популяция пациентов, описанная в разделе 6.5. В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей без талассемии, альфа-талассемии, бета-талассемии, миелодиспластических синдромов (MDS) или непролиферативного хронического миеломоноцитарного лейкоза (CMML). В определенных вариантах осуществления эталонная популяция состоит из людей с талассемией, альфа-талассемией, бета-талассемией, миелодиспластическими синдромами (MDS) или непролиферативным хроническим миеломоноцитарным лейкозом (CMML).

## 7. ПРИМЕРЫ

### 7.1 Пример 1. Эксперименты с применением комбинации рапамицина (сиролимуса) и луспатерцепта

#### 7.1.1 Предпосылки исследования

[00275] Проводили два независимых эксперимента для проверки того, обеспечивает ли совместное введение рапамицина и луспатерцепта повышение уровней эритроцитов и гемоглобина в большей степени, чем введение луспатерцепта отдельно. Два эксперимента являлись сходными по схеме, за исключением того, что самки мышей дикого типа использовались в эксперименте 1, в то время как мыши для модели с бета-талассемией (самки мышей в возрасте 9–18 недель, которые являются гетерозиготными мутантами по генам *Hbb-b1* и *Hbb-b2*) использовались в эксперименте 2. Схема эксперимента проиллюстрирована на фиг. 1.

#### 7.1.2 Материалы и способы

##### (a) Мыши

[00276] Всех мышей приобретали в Jackson Laboratory. Для эксперимента 1 использовали самок мышей дикого типа (C57BL/6J) в возрасте 10-12 недель (Jackson Lab, сток № 000664). Для эксперимента 2 использовали самок мышей *B6.129P2-Hbb-b1<sup>tm1Unc</sup> Hbb-b2<sup>tm1Unc</sup>/J* на фоне 000664 C57BL/6J (Jackson Lab, сток № 002683, мышьяная модель с бета-талассемией) в возрасте 9–18 недель.

##### (b) Введение доз

[00277] Мышиную версию луспатерцепта (RAP-536) в 1X фосфатно-солевом буфере (PBS) с общим объемом 150 мкл и дозой 10 мг/кг вводили путем подкожной (SC) инъекции два раза в неделю в течение двух недель. Рапамицин в дозе 4 мг/кг в 1X PBS, который содержит 5% Tween 80, 5% PEG400, 4% этанол, и общим объемом 150 мкл вводили путем внутрибрюшинной инъекции ежедневно, за исключением воскресений, в течение двух недель. Для контрольной группы 150 мкл 1X PBS (среда-носитель 1) вводили путем подкожной (SC) инъекции два раза в неделю в течение двух недель и растворы 1X PBS, который содержит 5% Tween 80, 5% PEG400, 4% этанол (среда-носитель 2), в объеме 150 мкл вводили путем внутрибрюшинной инъекции ежедневно, за исключением воскресений, в течение двух недель. В ходе обоих экспериментов мышей разделяли на 4 группы. Группа 1 получала инъекции среды-носителя 1 (SC) и среды-носителя 2 (IP), группа 2 получала инъекции RAP-536 (лекарственное средство 1) (SC) и среды-носителя 2 (IP), группа 3 получала инъекции среды-носителя 1 (SC) и рапамицина (лекарственное средство

2) (IP) и группа 4 получала инъекции RAP-536 (лекарственное средство 1) (SC) и рапамицина (лекарственное средство 2) (IP).

**(c) Получение суспензий костного мозга и селезенки и крови**

**[00278]** В день 15, через один день после введения последней дозы, мышей подвергали эвтаназии, и кровь собирали посредством пункции сердца и непосредственно помещали в пробирки K2EDTA для сбора крови. Костный мозг собирали посредством промывания бедренных и большеберцовых костей от каждой мыши с применением шприца с иглой и с применением 5 мл 1X HBSS (без содержания Ca и Mg), который содержит 2% термоинактивированную бычью сыворотку (Thermo Fisher Scientific). Селезенки удаляли и спленциты получали посредством разбивания селезенок с применением поршня шприца на клеточном сите с размером ячеек 70 мкм, помещенном в коническую пробирку объемом 50 мл. Суспензии как костного мозга, так и селезенки хранили на льду до проведения анализа посредством проточной цитометрии.

**(d) Общий анализ крови (CBC)**

**[00279]** Анализы CBC, ретикулоцитов (retic) и CHr проводили на образцах крови в тот же день, в который собирали кровь, с применением оборудования Siemens Advia 120.

**(e) Анализ костного мозга, селезенки и крови посредством проточной цитометрии**

**[00280]** Для каждого анализа посредством проточной цитометрии окрашивали 2 миллиона клеток костного мозга и селезенки из полученных клеточных суспензий и 5 миллионов клеток крови. Сначала клетки окрашивали с помощью тиазолового оранжевого (разбавление 1:50000 10 мМ исходного раствора) и Hoechst (разбавление 1:1000 5 мг/мл исходного раствора) в среде для окрашивания (HBSS с 2% термоинактивированной бычьей сывороткой) в течение 45 минут при комнатной температуре. После однократной промывки средой для окрашивания клетки окрашивали с помощью коктейля антител в течение 20 минут при 4°C. Используемые антитела представляли собой CD45 (клон 30-F11), Ter119, CD44 (клон IM7), CD71 (клон RI7217). Все антитела, направленные против поверхностных антигенов, применяемые в данном исследовании, приобретали в Biolegend и Thermo Fisher Scientific. После окраски антителами клетки однократно промывали средой для окрашивания. Реагент Sytox-AADvanced (от Thermo Fisher Scientific) применяли в качестве красителя для оценки жизнеспособности согласно протоколу для продукта. Для анализа посредством проточной цитометрии применяли LSR Fortessa Flow Cytometry Analyzer от BD Biosciences. Для анализа данных проточной цитометрии применяли программное обеспечение FlowJo от BD Biosciences. Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel и GraphPad Prism.

### 7.1.3 Подробный протокол введения доз

#### (а) Эксперимент 1:

- Использовали мышей дикого типа (C57BL/6J) в возрасте 10-12 недель (Jackson Lab, сток № 000664).
- **Лекарственное средство 1:** RAP-536 в 1X PBS: 10 мг/кг, подкожно (SC), два раза в неделю, начиная с первого дня.
- **Среда-носитель 1:** 1X PBS
- **Лекарственное средство 2:** Рапамицин в 1X PBS, который содержит 5% Tween 80, 5% PEG400, 4% этанол. Доза 4 мг/кг, IP (доза 4 мг/кг).
- **Среда-носитель 2:** 5% Tween 80, 5% PEG400, 4% этанол в 1X PBS
- **Группы обработки:** Самки мышей C57BL/6J дикого типа (wt) (Jackson), 7 животных/группа
  - (1) Группа 1: Среда-носитель 1 (SC) + среда-носитель 2 (IP)
  - (2) Группа 2: Лекарственное средство 1 (RAP-536) (SC) + среда-носитель 2 (IP)
  - (3) Группа 3: Среда-носитель 1 (SC) + лекарственное средство 2 (рапамицин) (IP)
  - (4) Группа 4: Лекарственное средство 1 (RAP-536) (SC) + лекарственное средство 2 (рапамицин) (IP)
- **График введения доз и сбора**
  - (1) День 1 (вторник):
    - Измеряют показатели веса тела.
    - Вводят среду-носитель 1 и лекарственное средство 1 (RAP-536) посредством SC указанным группам
    - Вводят среду-носитель 2 и лекарственное средство 2 (рапамицин) посредством IP указанным группам
  - (2) Дни 2 и 3 (среда и четверг):
    - Вводят среду-носитель 2 и лекарственное средство 2 (рапамицин) посредством IP указанным группам каждый день
  - (3) День 4 (пятница):
    - Вводят среду-носитель 1 и лекарственное средство 1 (RAP-536) посредством SC указанным группам
    - Вводят среду-носитель 2 и лекарственное средство 2 (рапамицин) посредством IP указанным группам
  - (4) День 5 (суббота):

- Вводят среду-носитель 2 и лекарственное средство 2 (рапамицин) посредством IP указанным группам

(5) День 7 (понедельник):

- Вводят среду-носитель 2 и лекарственное средство 2 (рапамицин) посредством IP указанным группам

(6) День 8 (вторник):

- Вводят среду-носитель 1 и лекарственное средство 1 (RAP-536) посредством SC указанным группам

- Вводят среду-носитель 2 и лекарственное средство 2 (рапамицин) посредством IP указанным группам

(7) Дни 9 и 10 (среда и четверг):

- Вводят среду-носитель 2 и лекарственное средство 2 (рапамицин) посредством IP указанным группам каждый день

(8) День 11 (пятница):

- Вводят среду-носитель 1 и лекарственное средство 1 (RAP-536) посредством SC указанным группам

- Вводят среду-носитель 2 и лекарственное средство 2 (рапамицин) посредством IP указанным группам

(9) День 12 (суббота):

- Вводят среду-носитель 2 и лекарственное средство 2 (рапамицин) посредством IP указанным группам

(10) День 14 (понедельник):

- Вводят среду-носитель 1 и лекарственное средство 1 (RAP-536) посредством SC указанным группам

- Вводят среду-носитель 2 и лекарственное средство 2 (рапамицин) посредством IP указанным группам

(11) День 15 (вторник):

- Мышей подвергают эвтаназии и собирают кровь, костный мозг и селезенку.

- **Сбор и анализ ткани.**

(1) Измеряют показатели веса тела.

(2) Собирают всю кровь в широкие пробирки EDTA посредством пункции сердца. Выполняют развернутый CBC и Retic-IRF (фракция незрелых ретикулоцитов), а также анализ CHг.

(3) Собирают селезенку, измеряют вес селезенки.

- (4) Вымывают костный мозг из бедренных и большеберцовых костей обеих задних конечностей с применением 5 мл HBSS и 2% бычьей сыворотки для анализа посредством проточной цитометрии.

**(b) Эксперимент 2:**

- Использовали самок мышей *B6.129P2-Hbb-b1<sup>tm1Unc</sup>Hbb-b2<sup>tm1Unc</sup>/J* на фоне 000664 C57BL/6J (Jackson Lab, сток № 002683, мышьяная модель с бета-талассемией) в возрасте 9–18 недель.
- **Лекарственное средство 1:** Мышьяная версия луспатерцепта (RAP-536) в 1X PBS: 10 мг/кг, подкожно (SC), два раза в неделю, начиная с первого дня.
- **Среда-носитель 1:** 1X PBS
- **Лекарственное средство 2:** Рапамицин в 1X PBS, который содержит 5% Tween 80, 5% PEG400, 4% этанол. Доза 4 мг/кг, IP (доза 4 мг/кг).
- **Среда-носитель 2:** 5% Tween 80, 5% PEG400, 4% этанол в 1X PBS
- **Группы обработки:** Самки мышей *B6.129P2-Hbb-b1<sup>tm1Unc</sup>Hbb-b2<sup>tm1Unc</sup>/J* на фоне 000664 C57BL/6J (Jackson Lab, сток № 002683, мышьяная модель с бета-талассемией, у данных мышей отмечается нокаут обоих генов цепей гемоглобина, Hbb-b1 и Hbb-b2), 8 животных/группа. См., например, Yang et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. 92(25):11608-12. Мышей поровну распределяли в каждую группу на основании возраста и веса тела.
  - (1) Группа 1: Среда-носитель 1 (SC) + среда-носитель 2 (IP)
  - (2) Группа 2: Лекарственное средство 1 (RAP-536) (SC) + среда-носитель 2 (IP)
  - (3) Группа 3: Среда-носитель 1 (SC) + лекарственное средство 2 (рапамицин) (IP)
  - (4) Группа 4: Лекарственное средство 1 (RAP-536) (SC) + лекарственное средство 2 (рапамицин) (IP)
- **График введения доз и сбора:** такой же, как и для эксперимента 1
- **Сбор и анализ ткани:** такие же, как и для эксперимента 1

**7.1.4 Результаты**

[00281] Анализировали изменения уровней эритроцитов (RBC) в крови мышей дикого типа (в эксперименте 1) и мышей модели с бета-талассемией (*th3/+* мыши; в эксперименте 2) в группах, получавших различные виды обработки. Как показано на **фиг. 2А** и **2В**, совместное введение доз рапамицина и RAP-536 (группа 4) повышало уровни RBC как у мышей дикого типа, так и у *th3/+* мышей в большей степени, чем монотерапия с помощью либо RAP-536, либо рапамицина (по сравнению с введением только доз RAP-536 (группа 2) и введением только доз рапамицина (группа 3)). Каждое из введения доз RAP-536 по отдельности и введения доз рапамицина по отдельности повышало уровни RBC на сходных

уровнях. Процентное повышение уровней RBC у th3/+ мышей было больше, чем у мышей дикого типа (после введения доз RAP-536, введения доз рапамицина, а также совместного введения доз обоих). Уровень RBC у th3/+ мышей достигал уровня RBC у мышей дикого типа после введения либо RAP-536, либо рапамицина по отдельности и превышал уровни дикого типа после совместного введения доз RAP-536 или рапамицина.

**[00282]** Анализировали изменения уровней гемоглобина (HGB) в крови мышей дикого типа (в эксперименте 1) и мышей модели с бета-талассемией (th3/+ мыши; в эксперименте 2) в группах, получавших различные виды обработки. Как показано на **фиг. 3А** и **3В**, совместное введение доз рапамицина и RAP-536 (группа 4) повышало уровни HGB как у мышей дикого типа, так и у th3/+ мышей в большей степени, чем монотерапия с помощью либо RAP-536, либо рапамицина (по сравнению с введением только доз RAP-536 (группа 2) и введением только доз рапамицина (группа 3)). Процентное повышение уровней HGB было сходным с процентным повышением уровней RBC. Уровни HGB у th3/+ составляют приблизительно половину от уровней HGB у мышей дикого типа. Совместное введение доз RAP-536 и рапамицина повышало уровни HGB у th3/+ мышей на более чем 40%, что приводило к получению уровней HGB, которые все еще были ниже, чем уровни HGB у мышей дикого типа.

**[00283]** Анализировали изменения уровней HCT в крови мышей дикого типа (в эксперименте 1) и th3/+ мышей (в эксперименте 2) в группах, получавших различные виды обработки. Как показано на **фиг. 4А** и **4В** по сравнению с **фиг. 2А-2В** и **фиг. 3А-3В**, процентное повышение HCT у th3/+ мышей коррелирует с повышением RBC и HGB. Повышение уровней HCT у мышей дикого типа было ограниченным по сравнению с таковым у th3/+ мышей (достигающим уровня HCT, близкого к уровню HCT у мышей дикого типа). Таким образом, совместное введение доз RAP-536 и рапамицина является весьма эффективным в отношении повышения уровней RBC, HGB и HCT, особенно у th3/+ мышей.

**[00284]** Анализировали изменения размера клеток RBC (MCV) у мышей дикого типа (в эксперименте 1) и th3/+ мышей (в эксперименте 2) в группах, получавших различные виды обработки. Как показано на **фиг. 5А** и **5В**, введение доз RAP-536 снижало MCV у мышей дикого типа, однако повышало уже являющиеся низкими уровни MCV у th3/+ мышей. Совместное введение доз RAP-536 и рапамицина снижало MCV у мышей дикого типа.

