

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043914**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.07.05

(21) Номер заявки
201990226

(22) Дата подачи заявки
2017.07.26

(51) Int. Cl. *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)

(54) **СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МИЕЛОФИБРОЗА**

(31) **62/367,289**

(32) **2016.07.27**

(33) **US**

(43) **2019.08.30**

(86) **PCT/US2017/043967**

(87) **WO 2018/022762 2018.02.01**

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

(72) Изобретатель:
**Кумар Равиндра, Венката Сани
Раджашекар Сурагани Нага (US)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В. (RU)**

(56) WO-A1-2015192111
WO-A1-2015143403
WO-A2-2017079591

(57) Изобретение относится к способам увеличения уровней эритроцитов и/или гемоглобина у пациента, получавшего лечение ингибитором Янус-киназы, а также к способам лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза или его осложнений.

043914
B1

043914
B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

В данной заявке испрашивается приоритет согласно предварительной заявке США 62/367289, поданной 27 июля 2016 г. Содержание вышеупомянутой заявки включено во всей полноте путем ссылки.

Предшествующий уровень техники

Миелофиброз представляет собой редкое заболевание, преимущественно поражающее людей пожилого возраста. Миелофиброз представляет собой BCR-ABL1-негативное миелопролиферативное новообразование, которое возникает *de novo* (первичное заболевание) или которому может предшествовать истинная полицитемия или эссенциальная тромбоцитемия. Клинические признаки включают прогрессирующую анемию, выраженную спленомегалию, фиброз (например, фиброз костного мозга), конституциональные симптомы (например, утомляемость, ночную потливость, боль в костях, зуд и кашель) и потерю массы тела [Tefferi A (2000) *N Engl J Med* 342:1255-1265]. Медианные значения выживаемости колеблются в диапазоне от менее 2 лет до более 15 лет, в зависимости от известных в настоящее время прогностических факторов. У пациентов с миелофиброзом описаны мутации, затрагивающие JAK2, MPL, TET2, ASXL1, IdH1/IDH2, CBL, IKZF1, LNK и EZH2 [James C et al. (2005) *Nature* 434:1144-1148, 2005; Scott L M et al. (2007) *N Engl J Med* 356:459-468, 2007; Pikman Y et al. (2006) *PLoS Med* 3:e270; Delhommeau F et al. (2009) *N Engl J Med* 360:2289-2301; Carubbia N et al. (2009) *Leukemia* 23:2183-2186; Green A et al. (2010) *N Engl J Med* 362:369-370; Tefferi A et al. (2010) *Leukemia* 24:1302-1309; Grand F H et al. (2009) *Blood* 113:6182-6192; Jager R et al. (2010) *Leukemia* 24:1290⁻¹²⁹⁸; Oh S T et al. (2010) *Blood* 116:988-992; and Ernst T et al., *Nat Genet.* 42:722-726]. Некоторые мутации возникают с высокой частотой при миелофиброзе (например, мутации JAK2 приблизительно у 50% пациентов) и либо непосредственно (например, мутации JAK2 или MPL), либо косвенно (например, мутации LNK или CBL) индуцируют гиперактивацию JAK-STAT.

Единственным существующим лечением миелофиброза является трансплантация костного мозга. Однако такое лечение связано с высокой смертностью и лишь небольшая часть пациентов являются подходящими кандидатами для трансплантации. Множество других существующих в настоящее время способов лечения неэффективны в инвертировании течения миелофиброза, будь то первичное или вторичное заболевание. Лечение миелофиброза включает, например, циторедуктивную терапию (например, лечение с помощью гидроксимочевины), лечение анемии с помощью андрогенов и/или эритропоэтина и спленэктомии. Эти способы лечения не продемонстрировали улучшение выживаемости и большей частью рассматриваются как паллиативные [Cervantes F., *Myelofibrosis: Biology and treatment options, European Journal of Haematology*, 2007, 79 (suppl. 68) 13-17]. Позднее для лечения миелофиброза начали применять ингибиторы JAK. Ингибиторы JAK оказались эффективны для уменьшения спленомегалии у пациентов с миелофиброзом, однако в остальном их влияние на заболевание в большей степени является паллиативным [Gupta et al. (2012) *Blood* 120:1367-1379]. В частности, ингибиторы JAK оказывают незначительное влияние или не оказывают влияния на многие проявления (осложнения) заболевания, включая, например, цитопению, трансфузионную зависимость, обострение или бластную фазу заболевания, а также фиброз. Кроме того, было показано, что у некоторых пациентов ингибиторы JAK индуцируют или ухудшают тромбоцитопению, анемию и нейтропению.