**[00285]** Анализировали общее количество HGB/клетка (MCH) у мышей дикого типа (в эксперименте 1) и th3/+ мышей (в эксперименте 2) в группах, получавших различные виды обработки. Как показано на **фиг. 6А** и **6В**, уровень MCH слегка снижался у мышей дикого

типа, однако не изменялся у th3/+ мышей после введения доз RAP-536. У th3/+ мышей повышение уровней RBC, HGB и HCT было сходным, что не вызывало изменений значений MCH. Было обнаружено, что значения MCH были значительно более низкими у th3/+ мышей по сравнению с таковыми у мышей дикого типа. Уровни HGB и RBC у th3/+ мышей являются более низкими, чем уровни HGB и RBC у мышей дикого типа, чем объясняется более низкое общее количество HGB/клетка (MCH) у th3/+ мышей. Уровни MCH являлись более высокими после введения доз рапамицина, однако являлись более низкими после введения доз RAP-536, что указывает на разные механизмы действия и, таким образом, наличие потенциала для аддитивного/синергического эффекта.

**[00286]** Анализировали изменения уровней концентрации корпускулярного HGB (CHC) в крови мышей дикого типа (в эксперименте 1) и th3/+ мышей (в эксперименте 2) в группах, получавших различные виды обработки. Как показано на **фиг. 7А** и **7В**, совместное введение доз рапамицина и RAP-536 повышало CHC у мышей дикого типа, однако снижало CHC у th3/+ мышей. Причина, по которой уровень CHC повышался у мышей дикого типа после введения доз RAP-536 (группа 2) или после совместного введения доз (группа 4), возможно, состоит в том, что MCV снижался (клетки становились меньше), что приводило к более высокой концентрации HGB в каждой клетке (хоть и при более низком общем количестве HGB в каждой клетке). В итоге, повышение уровня HCT было меньше, чем повышение уровня HGB у мышей дикого типа после введения доз RAP-536. MCV не снижался после введения доз рапамицина у мышей дикого типа. Как показано на **фиг. 7В**, у th3/+ мышей уровни CHC снижались после введения доз RAP-536 (группа 2) или после совместного введения доз (группа 4), а также MCV был повышен (улучшался) после введения доз RAP-536 у th3/+ мышей. Таким образом, можно сделать заключение, что уровни RBC у th3/+ мышей характеризуются более низким общим количеством HGB/клетка, поскольку они меньше, однако концентрация HGB (CHC) в каждом RBC у th3/+ мышей была сходной с CHC в RBC у мышей дикого типа.

**[00287]** Анализировали изменения ширины распределения эритроцитов по объему (RDW) в крови мышей дикого типа (в эксперименте 1) и th3/+ мышей (в эксперименте 2) в группах, получавших различные виды обработки. Как показано на **фиг. 8А** и **8В**, совместное введение доз рапамицина и RAP-536 значительно снижало RDW у th3/+ мышей. RDW повышалось после введения доз RAP-536 (группа 2) или после совместного введения доз (группа 4) у мышей дикого типа. Было отмечено, что RDW было высоким у th3/+ мышей по сравнению с RDW у мышей дикого типа. У th3/+ мышей RDW является сниженным при

корреляции с улучшением в отношении анемии посредством введения доз RAP-536 (группа 2) и совместного введения доз обоих средств (группа 4).

**[00288]** Анализировали изменения процентной доли и абсолютного количества ретикулоцитов в крови мышей дикого типа (эксперимент 1) в группах, получавших различные виды обработки. Как показано на **фиг. 9А** и **9В**, введение доз RAP-536 повышало уровни ретикулоцитов в крови и введение доз рапамицина снижало уровни ретикулоцитов в крови у мышей дикого типа. Процентная доля (**фиг. 9А**) и показатели абсолютного количества ретикулоцитов (**фиг. 9В**) изменялись таким же образом в крови у мышей дикого типа после введения доз. Введение доз RAP-536 повышало и введение доз рапамицина снижало уровни ретикулоцитов в крови у мышей дикого типа. Совместное введение доз обоих средств нормализовало уровни ретикулоцитов. Это еще один набор данных, который позволяет предположить, что механизмы действия луспатерцепта и рапамицина в отношении продуцирования эритроцитов являются разными, и показывает, почему совместное введение доз демонстрирует аддитивный или синергический эффект (повышение уровней RBC или HGB в большей степени, чем при введении доз монотерапии).

**[00289]** Анализировали изменения процентной доли и абсолютного количества ретикулоцитов в крови th3/+ мышей (эксперимент 2) в группах, получавших различные виды обработки. Как показано на **фиг. 10А** и **10В**, совместное введение доз рапамицина и RAP-536 повышало показатели количества ретикулоцитов, но не процентную долю ретикулоцитов в крови у th3/+ мышей. Было отмечено, что процентная доля и показатели абсолютного количества ретикулоцитов были намного выше у th3/+ мышей по сравнению с таковыми у мышей дикого типа. Показатели абсолютного количества ретикулоцитов значительно повышались после введения доз рапамицина (группа 3), после введения доз RAP-536 (группа 2) и после совместного введения доз (группа 4) у th3/+ мышей. Тот факт, что показатели абсолютного количества ретикулоцитов у th3/+ мышей повышались как после введения доз RAP-536, так и после введения доз рапамицина, позволяет предположить, что выживаемость ретикулоцитов повышалась у th3/+ мышей. Более высокая выживаемость ретикулоцитов означает продуцирование большего количества RBC. Если выживаемость ретикулоцитов повышается, возможно, также увеличивается продолжительность жизни RBC. Причина, по которой уровни ретикулоцитов не снижались даже несмотря на то, что неэффективный эритропоэз у th3/+ мышей частично снижался, состоит в том, что у данных мышей все еще имелась анемия. Таким образом, достигалось

равновесие между повышением выживаемости ретикулоцитов/уменьшением анемии, что в итоге приводило к высоким уровням ретикулоцитов после введения доз.

**[00290]** Изучали изменение уровней гемоглобина в ретикулоцитах (CHr) в крови мышей дикого типа (в эксперименте 1) и th3/+ мышей (в эксперименте 2) в группах, получавших различные виды обработки. Как показано на **фиг. 11А** и **11В**, совместное введение доз рапамицина и RAP-536 слегка снижало уровни гемоглобина в ретикулоцитах как у мышей дикого типа, так и у th3/+ мышей. Следует отметить, что уровни гемоглобина в ретикулоцитах были уже низкими у th3/+ мышей. Возможно, причиной этого является присутствие незрелых ретикулоцитов в крови.

**[00291]** Изучали изменения состава ретикулоцитов в крови мышей дикого типа (в эксперименте 1) и th3/+ мышей (в эксперименте 2) в группах, получавших различные виды обработки. На **фиг. 12** показан иллюстративный состав ретикулоцитов, проанализированный с помощью автоматизированного анализатора клеток крови (например, с помощью анализатора ADIVA) в канале ретикулоцитов. На полученном иллюстративном графике рассеянного поглощения для ретикулоцитов (**фиг. 12**) Н-ретикулоциты представляют собой ретикулоциты, которые характеризуются высокими уровнями поглощения для РНК (незрелые ретикулоциты), М-ретикулоциты представляют собой ретикулоциты, которые характеризуются умеренными уровнями поглощения для РНК, и L-ретикулоциты представляют собой ретикулоциты, которые характеризуются низкими уровнями поглощения для РНК (зрелые ретикулоциты). См., например, Mori et al., 2003, *Nephrology Dialysis Transplantation*, 18(suppl 4):416). Как показано на **фиг. 13А** и **13В**, состав ретикулоцитов в крови у мышей дикого типа изменялся после введения доз рапамицина или RAP-536 или после совместного введения доз обоих средств. В частности, процентная доля Н-ретикулоцитов повышалась и процентная доля М-ретикулоцитов снижалась после введения доз RAP-536. Общие показатели количества ретикулоцитов повышались после введения доз RAP-536. Возможно, введение доз RAP-536 индуцирует продуцирование и высвобождение из костного мозга большего количества ретикулоцитов, а также созревание большего количества ретикулоцитов в крови. Процентная доля Н-ретикулоцитов снижалась и процентные доли L- и М-ретикулоцитов повышались после введения доз рапамицина. Общие уровни ретикулоцитов в крови также снижались. Причиной этого может служить более быстрое созревание ретикулоцитов и/или увеличение продолжительности жизни RBC. Это еще один набор данных, который позволяет предположить, что механизмы действия луспатерцепта и рапамицина в отношении продуцирования эритроцитов являются разными, и показывает, почему совместное

введение доз демонстрирует аддитивный или синергический эффект (повышение уровней RBC или HGB в большей степени, чем при введении доз монотерапии).

**[00292]** На **фиг. 14А** и **14В** показано, что состав ретикулоцитов в крови у th3/+ мышей изменялся после введения доз рапамицина или RAP-536 или после совместного введения доз обоих средств. В частности, процентная доля Н-ретикулоцитов снижалась после введения доз рапамицина или RAP-536 или после совместного введения доз обоих средств у th3/+ мышей. Совместное введение доз рапамицина и RAP-536 не снижало общие показатели количества ретикулоцитов у th3/+ мышей. Тем не менее, процентная доля Н-ретикулоцитов значительно снижалась, что позволяет предположить, что, возможно, созревание/выживание ретикулоцитов улучшалось.

**[00293]** Изучали изменения веса тела мышей дикого типа (в эксперименте 1) и th3/+ мышей (в эксперименте 2) в группах, получавших различные виды обработки, как показано на **фиг. 15А** и **15В**. Изучали изменения размера селезенки мышей дикого типа (в эксперименте 1) и th3/+ мышей (в эксперименте 2) в группах, получавших различные виды обработки. Как показано на **фиг. 16А** и **16В**, размер селезенки th3/+ мышей нормализовался после совместного введения доз рапамицина и RAP-536. Таким образом, совместное введение доз не только снижало выраженность анемии, но также снижало увеличение размера селезенки у th3/+ мышей. Введение доз RAP-536 слегка увеличивало размер селезенки и введение доз рапамицина уменьшало размер селезенки у мышей дикого типа.

**[00294]** Изучали изменения частоты встречаемости эритробластов в костном мозге мышей дикого типа (в эксперименте 1) и th3/+ мышей (в эксперименте 2) в группах, получавших различные виды обработки. Как показано на **фиг. 17А** и **17В**, совместное введение доз рапамицина и RAP-536 снижало частоту встречаемости эритробластов в костном мозге у th3/+ мышей. В частности, соотношение эритробласты/CD45(+) в костном мозге являлось высоким у th3/+ мышей и нормализовалось посредством совместного введения доз рапамицина и RAP-536. На **фиг. 18А** и **18В** продемонстрировано, что большее количество ретикулоцитов продуцировалось и/или сохранялось в костном мозге у мышей дикого типа и th3/+ мышей после совместного введения доз рапамицина и RAP-536, чем после введения доз либо рапамицина, либо RAP-536 по отдельности. Соотношение ретикулоцитов и эритробластов повышалось у мышей дикого типа и у th3/+ мышей после введения доз RAP-536 и совместного введения доз рапамицина и RAP-536.

**[00295]** Также изучали изменения эритропоза в селезенке мышей дикого типа (в эксперименте 1) и th3/+ мышей (в эксперименте 2) в группах, получавших различные виды обработки. Как показано на **фиг. 19А** и **19В**, как введение доз RAP-536, так и совместное

введение доз обоих средств повышало частоту встречаемости клеток Ter119(+) в селезенке как мышей дикого типа, так и th3/+ мышей. На **фиг. 20А** продемонстрировано, что у мышей дикого типа введение доз RAP-536 повышало, а введение доз рапамицина снижало соотношение эритробласты/CD45(+) в селезенке. На **фиг. 21А** и **21В** продемонстрировано, что совместное введение доз рапамицина и RAP-536 обладало более слабыми прямыми эффектами в отношении эритропоэза в селезенке у th3/+ мышей, чем у мышей дикого типа. Соотношение ретикулоциты/эритробласты в селезенке мышей дикого типа было более высоким, чем в селезенке th3/+ мышей. Размер селезенки у th3/+ мышей снижался посредством введения доз рапамицина и совместного введения доз, но незначительно посредством введения доз RAP-536, поскольку RAP-536 индуцировал эритропоэз в селезенке. Было отмечено, что соотношение ретикулоциты/эритробласты в селезенке мышей дикого типа было намного более высоким по сравнению с соотношением ретикулоциты/эритробласты у th3/+ мышей. Это объясняется тем, что у мышей дикого типа уровни эритробластов являются очень низкими и ретикулоциты в селезенке мышей дикого типа не являются ретикулоцитами, которые там продуцируются. Они находятся там по другой причине.