Таким образом, существует большая потребность в обеспечении эффективных способов терапии для лечения миелофиброза. Таким образом, задачей данного изобретения является обеспечение новых способов лечения или предупреждения миелофиброза, в частности, лечения или предупреждения одного или более чем одного осложнения миелофиброза.

Сущность изобретения

Отчасти данное описание относится к наблюдению, что антагонист ActRIIB (рецептор активина типа IIb) (ингибитор) может применяться для лечения миелофиброза, в частности, улучшения различных осложнений заболевания, включая, например, спленомегалию, экстрамедуллярный гемопоэз и фиброз. В частности, представленные данные свидетельствуют, что полипептид ловушка GDF уменьшает спленомегалию, экстрамедуллярный гемопоэз и фиброз на модели миелофиброза JAK2V617F. Соответственно, в некоторых аспектах описание относится к композициям и способам лечения миелофиброза, в частности, лечению или предупреждению одного или более чем одного осложнения миелофиброза (например, спленомегалии, экстрамедуллярного гемопоэза, анемии и фиброза), путем введения пациенту, которому это необходимо, эффективного количества одного или более чем одного антагониста ActRIIB, возможно в комбинации с одним или более чем одним способом поддерживающей терапии или другим активным агентом для лечения миелофиброза. Хотя воздействие полипептидов ловушек GDF на миелофиброз может быть опосредовано иными механизмами, нежели антагонизм ActRIIB [например, ингибирование одного или более чем одного из: GDF11, GDF8, активина B, BMP6, GDF3 и BMP10 может быть индикатором склонности агента ингибировать активность ряда дополнительных агентов, включая, возможно, других представителей суперсемейства TGF-бета, и такое коллективное ингибирование может приводить к желаемому воздействию, например, на миелофиброз], тем не менее, описание демонстрирует, что желаемые терапевтические агенты могут быть выбраны на основании антагонизма ActRIIB. Таким образом, не желая связываться с каким-либо конкретным механизмом действия, ожидают, что другие антагонисты ActRIIB [например, антагонисты рецептора ActRIIB, антагонисты одного или более чем одного лиганда