## 8. ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

**Таблица 1.** Информация о последовательности

SEQ ID NO.	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
1	Растворимая (внеклеточная) процессированная полипептидная последовательность человеческого ActRIIB с 6 удаленными N-концевыми аминокислотами домена EC и 4 удаленными C-концевыми	ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYA SWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENP QVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYERPP

SEQ ID NO.	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
	аминокислотами домена EC (аминокислоты 25- 130 из SEQ ID NO: 14) и с мутацией L79D	
2	Последовательность белка- предшественника человеческого ActRIIB (A64)	MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAETRECIYYNANW ELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELV KKGCVLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFC NERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIGG LSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPSPLVG LKPLQLLEIKARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQD KQSWQSEREIFSTPGMKHENLLQFIAAEKRGSNLEVEL WLITAFHDKGSLTDYLGKNIITWNECHVAETMSRGL SYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTA VLADFGLA VRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEG AINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVD EYMLPFEEEIGQHPSEELQEVVVKKMRPTIKDHWL KHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIR RSVNGTTSCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI
3	Растворимая (внеклеточная) процессированная полипептидная последовательность человеческого ActRIIB (аминокислоты 19- 134 из SEQ ID NO:2)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDK RLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEP PTAPT

SEQ ID NO.	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
4	<p>Растворимая (внеклеточная) процессированная полипептидная последовательность человеческого ActRIB с 15 удаленными C- концевыми аминокислотами (аминокислоты 19- 119 из SEQ ID NO:2)</p>	<p>SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDK RLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA</p>
5	<p>Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок- предшественник человеческого ActRIB (A64)</p>	<p>ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGG GGATCGCTGTGGCCCGGCTCTGGGCGTGGGGAGGCT GAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCAACTG GGAGCTGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGC GCTGCGAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGC TACGCCTCCTGGGCCAACAGCTCTGGCACCATCGAG CTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAAC TGCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGA GAACCCCCAGGTGTA CT TCTGCTGCTGTGAAGGCAA CTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTTGCCAGAGGC TGGGGGCCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCGA CAGCCCCACCCTGCTCACGGTGCTGGCCTACTCAC TGCTGCCCATCGGGGGCCTTTCCCTCATCGTCCTGCT GGCCTTTTGGATGTACCGGCATCGCAAGCCCCCCTA CGGTCATGTGGACATCCATGAGGACCCTGGGCCTCC ACCACCATCCCCTCTGGTGGGCCTGAAGCCACTGCA GCTGCTGGAGATCAAGGCTCGGGGGCGCTTTGGCTG TGTCTGGAAGGCCAGCTCATGAATGACTTTGTAGC TGCAAGATCTTCCCACTCCAGGACAAGCAGTCGTG</p>

SEQ ID NO.	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
		<p>GCAGAGTGAACGGGAGATCTTCAGCACACCTGGCAT  GAAGCACGAGAACCTGCTACAGTTCATTGCTGCCGA  GAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAGCTGTGGCT  CATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCCTCACGGA  TTACCTCAAGGGGAACATCATCACATGGAACGAACT  GTGTCATGTAGCAGAGACGATGTCACGAGGCCTCTC  ATACCTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGCCGTGGCGA  GGGCCACAAGCCGTCTATTGCCACAGGGACTTTAA  AAGTAAGAATGTATTGCTGAAGAGCGACCTCACAGC  CGTGCTGGCTGACTTTGGCTTGGCTGTTGATTTGAG  CCAGGGAAACCTCCAGGGGACACCCACGGACAGGT  AGGCACGAGACGGTACATGGCTCCTGAGGTGCTCGA  GGGAGCCATCAACTTCCAGAGAGATGCCTTCCTGCG  CATTGACATGTATGCCATGGGGTTGGTGCTGTGGGA  GCTTGTGTCTCGCTGCAAGGCTGCAGACGGACCCGT  GGATGAGTACATGCTGCCCTTTGAGGAAGAGATTGG  CCAGCACCCCTTCGTTGGAGGAGCTGCAGGAGGTGGT  GGTGACAAGAAGATGAGGCCACCATTAAAGATC  ACTGGTTGAAACACCCGGGCCTGGCCCAGCTTTGTG  TGACCATCGAGGAGTGCTGGGACCATGATGCAGAG  GCTCGCTTGTCCGCGGGCTGTGTGGAGGAGCGGGTG  TCCCTGATTCGGAGGTCCGTCAACGGCACTACCTCG  GACTGTCTCGTTTCCCTGGTGACCTCTGTCACCAATG  TGGACCTGCCCCCTAAAGAGTCAAGCATCTAA</p>
6	<p>Слитый белок,  содержащий  растворимый  внеклеточный домен  ActRIIB (A64; SEQ  ID NO:3), слитый с  Fc-доменом</p>	<p>SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDK  RLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECV  ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEP  PTAPTGGGTHTCPPELLEGGPSVFLFPPKPKDTLMI  SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN  KALPVPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV</p>

SEQ ID NO.	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
		SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
7	Слитый белок, содержащий растворимый внеклеточный домен ActRIIB (A64) с 15 удаленными C-концевыми аминокислотами (SEQ ID NO:4), слитый с Fc-доменом	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
8	Растворимая (внеклеточная) процессированная полипептидная последовательность человеческого ActRIIB с 6 удаленными N-концевыми аминокислотами домена EC и 5 удаленными C-концевыми аминокислотами домена EC (аминокислоты 25-129 из SEQ ID NO:	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEP

SEQ ID NO.	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
	14) и с мутацией L79D	
9	<p>Растворимая (внеклеточная) процессированная полипептидная последовательность человеческого ActRIIB с 6 удаленными N-концевыми аминокислотами домена EC и 3 удаленными C-концевыми аминокислотами домена EC (аминокислоты 25-131 из SEQ ID NO: 14) и с мутацией L79D</p>	<p>ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYA SWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENP QVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPT</p>
10	<p>Непроцессированный слитый белок ActRIIB-Fc с 6 удаленными N-концевыми аминокислотами домена EC и 3 удаленными C-концевыми аминокислотами</p>	<p>MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSPGAAETRECIYYNAN WELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIEL VKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNF CNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTGGGTHTCPPCPAPPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHREALHNHYTQKLSLSPGK</p>

SEQ ID NO.	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
	<p>домена ЕС (аминокислоты 25-131 из SEQ ID NO:14), и с мутацией L79D, и с лидерной последовательностью ТРА</p>	
11	<p>Процессированный слитый белок ActRIIB-Fc с 6 удаленными N-концевыми аминокислотами домена ЕС и 3 удаленными C-концевыми аминокислотами домена ЕС (аминокислоты 25-131 из SEQ ID NO: 14) и с мутацией L79D (луспатерцепт)</p>	<p>ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYA SWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENP QVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTGGGT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
12	<p>Растворимая (внеклеточная) процессированная полипептидная последовательность человеческого ActRIIB</p>	<p>GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKR LHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDDFNCYDRQECVA TEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPP TAPT</p>

SEQ ID NO.	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
	(аминокислоты 20-134 из SEQ ID NO:2)	
13	Растворимая (внеклеточная) процессированная полипептидная последовательность человеческого ActRIIB с 15 удаленными C- концевыми аминокислотами (аминокислоты 20-119 из SEQ ID NO:2)	GRGAEETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKR LHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVA TEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA
14	Последовательность белка- предшественника человеческого ActRIIB (R64)	MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAETRECIYYNANW ELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELV KKGCVLDDFNCYDRQECVA TEENPQVYFCCCEGNFC NERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIGG LSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPPSPLVG LKPLQLLEIKARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQD KQSWQSEREIFSTPGMKHENLLQFIAAEKRGSNLEVEL WLITAFHDKGSLTDYLGNIITWNECHVAETMSRGL SYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTA VLADFGLA VRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEG AINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVD EYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVHKKMRPTIKDHWL KHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIR RSVNGTTS DCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI
15	Растворимая (внеклеточная) процессированная	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDK RLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECV

SEQ ID NO.	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
	полипептидная последовательность человеческого ActRIIB (аминокислоты 19- 134 из SEQ ID NO:14)	ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPP PTAPT
16	Растворимая (внеклеточная) процессированная полипептидная последовательность человеческого ActRIIB с 15 удаленными C- концевыми аминокислотами (аминокислоты 19- 119 из SEQ ID NO:14)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDK RLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECV ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA
17	Растворимая (внеклеточная) процессированная полипептидная последовательность человеческого ActRIIB (аминокислоты 20- 134 из SEQ ID NO:14)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKR LHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVA TEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPP TAPT
18	Растворимая (внеклеточная) процессированная полипептидная	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKR LHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVA TEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA

SEQ ID NO.	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
	<p>последовательность человеческого ActRIIB с 15 удаленными C- концевыми аминокислотами (аминокислоты 20- 119 из SEQ ID NO:14)</p>	
19	<p>Растворимая (внеклеточная) процессированная полипептидная последовательность человеческого ActRIIB с 6 удаленными N- концевыми аминокислотами домена EC и 3 удаленными C- концевыми аминокислотами домена EC (аминокислоты 25- 131 из SEQ ID NO: 2) и с мутацией L79D</p>	<p>ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYA SWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENP QVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPT</p>
20	<p>Непроцессированный слитый белок ActRIIB-Fc с 6 удаленными N- концевыми</p>	<p>MDAMKRGLCCVLLCGAVFVSPGAAETRECIYYNAN WELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIEL VKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNF CNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTGGGTHTCPPCPPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV</p>

SEQ ID NO.	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
	<p>аминокислотами домена ЕС и 3 удаленными C- концевыми аминокислотами домена ЕС (аминокислоты 25- 131 из SEQ ID NO:2), и с мутацией L79D, и с лидерной последовательность ю ТРА</p>	<p>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>
21	<p>Процессированный слитый белок ActRIIB-Fc с 6 удаленными N- концевыми аминокислотами домена ЕС и 3 удаленными C- концевыми аминокислотами домена ЕС (аминокислоты 25- 131 из SEQ ID NO: 2) и с мутацией L79D</p>	<p>ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYA SWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENP QVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTGGGT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>
22	<p>Растворимая (внеклеточная) процессированная полипептидная последовательность</p>	<p>GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKR LHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVA TEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPT TAPT</p>

SEQ ID NO.	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
	<p>человеческого ActRIIB (аминокислоты 20-134 из SEQ ID NO:14) с мутацией L79D</p>	
23	<p>Растворимая (внеклеточная) процессированная полипептидная последовательность человеческого ActRIIB (аминокислоты 20-134 из SEQ ID NO:2) с мутацией L79D</p>	<p>GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKR LHCYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVA TEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPP TAPT</p>
24	<p>Растворимая (внеклеточная) процессированная полипептидная последовательность человеческого ActRIIB (аминокислоты 20-134 из SEQ ID NO:14) с мутацией L79D, слитая с Fc-доменом с линкером GGG</p>	<p>GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKR LHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVA TEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPP TAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>
25	<p>Растворимая (внеклеточная) процессированная полипептидная</p>	<p>GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKR LHCYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVA TEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPP TAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS</p>

SEQ ID NO.	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
	<p>последовательность человеческого ActRIIB (аминокислоты 20-134 из SEQ ID NO:2) с мутацией L79D, слитая с Fc-доменом</p>	<p>RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK                      PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK                      ALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL                      TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS                      FFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQK                      SLSLSPGK</p>
26	<p>Растворимая (внеклеточная) процессированная полипептидная последовательность человеческого ActRIIB (аминокислоты 20-134 из SEQ ID NO: 14) с мутацией L79D, слитая с Fc-доменом и лидерной последовательностью ТРА</p>	<p>MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIY                      YNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSS                      GTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCC                      CEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTC                      PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD                      VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR                      VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISK                      AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS                      DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD                      KSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>
27	<p>Растворимая (внеклеточная) процессированная полипептидная последовательность человеческого ActRIIB (аминокислоты 20-134 из SEQ ID NO: 2) с мутацией L79D,</p>	<p>MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIY                      YNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSS                      GTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCC                      CEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTC                      PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD                      VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR                      VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISK                      AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS                      DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD                      KSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK</p>

SEQ ID NO.	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
	слитая с Fc-доменом и лидерной последовательностью ТРА	
28	Растворимая (внеклеточная) процессированная полипептидная последовательность человеческого ActRIIB, содержащая вариантную С-концевую последовательность (раскрытую в WO 2007/053775)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKR LHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVA TEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWASTT IPSGGPEATAAAGDQGS GALWLCLEGPAHE
29	Растворимая (внеклеточная) процессированная полипептидная последовательность человеческого ActRIIB, содержащая вариантную С-концевую последовательность (раскрытую в WO 2007/053775), имеющую мутацию L79D	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKR LHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVA TEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWASTT IPSGGPEATAAAGDQGS GALWLCLEGPAHE

SEQ ID NO.	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
30	<p>Растворимая (внеклеточная) процессированная полипептидная последовательность человеческого ActRIIB, содержащая вариантную C-концевую последовательность (раскрытую в WO 2007/053775), имеющую мутацию L79D, слитую с Fc-доменом с линкером TGGG</p>	<p>GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKR  LHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVA  TEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWASTT  IPSGGPEATAAAGDQGS GALWLCLEGPAHETGGGTHT  CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVV  DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY  RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS  KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP  SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV  DKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
31	<p>Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SEQ ID NO:10</p>	<p>ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTG  CTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCCCGGCC  GCCGAAACCCGCGAATGTATTTATTACAATGCTAAT  TGGGAACTCGAACGGACGAACCAATCCGGGCTCGA  ACGGTGTGAGGGGGAACAGGATAAACGCCTCCATT  GCTATGCGTCGTGGAGGAACTCCTCCGGGACGATTG  AACTGGTCAAGAAAGGGTGCTGGGACGACGATTT  AATTGTTATGACCGCCAGGAATGTGTGCGGACCGAA  GAGAATCCGCAGGTCTATTTCTGTTGTTGCGAGGGG  AATTTCTGTAATGAACGGTTTACCCACCTCCCCGAA  GCCGGCGGGCCCGAGGTGACCTATGAACCCCGCCC  ACCGGTGGTGGAACTCACACATGCCACCGTGCCCA  GCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC  TTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCC  CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTG</p>

SEQ ID NO.	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
		<p>AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC  GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA  GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTG  TGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC  TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC  AAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC  AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA  CACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGA  ACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT  ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT  GGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCC  CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGC  AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG  GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT  GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC  CCCGGGTAAATGA</p>
32	<p>Слитый белок,  содержащий  растворимый  внеклеточный домен  ActRIIB (R64; SEQ  ID NO:15), слитый с  Fc-доменом</p>	<p>SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDK  RLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECV  ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEP  PTAPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI  SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN  KALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV  SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD  GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT  QKLSLSLSPGK</p>
33	<p>Слитый белок,  содержащий  растворимый  внеклеточный домен  ActRIIB (R64) с 15</p>	<p>SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDK  RLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECV  ATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGGTHTCPPC  PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH  EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS</p>

SEQ ID NO.	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ	
	удаленными C-концевыми аминокислотами (SEQ ID NO:16), слитый с Fc-доменом	VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
34	Последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует SEQ ID NO: 11 и тканевый активатор плазминогена (последовательность сигнального пептида ТРА) (последовательность сигнального пептида ТРА подчеркнута и показана жирным шрифтом).	<u>ATGGATGCAATGAAGAGA</u> <u>CTGCTGTGTGGAGCAGTC</u> GCCGAAACCCGCGAATGT TGGGAACCTCGAACGGACG CGGTGTGAGGGGGAACAG TATGCGTCGTGGAGGAAC CTGGTCAAGAAAGGGTGC TGTTATGACCGCCAGGAA AATCCGCAGGTCTATTTCT TTCTGTAATGAACGGTTT GGCGGGCCCGAGGTGACC GGTGGTGGAACTCACACA CCTGAACTCCTGGGGGGA CCCCCAAAACCCAAGGAC ACCCCTGAGGTCACATGC CACGAAGACCCTGAGGTC GACGGCGTGGAGGTGCAT CGGGAGGAGCAGTACAAC AGCGTCCTCACCGTCCTG GGCAAGGAGTACAAGTGC CTCCCAGCCCCATCGAG AAAGGGCAGCCCCGAGAA CCCCCATCCCGGGAGGAG AGCCTGACCTGCCTGGTC GACATCGCCGTGGAGTGG GAGAACAACCTACAAGACC	<u>GGGCTCTGCTGTGTGCTG</u> <u>TTCGTTTTCGCCCGGCGCC</u> ATTTATTACAATGCTAAT AACCAATCCGGGCTCGAA GATAAACGCCTCCATTGC TCCTCCGGGACGATTGAA TGGGACGACGATTTCAAT TGTGTCGCGACCGAAGAG TGTGTTGCGAGGGGAAT ACCCACCTCCCCGAAGCC TATGAACCCCCGCCACC TGCCCACCGTGCCCAGCA CCGTCAGTCTTCTCTTC ACCCTCATGATCTCCCGG GTGGTGGTGGACGTGAGC AAGTTCAACTGGTACGTG AATGCCAAGACAAAGCCG AGCACGTACCGTGTGGTC CACCAGGACTGGCTGAAT AAGGTCTCCAACAAAGCC AAAACCATCTCCAAGCC CCACAGGTGTACACCCTG ATGACCAAGAACCAGGTC AAAGGCTTCTATCCAGC GAGAGCAATGGGCAGCCG ACGCCTCCCGTGCTGGAC

SEQ ID NO.	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ	
		TCCGACGGCTCCTTCTTC GTGGACAAGAGCAGGTGG TCATGCTCCGTGATGCAT TACACGCAGAAGAGCCTC TGA	CTCTATAGCAAGCTCACC CAGCAGGGGAACGTCTTC GAGGCTCTGCACAACCAC TCCCTGTCTCCGGGTA

## 9. ЭКВИВАЛЕНТЫ

**[00296]** Хотя настоящее изобретение подробно описано со ссылкой на его конкретные варианты осуществления, следует понимать, что в объем настоящего изобретения входят варианты, которые являются функционально эквивалентными. Действительно, различные модификации настоящего изобретения в дополнение к тем, которые показаны и описаны в данном документе, станут очевидными для специалистов в данной области из приведенного выше описания и прилагаемых графических материалов. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения. Специалисты в данной области узнают или смогут установить с применением не более чем обычных экспериментов многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются следующей формулой изобретения.

**[00297]** Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящее описание посредством ссылки в той же степени, как если бы было конкретно и отдельно указано, что каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий  
введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и  
введение субъекту ингибитора mTOR.
2. Способ по п. 1, где анемия представляет собой анемию, ассоциированную с неэффективным эритропоэзом, талассемией, альфа-талассемией, бета-талассемией, миелодиспластическими синдромами (MDS) или непролиферативным хроническим миеломоноцитарным лейкозом (CMML).
3. Способ по п. 1 или п. 2, где ингибитор mTOR представляет собой рапамицин.
4. Способ по любому из пп. 1–3, где ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат рапамицина.
5. Способ по любому из пп. 1–4, где лиганд-ловушка ActRIIB представляет собой полипептид, содержащий последовательность,
  - (a) на 90% идентичную SEQ ID NO:11;
  - (b) на 95% идентичную SEQ ID NO:11;
  - (c) на 98% идентичную SEQ ID NO:11, или
  - (d) SEQ ID NO:11.
6. Способ по любому из пп. 1–5, где лиганд-ловушка ActRIIB представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:11.
7. Способ по любому из пп. 1–6, где способ обеспечивает повышение уровней гемоглобина (HGB) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни HGB у субъекта до указанного лечения.
8. Способ по любому из пп. 1–7, где способ обеспечивает повышение уровней гематокрита (HCT) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%,

5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни НСТ у субъекта до указанного лечения.

9. Способ по любому из пп. 1–8, где способ обеспечивает снижение уровней среднего корпускулярного объема (MCV) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, или 100%, более низких, чем уровни MCV у субъекта до указанного лечения.

10. Способ по любому из пп. 1–9, где способ обеспечивает повышение уровней концентрации корпускулярного гемоглобина (CHC) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни CHC у субъекта до указанного лечения.

11. Способ по любому из пп. 1–10, где способ обеспечивает снижение уровней ширины распределения эритроцитов по объему (RDW) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, или 100%, более низких, чем уровни RDW у субъекта до указанного лечения.

12. Способ по любому из пп. 1–11, где уровни ретикулоцитов у субъекта остаются в диапазоне, соответствующем или на приблизительно 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, или 20% выше или ниже уровней ретикулоцитов у субъекта до указанного лечения.

13. Способ по любому из пп. 1–11, где уровни ретикулоцитов у субъекта остаются в диапазоне, соответствующем или на приблизительно 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, или 20% выше или ниже уровней ретикулоцитов в эталонной популяции.

14. Способ по любому из пп. 1–13, где уровни лейкоцитов у субъекта остаются в диапазоне, соответствующем или на приблизительно 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%,

7%, 8%, 9%, 10%, 15%, или 20% выше или ниже уровней лейкоцитов у субъекта до указанного лечения.

15. Способ по любому из пп. 1–13, где уровни лейкоцитов у субъекта остаются в диапазоне, соответствующем или на приблизительно 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, или 20% выше или ниже уровней лейкоцитов в эталонной популяции.

16. Способ по любому из пп. 1–15, где ингибитор mTOR вводят до введения лиганда-ловушки ActRIIB или одновременно с ним.

17. Способ по любому из пп. 1–15, где субъект ранее получал лечение с помощью ингибитора mTOR до введения лиганда-ловушки ActRIIB.

18. Способ по любому из пп. 1–15, где субъект ранее получал лечение с помощью лиганда-ловушки ActRIIB до введения ингибитора mTOR.

19. Способ по любому из пп. 1–18, где субъект является независимым от переливания эритроцитов.

20. Способ по любому из пп. 1–18, где субъект является зависимым от переливания эритроцитов.

21. Способ по любому из пп. 1–20, где лиганд-ловушку ActRIIB вводят в дозе, составляющей 0,6 мг/кг, 0,8 мг/кг, 1 мг/кг, 1,33 мг/кг или 1,75 мг/кг.

22. Способ по любому из пп. 1–20, где лиганд-ловушку ActRIIB вводят субъекту один раз в 21 день.

23. Способ по любому из пп. 1–22, где лиганд-ловушку ActRIIB вводят субъекту подкожно.

24. Способ по любому из пп. 1–23, где субъектом является человек.

25. Способ по любому из п. 13, п. 15 и пп. 16–24, где эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов.

26. Способ по любому из п. 13, п. 15 и пп. 16–25, где эталонная популяция состоит из здоровых индивидуумов.

27. Способ по любому из п. 13, п. 15 и пп. 16–26, где эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект.

28. Способ по любому из пп. 1–27, где ингибитор mTOR вводят перорально.

29. Способ по любому из пп. 1–28, где ингибитор mTOR вводят в дозе, составляющей 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг, 10 мг/кг или 15 мг/кг.

30. Способ по любому из пп. 1–29, где ингибитор mTOR вводят ежедневно.

31. Способ лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий

введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и

введение субъекту ингибитора mTOR,

при этом способ обеспечивает повышение уровней гемоглобина (HGB) в эталонной популяции до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни HGB у субъекта, который получал либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно.

32. Способ лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий

введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и

введение субъекту ингибитора mTOR,

при этом способ обеспечивает повышение уровней гематокрита (HCT) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более

высоких, чем уровни HGB в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно.

33. Способ лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий

введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и

введение субъекту ингибитора mTOR,

при этом способ обеспечивает снижение уровней среднего корпускулярного объема (MCV) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более низких, чем уровни гемоглобина (HGB) в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно.

34. Способ лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий

введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и

введение субъекту ингибитора mTOR,

при этом способ обеспечивает повышение уровней концентрации корпускулярного гемоглобина (CHC) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более высоких, чем уровни гемоглобина (HGB) в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно.

35. Способ лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий

введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и

введение субъекту ингибитора mTOR,

при этом способ обеспечивает снижение уровней ширины распределения эритроцитов по объему (RDW) у субъекта до уровней, равных или на приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 200%, или 500% более низких, чем уровни гемоглобина (HGB) в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно.

36. Способ лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий

введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и

введение субъекту ингибитора mTOR,

при этом уровни ретикулоцитов у субъекта, отклоняющиеся от нормальных уровней ретикулоцитов, являются равными или на приблизительно 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, или 20% более низкими по сравнению с уровнями ретикулоцитов в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно.

37. Способ лечения анемии или усиления эритропоэза на поздней стадии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий

введение субъекту лиганда-ловушки ActRIIB и

введение субъекту ингибитора mTOR,

при этом уровни лейкоцитов у субъекта, отклоняющиеся от нормальных уровней ретикулоцитов, являются равными или на приблизительно 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, или 20% более низкими по сравнению с уровнями ретикулоцитов в эталонной популяции, которая получала либо лиганд-ловушку ActRIIB, либо ингибитор mTOR, но не совместно.

38. Способ по любому из пп. 31–37, где субъектом является человек.

39. Способ по любому из пп. 31–38, где эталонная популяция состоит из 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300, 400, 500, или 1000 индивидуумов.

40. Способ по любому из пп. 31–39, где эталонная популяция состоит из людей того же возраста, веса и/или пола, что и субъект.

41. Способ по любому из пп. 31–40, где эталонная популяция состоит из индивидуумов с анемией.

42. Способ по любому из пп. 31–41, где анемия представляет собой анемию, ассоциированную с неэффективным эритропоэзом, талассемией, альфа-талассемией, бета-

талассемией, миелодиспластическими синдромами (MDS) или непролиферативным хроническим миеломоноцитарным лейкозом (CMML).

43. Способ по любому из пп. 31–42, где ингибитор mTOR представляет собой рапамицин.

44. Способ по любому из пп. 31–43, где ингибитор mTOR представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат рапамицина.

45. Способ по любому из пп. 31–44, где лиганд-ловушка ActRIIB представляет собой полипептид, содержащий последовательность,

- (a) на 90% идентичную SEQ ID NO:11;
- (b) на 95% идентичную SEQ ID NO:11;
- (c) на 98% идентичную SEQ ID NO:11, или
- (d) SEQ ID NO:11.

46. Способ по любому из пп. 31–45, где лиганд-ловушка ActRIIB представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:11.

47. Способ по любому из пп. 31–46, где субъект является независимым от переливания эритроцитов.

48. Способ по любому из пп. 31–46, где субъект является зависимым от переливания эритроцитов.

49. Способ по любому из пп. 31–48, где лиганд-ловушку ActRIIB вводят в дозе, составляющей 0,6 мг/кг, 0,8 мг/кг, 1 мг/кг, 1,33 мг/кг или 1,75 мг/кг.

50. Способ по любому из пп. 31–49, где лиганд-ловушку ActRIIB вводят субъекту один раз в 21 день.

51. Способ по любому из пп. 31–50, где лиганд-ловушку ActRIIB вводят субъекту подкожно.

52. Способ по любому из пп. 31–51, где ингибитор mTOR вводят перорально.
53. Способ по любому из пп. 31–52, где ингибитор mTOR вводят в дозе, составляющей 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг, 10 мг/кг или 15 мг/кг.
54. Способ по любому из пп. 31–53, где ингибитор mTOR вводят ежедневно.

Exp1: Мыши дикого типа (C57BL/6J)

## Схема доклинического эксперимента

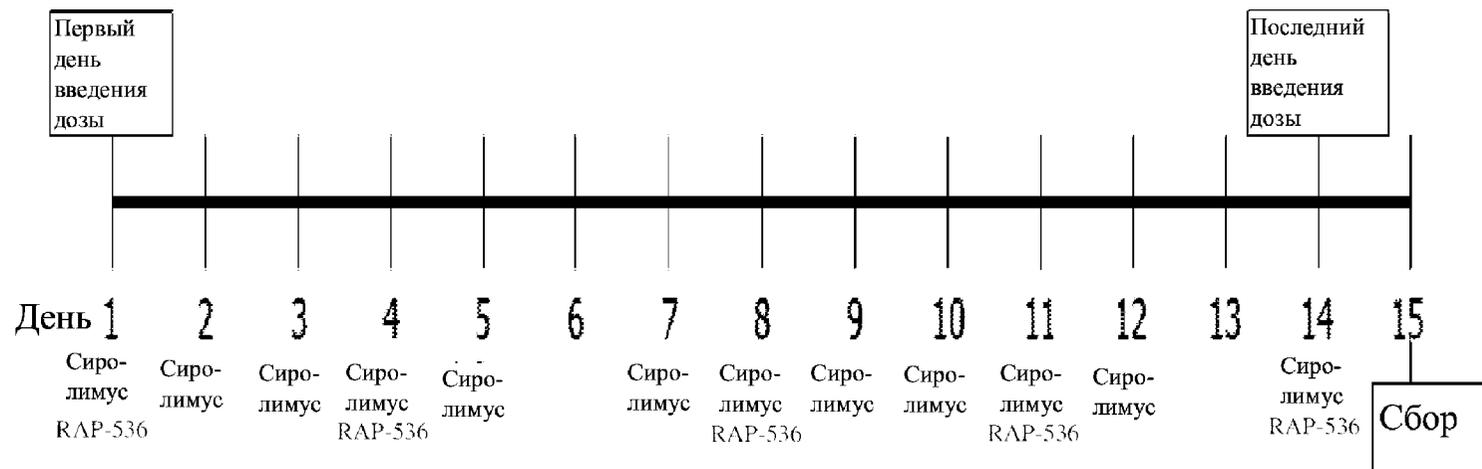
Exp2: th3/+ мыши



• 14 дней введения дозы

• Рапамицин/сиролимус: один раз в день (кроме воскресенья)

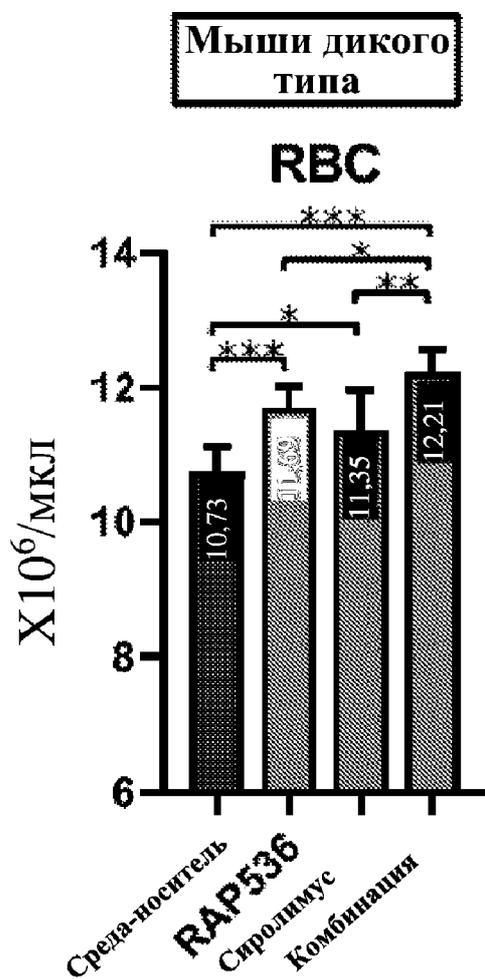
• RAP-536: два раз в неделю (включая первый и последний день введения дозы)  
\* введения дозы)