имеет миелофиброз с промежуточным-1 риском согласно DIPSS-плюс. В некоторых аспектах описание относится к способам лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза или одного или более чем одного осложнения миелофиброза, где пациент имеет миелофиброз с промежуточным-2 риском согласно DIPSS-плюс. В некоторых аспектах описание относится к способам лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза или одного или более чем одного осложнения миелофиброза, где пациент имеет миелофиброз с высоким риском согласно DIPSS-плюс. В некоторых аспектах антагонист ActRIIB можно применять для предупреждения или отсрочивания прогрессирования риска при миелофиброзе согласно любой из признанных моделей стратификации риска при миелофиброзе (например, IPSS, DIPPS и DIPPS-плюс). Например, в некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для предупреждения или отсрочивания прогрессирования риска при миелофиброзе от низкого до промежуточного-1 согласно IPSS, DIPPS или DIPPS-плюс. В других воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для предупреждения или отсрочивания прогрессирования риска при миелофиброзе от промежуточного-1 до промежуточного-2 согласно IPSS, DIPPS или DIPPS-плюс. В следующих воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для предупреждения или отсрочивания прогрессирования риска при миелофиброзе от промежуточного-2 до высокого согласно LPSS, DIPPS или DIPPS-плюс. В некоторых аспектах антагонист ActRIIB можно применять, чтобы способствовать понижению или усиливать понижение риска при миелофиброзе согласно любой принятой модели стратификации риска при миелофиброзе (например, IPSS, DLPPS и DIPPS-плюс). Например, в некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять, чтобы способствовать понижению или усиливать понижение риска при миелофиброзе от высокого до промежуточного-2 согласно LPSS, DLPPS или DIPPS-плюс. В других воплощениях антагонист ActRIIB можно применять, чтобы способствовать понижению или усиливать понижение риска при миелофиброзе от промежуточного-2 до промежуточного-1 согласно LPSS, DLPPS или DLPPS-плюс. В следующих воплощениях антагонист ActRLLB можно применять, чтобы способствовать понижению или усиливать понижение риска при миелофиброзе от промежуточного-1 до низкого согласно LPSS, DLPPS или DLPPS-плюс. В некоторых аспектах описание относится к способам применения антагонистов ActRLLB для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза или одного или более чем одного осложнения миелофиброза, где пациент имеет одну или более чем одну генетическую мутацию, ассоциированную с миелофиброзом. Например, в некоторых воплощениях антагонист ActRLLB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза или одного или более чем одного осложнения миелофиброза, где миелофиброз ассоциирован с одной или более чем одной генетической мутацией, выбранной из группы, состоящей из: нуль-зиготности по гаплотипу JAK2 46/1, JAK2V617F, IDH1, IDH2, EZH2, SRSF2, ASXL1, JAK1, JAK2, JAK3, TYK2, MPL, CALR, CALR+ASXL1-, CALR-ASKL1+, CALR+ASKL1+, CALR-ASKL1-, TET2, THPO и LNK. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза или одного или более чем одного осложнения миелофиброза, где миелофиброз ассоциирован с одной или более чем одной генетической мутацией Янус-киназы (JAK) (например, JAK1, JAK2 и/или JAK3). В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза или одного или более чем одного осложнения миелофиброза, где миелофиброз ассоциирован с одной или более чем одной генетической мутацией JAK2. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза или одного или более чем одного осложнения миелофиброза, где миелофиброз ассоциирован с мутацией JAK2V617F. В некоторых аспектах описание относится к способам применения антагониста ActRIIB для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза или одного или более чем одного осложнения миелофиброза, где миелофиброз ассоциирован с повышением одного или более чем одного сывороточного маркера, выбранного из группы, состоящей из: повышенных уровней IL-8 в сыворотке, повышенных уровней IL-2R в сыворотке и повышенных уровней свободных легких цепей в сыворотке. В некоторых аспектах описание относится к способам применения антагонистов ActRIIB для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза или одного или более чем одного осложнения миелофиброза, где пациент получал лечение ингибитором Янус-киназы (например, руксолитинибом, федратинибом (SAR302503), моноэлотинибом (CYT387), пакритинибом, лестауртинибом, AZD-1480, BMS-911543, NS-018, LY2784544, SEP-701, XL019 и AT-9283). В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза или одного или более чем одного осложнения миелофиброза, где у пациента имеется непереносимость ингибитора Янус-киназы. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза или одного или более чем одного осложнения миелофиброза, где у пациента имеется неудовлетворительный ответ на ингибитор Янус-киназы. В некоторых аспектах описание относится к способам применения антагониста ActRIIB для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миело-

фиброза или одного или более чем одного осложнения миелофиброза, где пациент получал лечение гидроксимочевинной. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза или одного или более чем одного осложнения миелофиброза, где у пациента имеется непереносимость гидроксимочевинной. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза или одного или более чем одного осложнения миелофиброза, где у пациента имеется неудовлетворительный ответ на гидроксимочевинну.

Как описано в данном документе, миелофиброз представляет собой клональное новообразование кроветворной ткани, которое сопровождается различными клиническими осложнениями, которые могут проявляться у пациента при прогрессировании заболевания. Примеры, приведенные в описании, демонстрируют, что антагонист ActRIIB можно применять для облегчения ряда указанных клинических осложнений, что указывает на то, что антагонист ActRIIB может применяться более широко для лечения различных осложнений миелофиброза, в отличие от множества существующих в настоящее время способов лечения миелофиброза, которые лечат только ограниченное число осложнений заболевания. Так, в некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести неэффективного гемопоэза у пациента с миелофиброзом. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести экстрамедуллярного гемопоэза у пациента с миелофиброзом. Например, антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести экстрамедуллярного гемопоэза в селезенке (селезеночного экстрамедуллярного гемопоэза) у пациента с миелофиброзом. В других воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести экстрамедуллярного гемопоэза в печени (печеночного экстрамедуллярного гемопоэза) у пациента с миелофиброзом. В следующих воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести экстрамедуллярного гемопоэза в легких (легочного экстрамедуллярного гемопоэза) у пациента с миелофиброзом. В иных воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести экстрамедуллярного гемопоэза в лимфатических узлах (лимфатического экстрамедуллярного гемопоэза) у пациента с миелофиброзом. В некоторых аспектах антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести воспаления и/или увеличения (размера) органа или ткани у пациента с миелофиброзом. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести воспаления и/или увеличения (размера) селезенки у пациента с миелофиброзом. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести воспаления и/или увеличения (размера) печени у пациента с миелофиброзом. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести воспаления и/или увеличения (размера) лимфатического узла (лимфатических узлов) у пациента с миелофиброзом. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести спленомегалии у пациента с миелофиброзом. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести гепатомегалии у пациента с миелофиброзом. В некоторых аспектах антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести фиброза у пациента с миелофиброзом. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести фиброза костного мозга у пациента с миелофиброзом. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести фиброза селезенки у пациента с миелофиброзом. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести фиброза печени у пациента с миелофиброзом. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести фиброза легкого у пациента с миелофиброзом. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести фиброза лимфатических узлов у пациента с миелофиброзом. В некоторых аспектах антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести остеосклероза у пациента с миелофиброзом. В некоторых аспектах антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести остеомиелофиброза. В некоторых аспектах антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести одного или более чем одного гематологического осложнения

миелофиброза. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести анемии у пациента с миелофиброзом. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести тромбоцитопении у пациента с миелофиброзом. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести панцитопении у пациента с миелофиброзом. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести пойкилоцитоза у пациента с миелофиброзом. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести кровотечения у пациента с миелофиброзом. В некоторых аспектах антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести одного или более чем одного конституционального симптома миелофиброза (например, утомляемости, зуда, потери массы тела, ночной потливости, лихорадки, боли или дискомфорта в области живота, парестезии и чувства быстрого насыщения). В некоторых аспектах антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести боли в ткани и/или органе у пациента с миелофиброзом. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести боли в костях у пациента с миелофиброзом. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести артралгии у пациента с миелофиброзом. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миалгии у пациента с миелофиброзом. В некоторых аспектах антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести кахексии у пациента с миелофиброзом. В некоторых аспектах описание относится к увеличению уровней эритроцитов у пациента с миелофиброзом путем введения эффективного количества антагониста ActRIIB. В некоторых аспектах описание относится к увеличению уровней гемоглобина у пациента с миелофиброзом путем введения эффективного количества антагониста ActRIIB. В некоторых аспектах пациент с миелофиброзом, которому предстоит лечение способами по данному изобретению, имеет анемию. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести анемии у пациента с миелофиброзом. В некоторых аспектах описание относится к способам применения антагониста ActRIIB для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза или осложнения миелофиброза у пациента, которому проводили одну или более чем одну трансфузию клеток крови (трансфузию цельной крови или эритроцитов). В некоторых аспектах описание относится к способам применения антагониста ActRIIB для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза или осложнения миелофиброза у пациента, который является зависимым от трансфузии клеток крови. В некоторых аспектах антагонист ActRIIB можно применять для уменьшения нагрузки при трансфузии клеток крови у пациента с миелофиброзом. Например, антагонист ActRIIB можно применять для уменьшения трансфузии клеток крови более чем приблизительно на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% в течение 4-8 недель по сравнению с равным периодом времени до начала лечения антагонистом ActRIIB. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для уменьшения трансфузии клеток крови у пациента с миелофиброзом более чем приблизительно на 50% в течение 4-8 недель по сравнению с равным периодом времени до начала лечения антагонистом ActRIIB. В некоторых аспектах антагонист ActRIIB можно применять для снижения перенасыщения железом у пациента с миелофиброзом. Например, антагонист ActRIIB можно применять для снижения перенасыщения железом органа или ткани у пациента с миелофиброзом. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для снижения перенасыщения железом селезенки у пациента с миелофиброзом. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для снижения перенасыщения железом печени у пациента с миелофиброзом. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для снижения перенасыщения железом сердца у пациента с миелофиброзом.