Фиг. 1

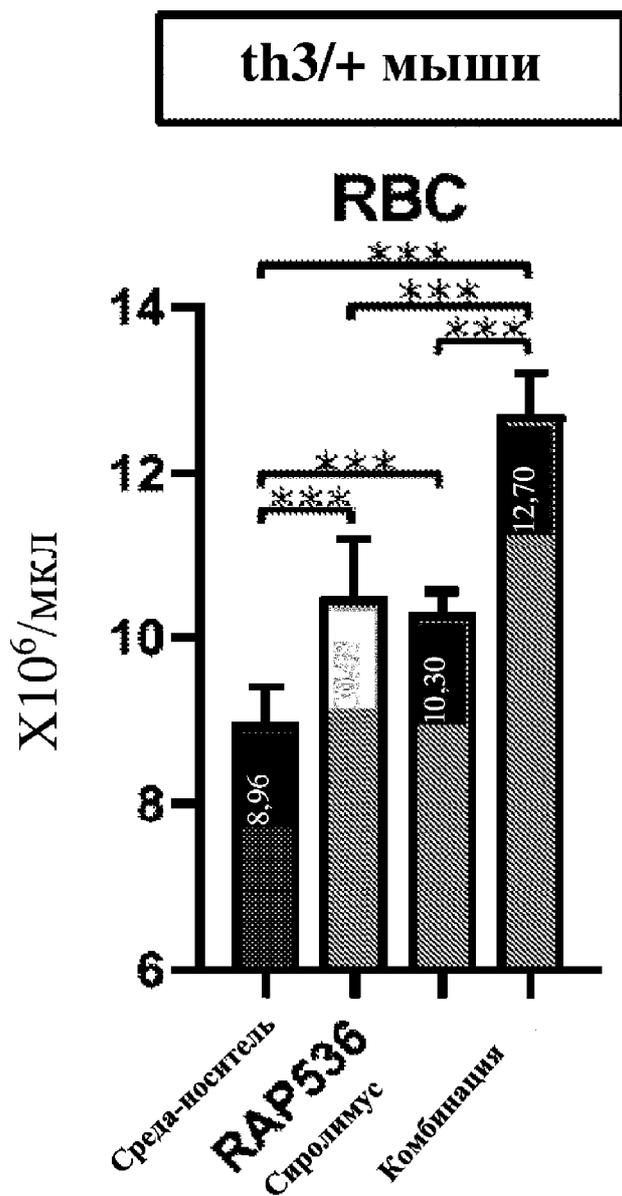
## Результаты СВС

\* p<0,05  
\*\* p<0,01  
\*\*\* p<0,001



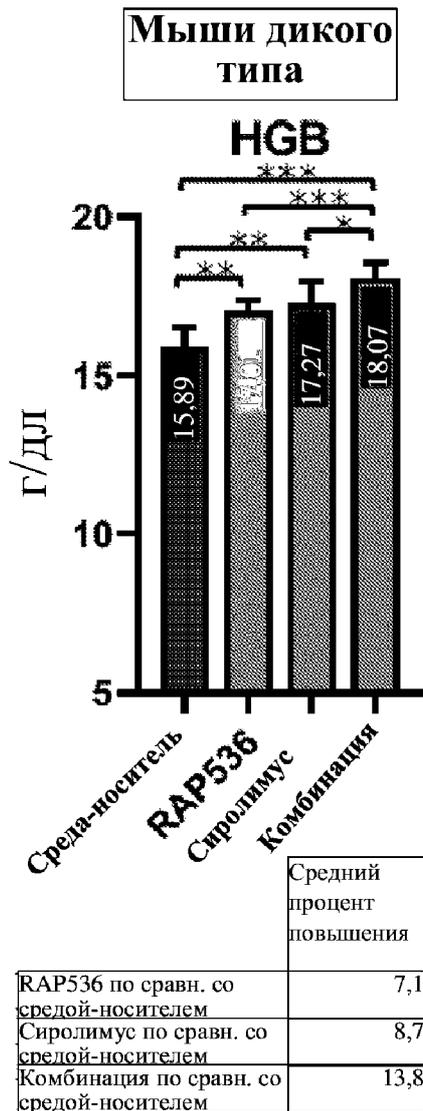
	Средний процент повышения
RAP536 по сравнению со средой-носителем	8,9
Сиролимус по сравнению со средой-носителем	5,7
Комбинация по сравнению со средой-носителем	13,8

Фиг. 2А

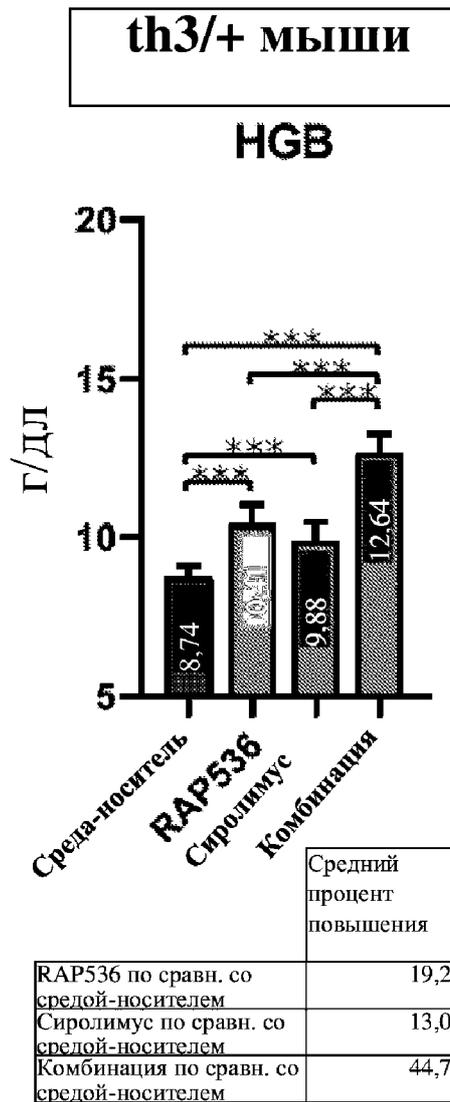


	Средний процент повышения
RAP536 по сравнению со средой-носителем	17,0
Сиролимус по сравнению со средой-носителем	15,0
Комбинация по сравнению со средой-носителем	41,8