В любом из описанных в данном документе способов пациенту с миелофиброзом можно дополнительно вводить одно или более чем одно дополнительное действующее вещество и/или применять один или более способов поддерживающей терапии (дополнительно к введению одного или более чем одного антагониста ActRIIB) для лечения, предупреждения, или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза или одного или более чем одного осложнения миелофиброза. Например, в некоторых воплощениях пациенту можно дополнительно применять один или более чем один способ поддерживающей терапии или дополнительно вводить один или более чем один дополнительный активный агент, выбранный из группы, состоящей из: трансфузии крови (трансфузии цельной крови или эритроцитов), хелаторов железа (например, дефероксамина, деферипрона и деферасирокса), кортикостероидов, преднизолона, стимуляторов эритропоэза (например, эритропоэтина, эпоэтина альфа, эпоэтина бета, дарбепоэтина альфа и метоксиполиэтиленгликольэпоэтина бета), андрогенов, даназола, талидомида, леналидомида, циторедуктивного агента, гидроксимочевины, бусульфана, мелфалма, кладрибина, спленэкто-

мии, лучевой терапии, аспирина, помалидомида, ингибиторов Янус-киназы, ингибиторов mTOR (например, рапамицина, сиролимуса, дефоролимуса, эверолимуса, темсиролимуса, NVP-BEZ235, BGT226, SF1126, PK1-587, INK128, AZD8055 и AZD2014) и ингибиторов деацетилазы гистонов (например, гивиностата, панобиностата и прациностата). В некоторых аспектах описание относится к способам лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза или одного или более чем одного осложнения миелофиброза, включающим введение пациенту, которому это необходимо: а) ингибитора Янус-киназы и б) антагониста ActRIIB, где ингибитор Янус-киназы и антагонист ActRIIB вводят в эффективном количестве. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB вводят перед лечением ингибитором Янус-киназы. В других воплощениях антагонист ActRIIB вводят после лечения ингибитором Янус-киназы. В следующих воплощениях антагонист ActRIIB вводят одновременно с ингибитором Янус-киназы. Ингибиторы Янус-киназы для применения в способах, описанных в данном документе, могут быть агентами, ингибирующими одну или более чем одну Янус-киназу, выбранную из группы, состоящей из: JAK1, JAK2 и JAK3. Например, ингибитор Янус-киназы может быть агентом, ингибирующим сигнальный путь одной или более чем одной из JAK1, JAK2 и JAK3 в исследовании на клетках. В некоторых воплощениях ингибитор Янус-киназы для применения согласно способам, описанным в данном документе, выбран из группы, состоящей из: руксолитиниба, федратиниба (SAR302503), монозолитиниба (CYT387), пакритиниба, лестауртиниба, AZD-1480, BMS-911543, NS-018, LY2784544, SEP-701, XL019 и AT-9283. В некоторых предпочтительных воплощениях ингибитор Янус-киназы для применения согласно способам, описанным в данном документе, представляет собой руксолитиниб.