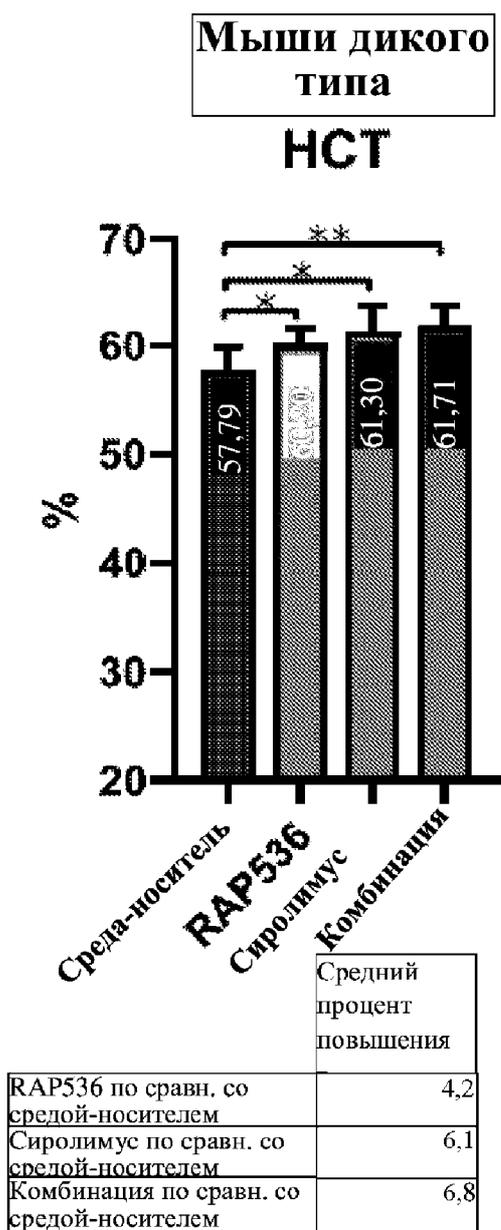
Фиг. 2В



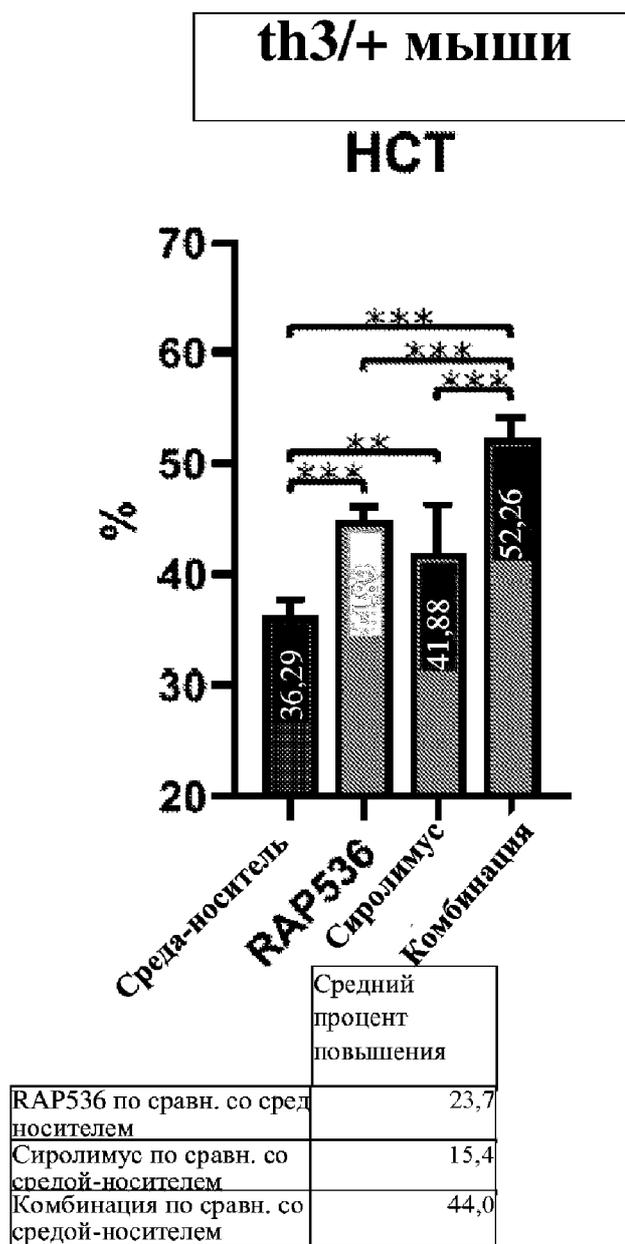
Фиг. 3А



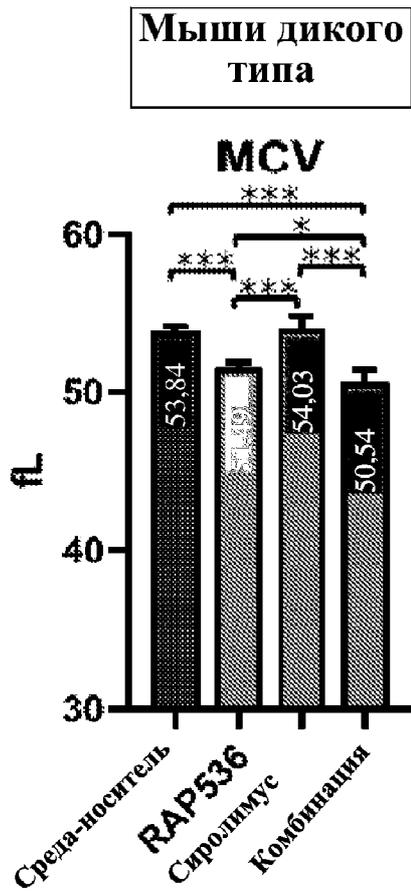
Фиг. 3В



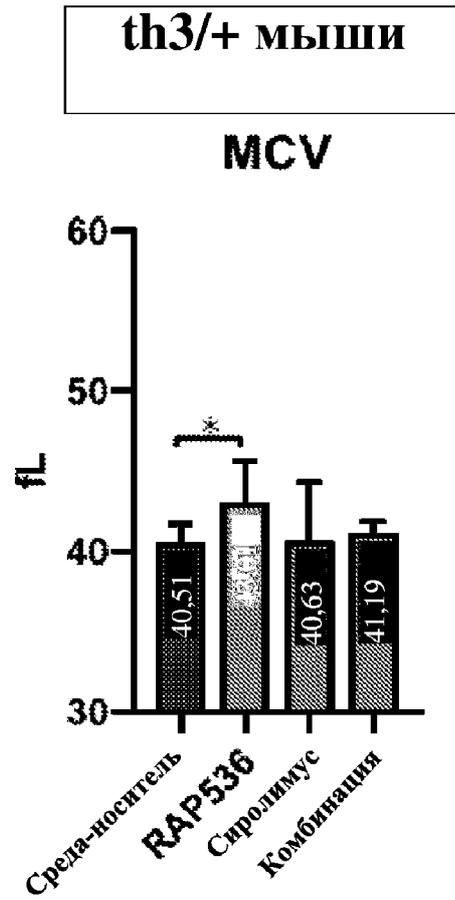
Фиг. 4А



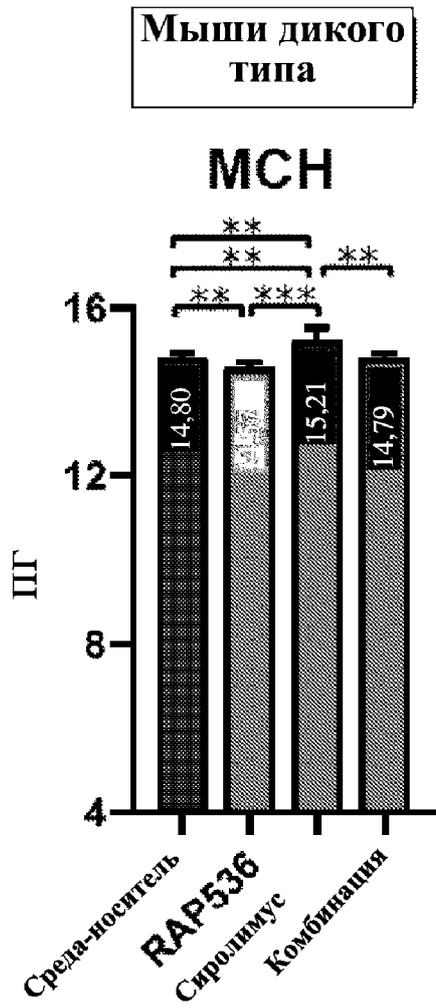
Фиг. 4В



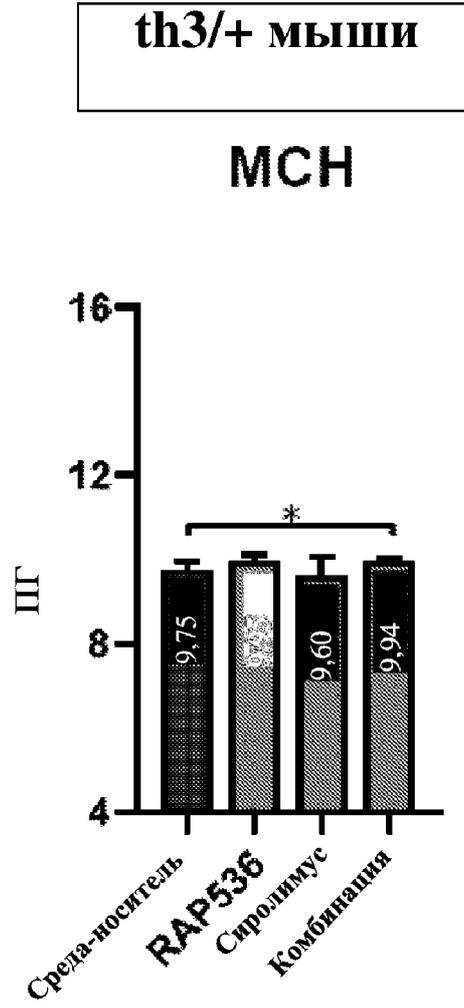
Фиг. 5А



Фиг. 5В



Фиг. 6А



Фиг. 6В

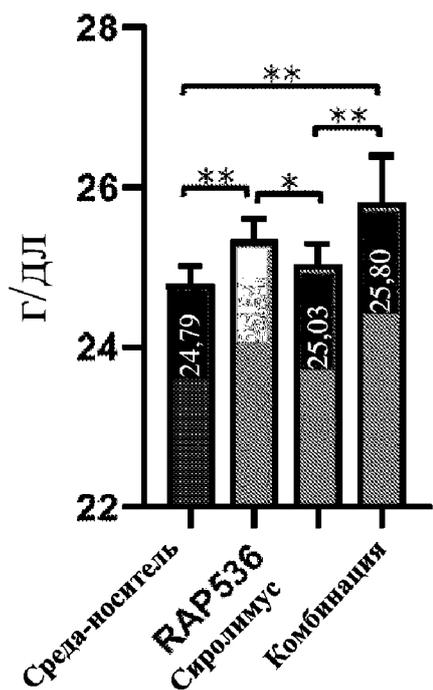
**Мыши дикого  
типа**

**th3/+ мыши**

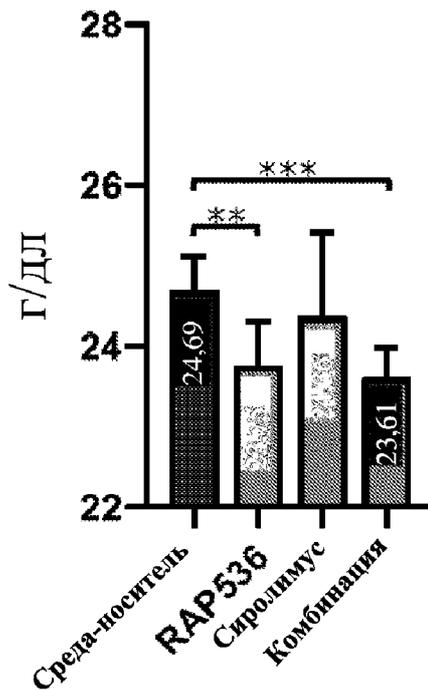
**СНС**

**СНС**

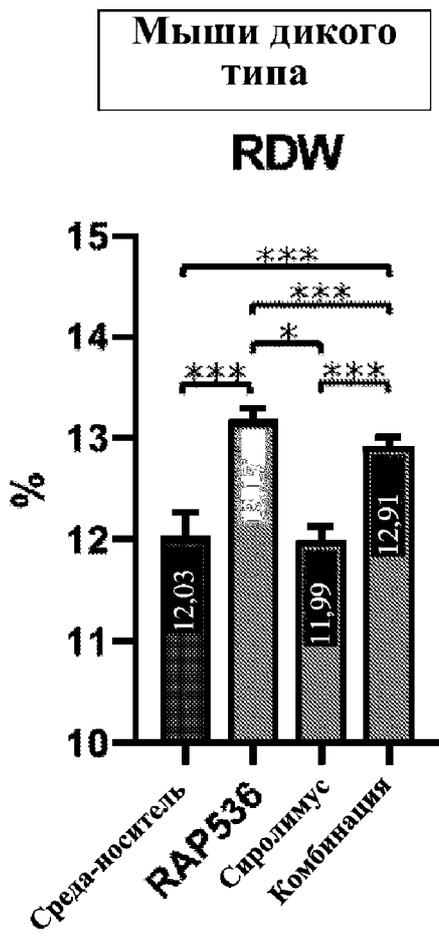
(Среднее значение концентрации (Среднее значение концентрации  
корпускулярного Hb)



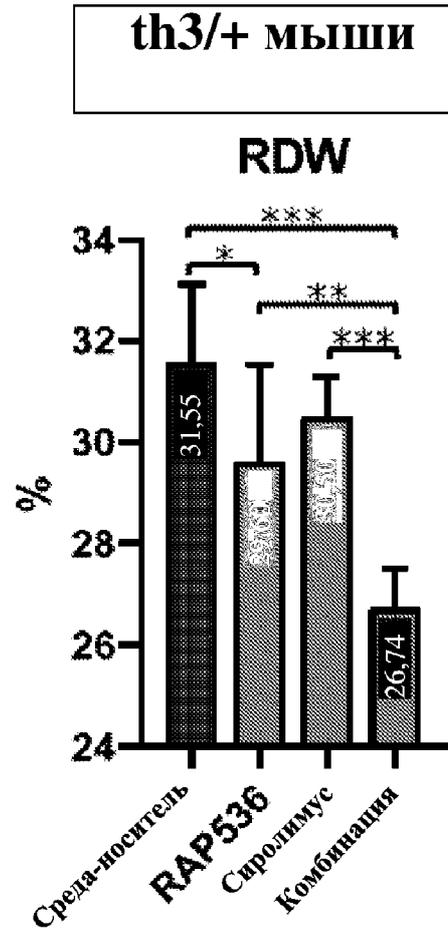
Фиг. 7А



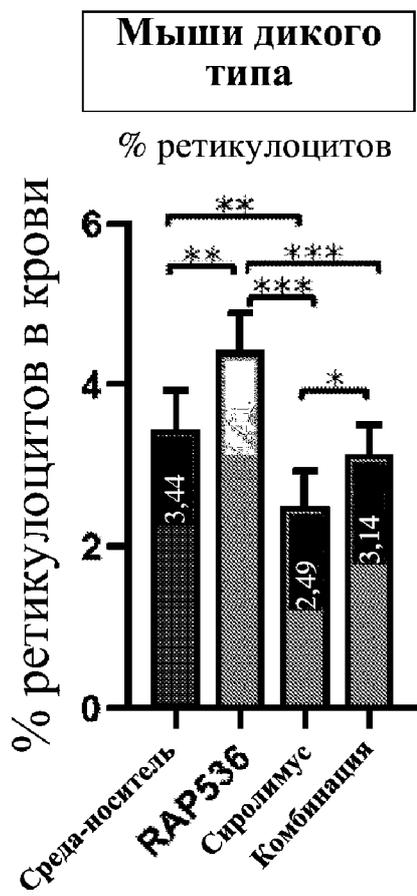
Фиг. 7В



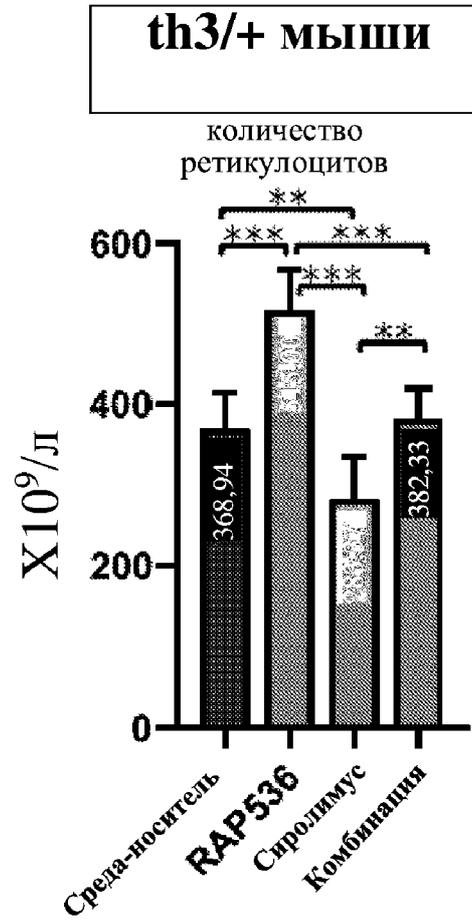
Фиг. 8А



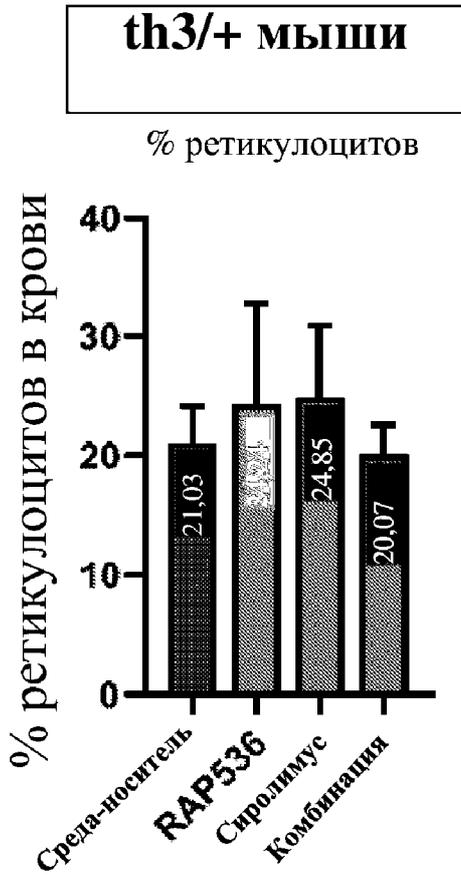
Фиг. 8В



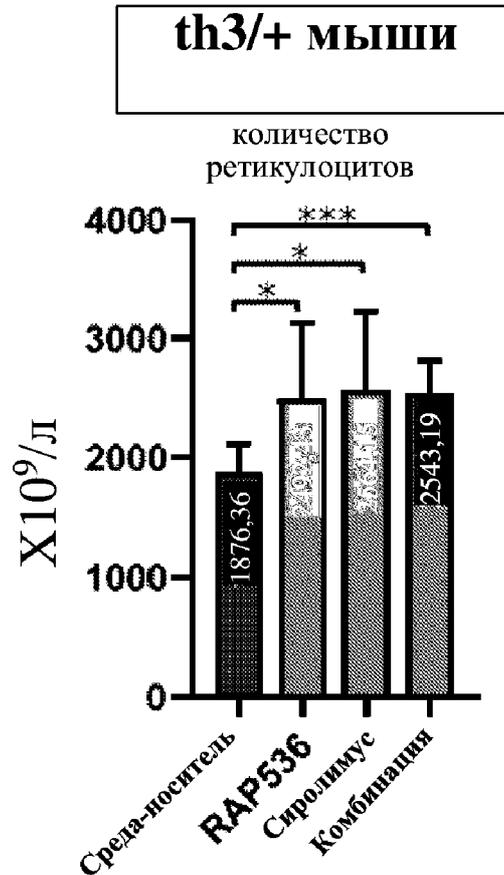
Фиг. 9А



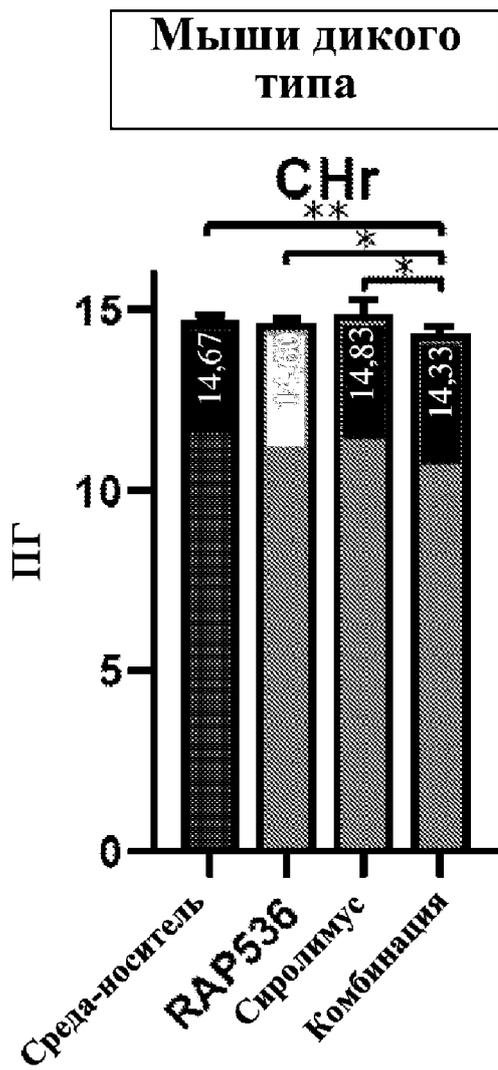
Фиг. 9В



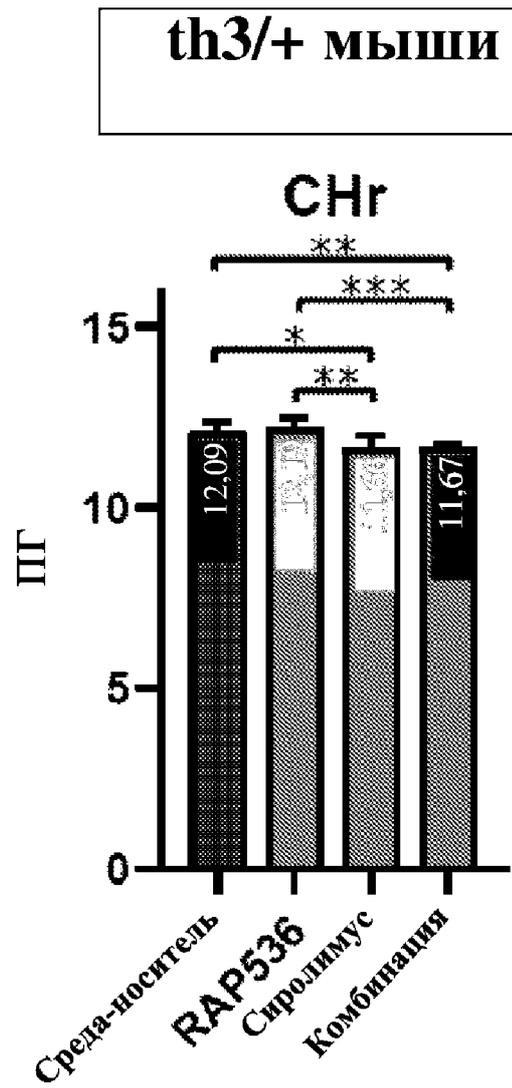
Фиг. 10А



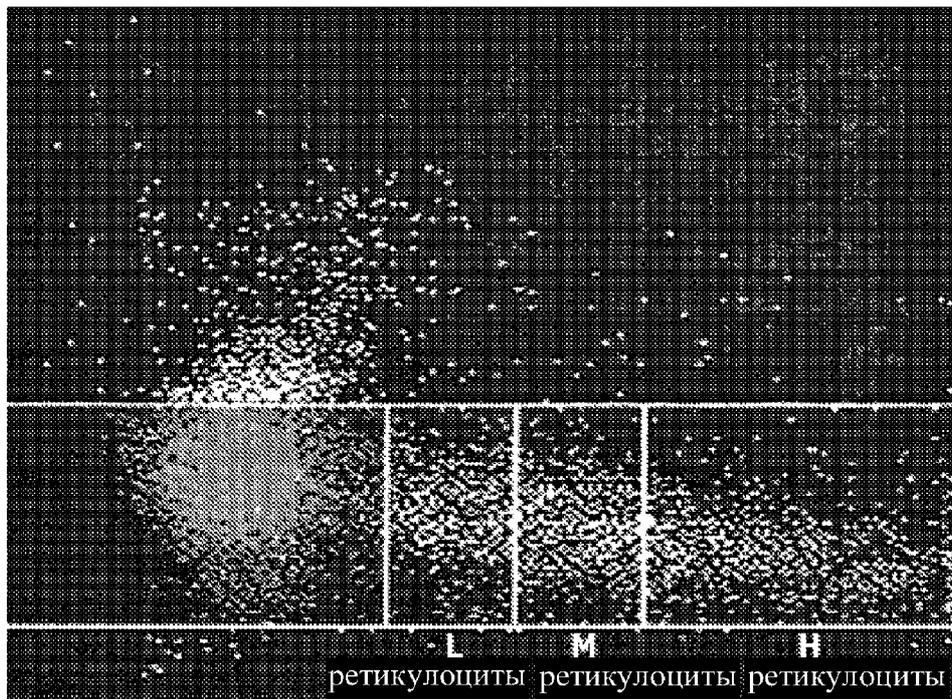
Фиг. 10В



Фиг. 11А

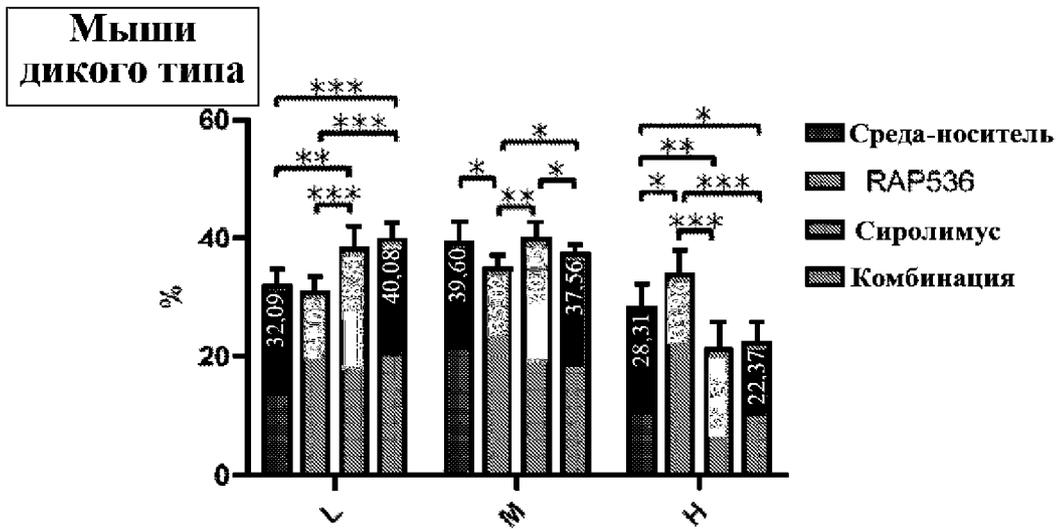


Фиг. 11В



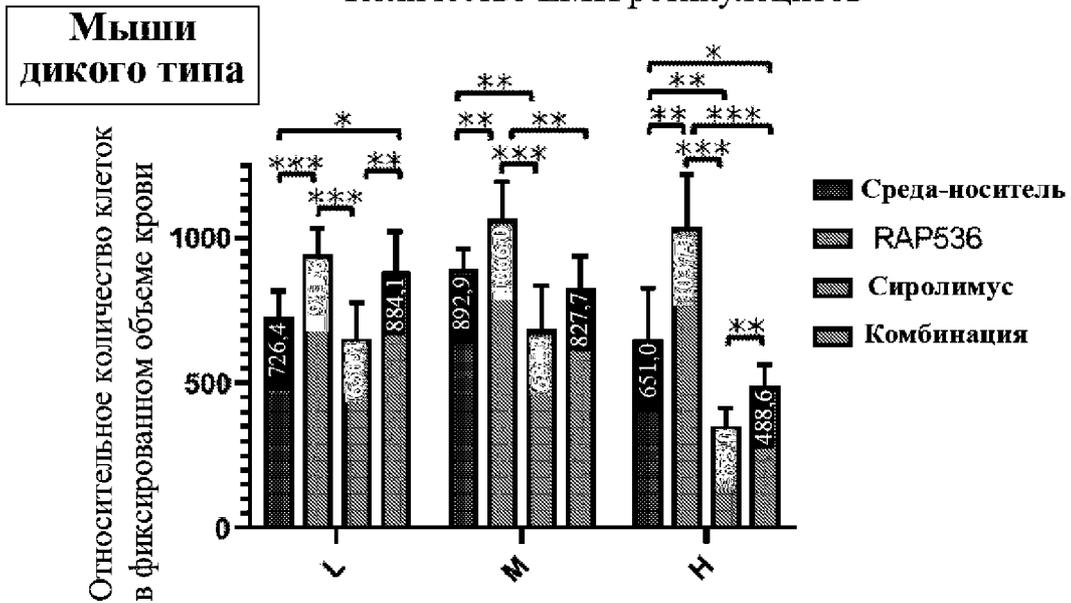
Фиг. 12

% LMH ретикулоцитов



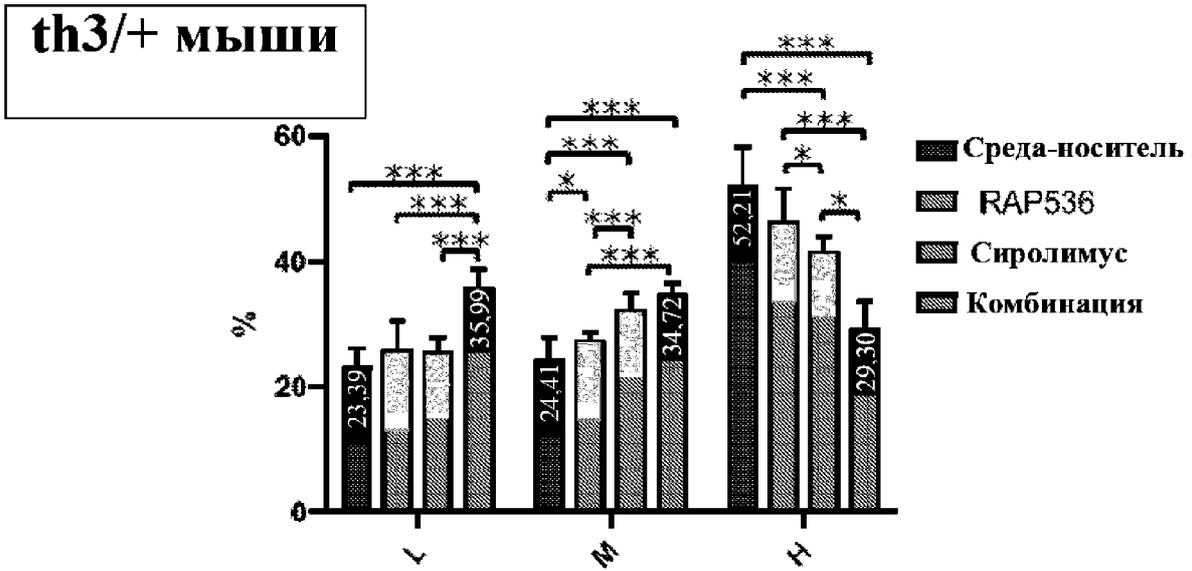
Фиг. 13А

Количество LMH ретикулоцитов



Фиг. 13В

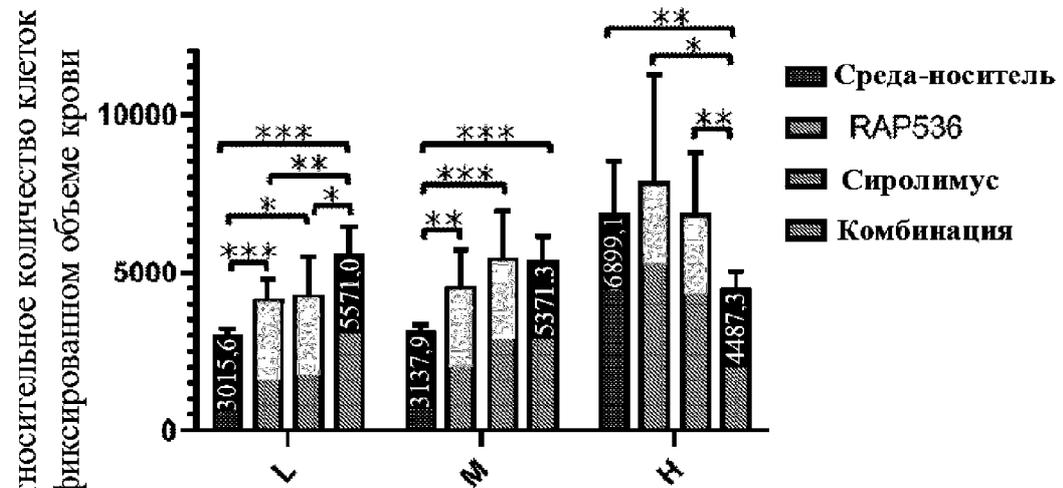
% LMH ретикулоцитов



Фиг. 14А

**th3/+ мыши**

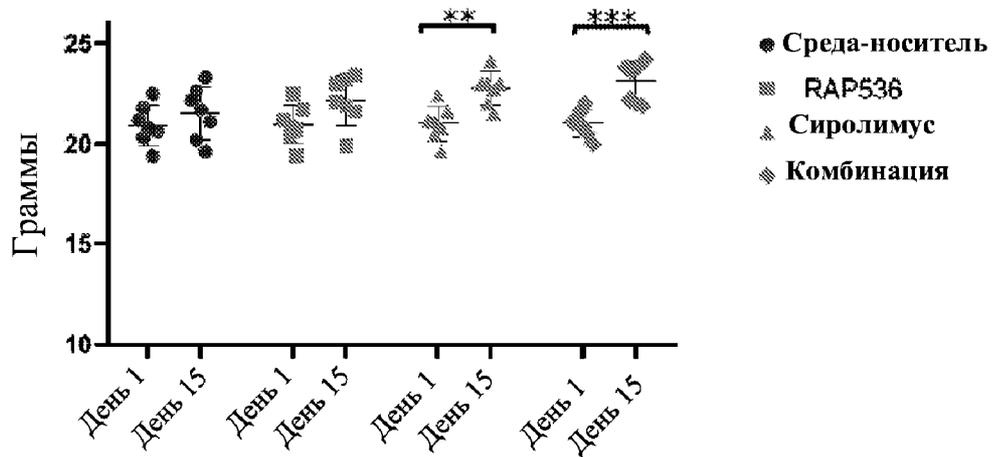
Количество LMH ретикулоцитов



Фиг. 14В

**Мыши  
дикого типа**

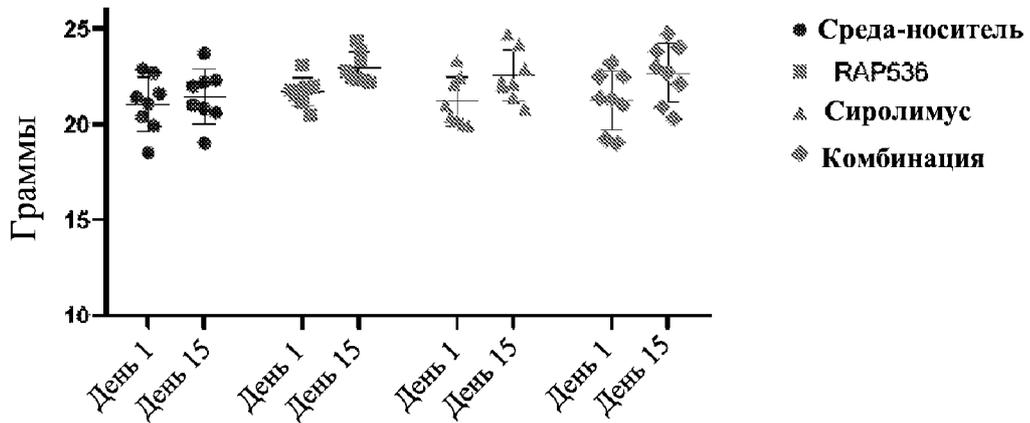
Вес тела (граммы)



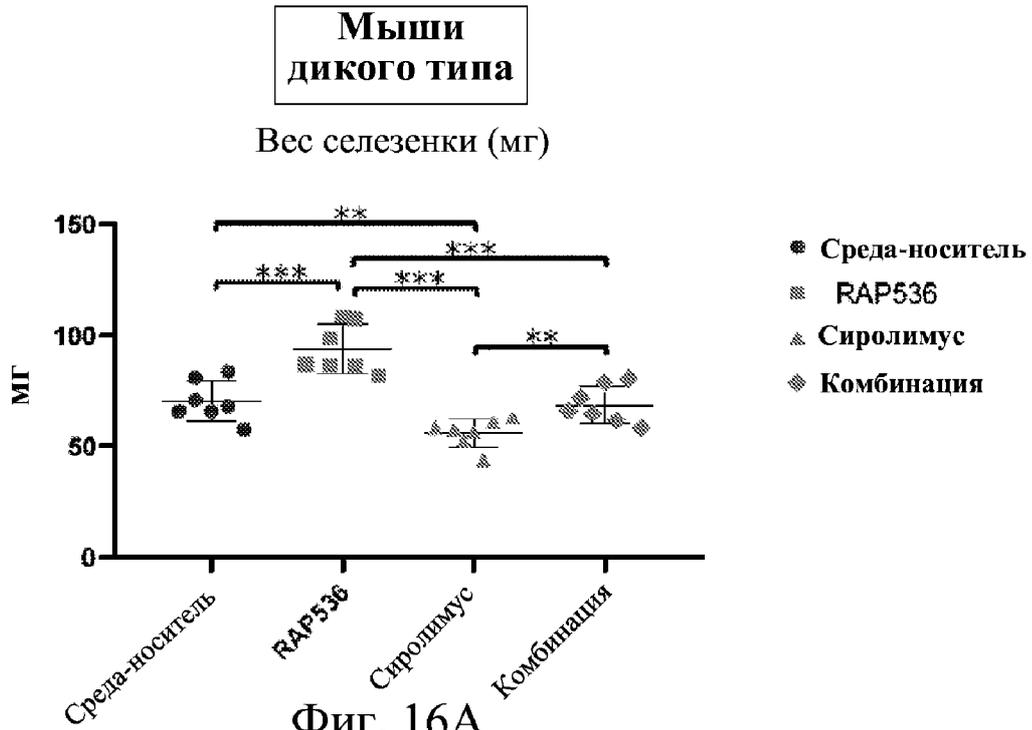
Фиг. 15А

**th3/+ мыши**

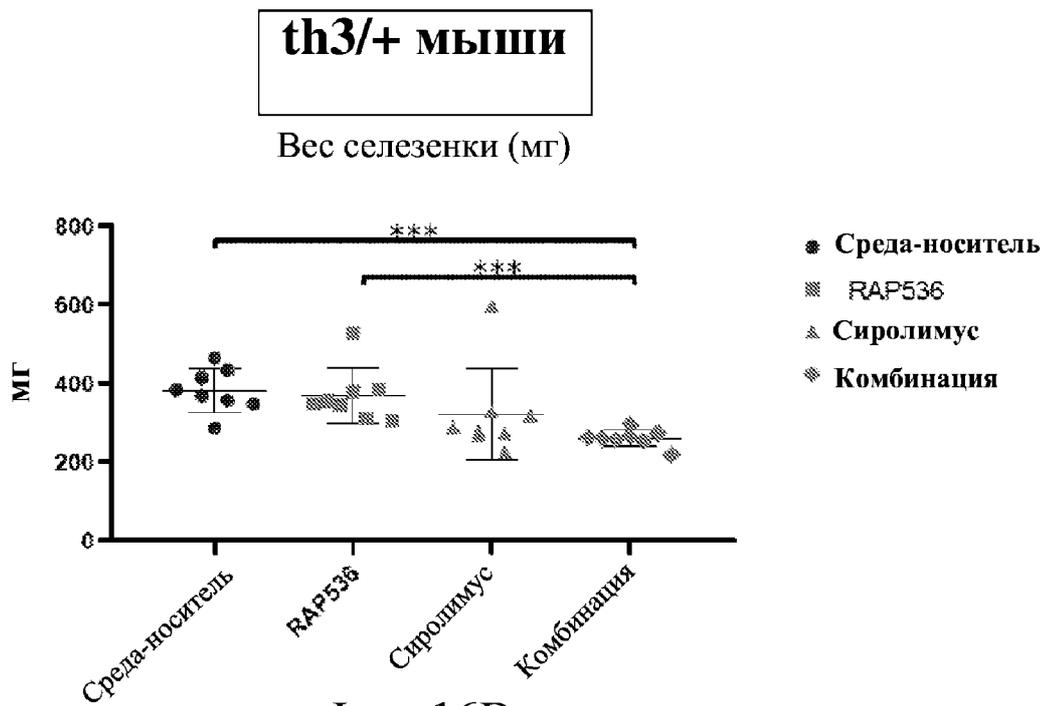
Вес тела (граммы)



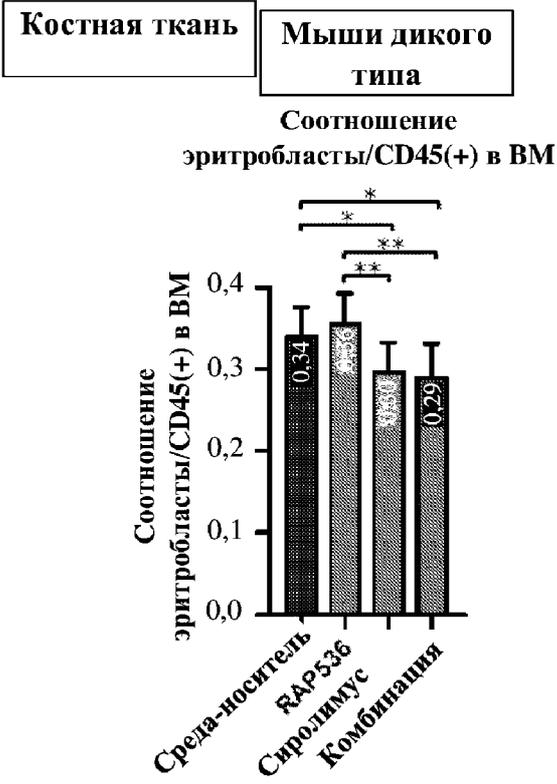
Фиг. 15В



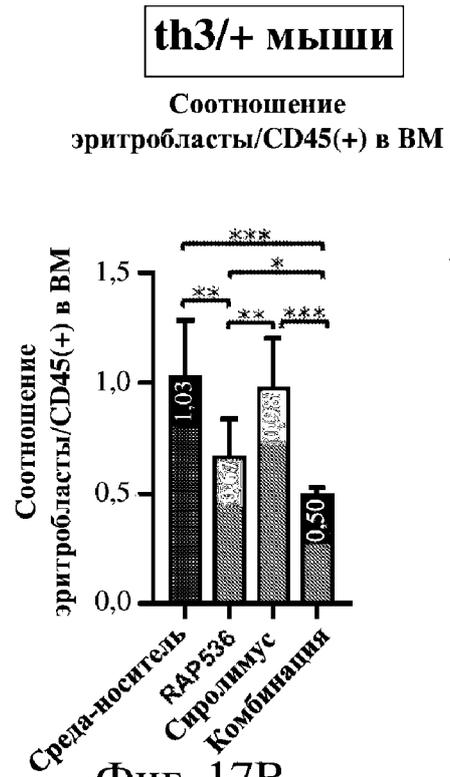
Фиг. 16А



Фиг. 16В



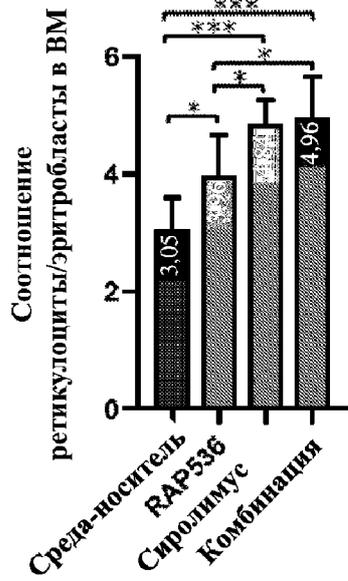
Фиг. 17А



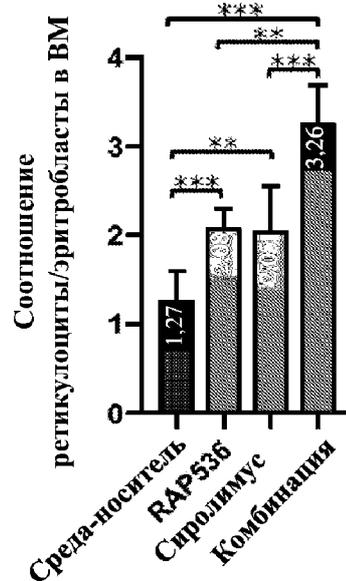
Фиг. 17В

Костная ткань      Мыши дикого типа      th3/+ мыши

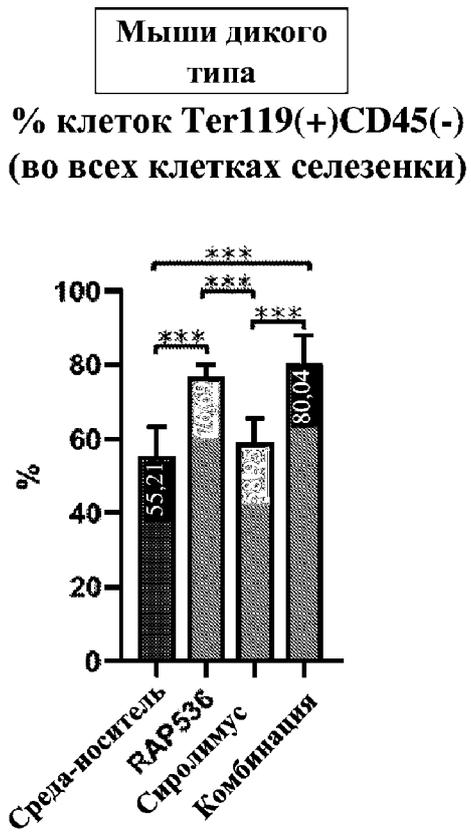
Соотношение ретикулоцитов/эритроциты в ВМ      Соотношение ретикулоцитов/эритроциты в ВМ



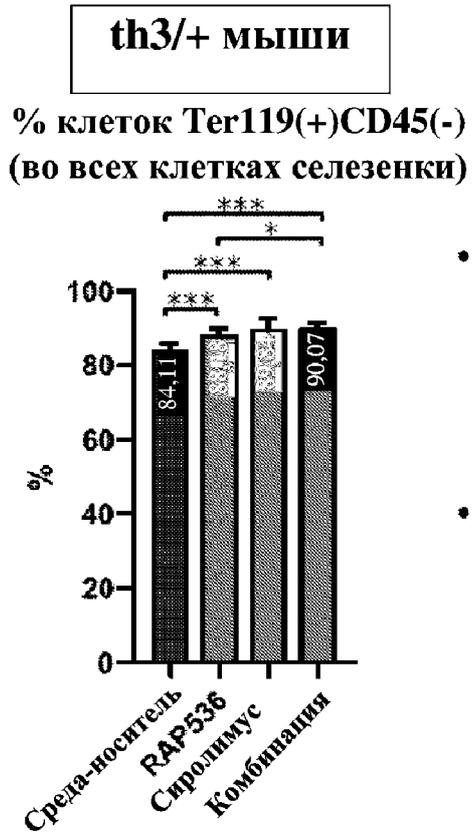
Фиг. 18А



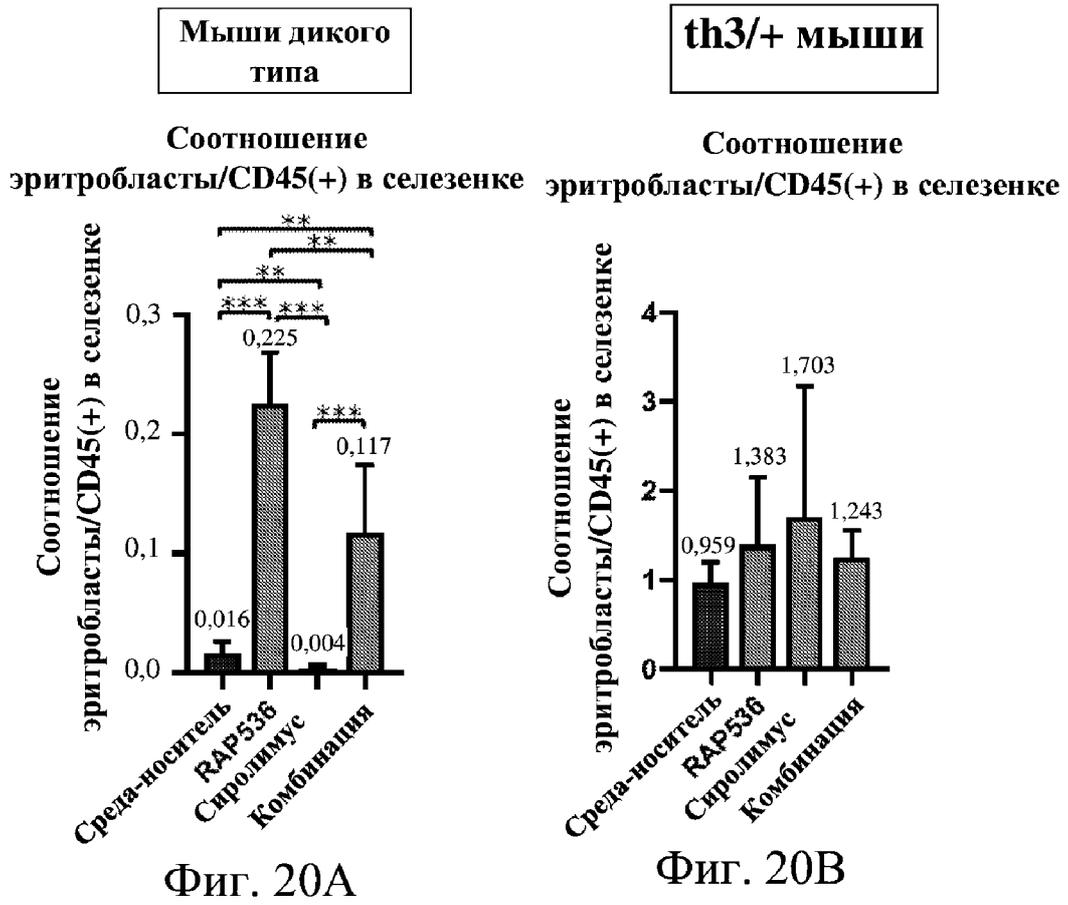
Фиг. 18В

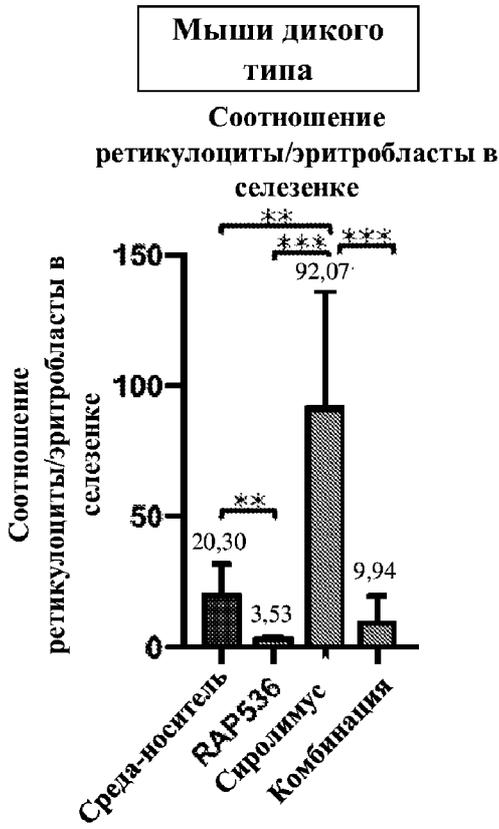


Фиг. 19А

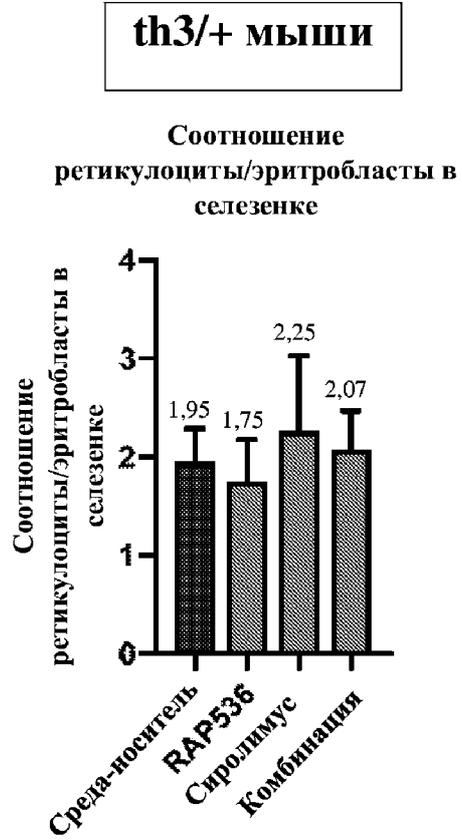


Фиг. 19В





Фиг. 21А



Фиг. 21В