Ингибиторы Янус-киназы (например, руксолитиниб) одобрены для лечения различных расстройств, включая, например, миелофиброз. Кроме того, проводится ряд других клинических исследований для определения эффективности ингибиторов Янус-киназы для лечения ряда других заболеваний. Типичным побочным эффектом терапии ингибитором Янус-киназы является анемия. При том, что трансфузия клеток крови и терапия активаторами рецептора EPO (эритропоэтина) могут применяться для лечения анемии у пациентов, получавших лечение ингибитором Янус-киназы, такая терапия анемии также сопровождается побочными эффектами у пациентов (например, способствует перенасыщению или усугубляет перенасыщение железом, неудовлетворительный ответ на EPO и непереносимость EPO). Таким образом, в области техники существует потребность в альтернативных способах увеличения уровней эритроцитов/гемоглобина и лечения анемии у пациентов, получавших лечение ингибитором Янус-киназы. Отчасти данное описание относится к наблюдению, что антагонист ActRIIB (ингибитор) может применяться для увеличения уровней эритроцитов и гемоглобина у пациентов, получавших лечение ингибитором Янус-киназы. Соответственно, в некоторых аспектах описание относится к композициям и способам увеличения уровней эритроцитов/гемоглобина и лечения или предупреждения анемии у пациентов, получавших лечение ингибитором Янус-киназы, путем введения пациенту, которому это необходимо, эффективного количества одного или более чем одного антагониста ActRIIB, возможно в комбинации с одним или более чем одним способом поддерживающей терапии или другим активным агентом для лечения анемии. Хотя воздействие полипептидов ловушек GDF на уровне эритроцитов и/или гемоглобина может быть опосредовано иным механизмом, нежели антагонизм ActRIIB [например, ингибирование одного или более чем одного из: GDF11, GDF8, активина B, BMP6, GDF3 и BMP10 может быть индикатором склонности агента ингибировать активности ряда дополнительных агентов, включая, возможно, других представителей суперсемейства TGF-бета, и такое коллективное ингибирование может приводить к желаемому воздействию, например, на уровне эритроцитов и/или гемоглобина], тем не менее описание демонстрирует, что желаемые терапевтические агенты могут быть выбраны по антагонизму ActRIIB. Таким образом, не желая связываться с каким-либо конкретным механизмом действия, ожидают, что другие антагонисты ActRIIB [например, антагонисты рецептора ActRIIB, антагонисты одного или более чем одного лиганда ActRIIB (например, GDF11, GDF8, активина B, BMP6, GDF3 и BMP10), антагонисты одного или более чем одного рецептора I типа (например, ALK4, ALK5 и/или ALK7), антагонисты одного или более чем одного ко-рецептора и/или антагонисты одного или более чем одного компонента последующих звеньев сигнального пути ActRIIB (например, Smad)], или комбинации таких антагонистов] могут быть полезны в лечении пациентов, получавших лечение ингибитором Янус-киназы, в частности, в лечении или предупреждении одного или более чем одного осложнения, связанных с терапией ингибитором Янус-киназы (например, анемии, тромбоцитопении и/или нейтропении). Такие агенты в данном документе совместно обозначаются "антагонисты ActRIIB" или "ингибиторы ActRIIB".

В некоторых аспектах описание относится к способам увеличения уровней эритроцитов и/или гемоглобина у пациента, получавшего лечение ингибитором Янус-киназы, путем введения пациенту, которому это необходимо, эффективного количества антагониста ActRIIB. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для лечения или предупреждения анемии у пациента, получавшего лечение ингибитором Янус-киназы. В некоторых воплощениях пациент, получавший лечение ингибитором Янус-киназы, мог получать одну или более чем одну трансфузию клеток крови до начала лечения антагонистом ActRIIB. В некоторых воплощениях пациент, получавший лечение ингибитором Янус-киназы, является зависимым от трансфузии клеток крови. В некоторых аспектах описание относится к способам применения антагониста ActRIIB для уменьшения нагрузки при трансфузии клеток крови у пациента,

получавшего лечение ингибитором Янус-киназы. Например, антагонист ActRIIB можно применять для уменьшения трансфузии клеток крови более чем на приблизительно 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% в течение 4-8 недель по сравнению с равным периодом времени до начала лечения антагонистами ActRIIB у пациента, получавшего лечение ингибитором Янус-киназы. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для уменьшения трансфузии клеток крови у пациента, получавшего лечение ингибитором Янус-киназы, более чем на приблизительно 50% в течение 4-8 недель по сравнению с равным периодом времени до начала лечения антагонистом ActRIIB. В некоторых аспектах описание относится к способам применения антагониста ActRIIB для уменьшения перенасыщения железом у пациента, получавшего лечение ингибитором Янус-киназы. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для снижения содержания железа в печени пациента, получавшего лечение ингибитором Янус-киназы. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для снижения содержания железа в селезенке пациента, получавшего лечение ингибитором Янус-киназы. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB можно применять для снижения содержания железа в сердце пациента, получавшего лечение ингибитором Янус-киназы. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB вводят перед лечением ингибитором Янус-киназы. В других воплощениях антагонист ActRIIB вводят после лечения ингибитором Янус-киназы. В следующих воплощениях антагонист ActRIIB вводят одновременно с ингибитором Янус-киназы. В некоторых аспектах пациент, получавший лечение ингибитором Янус-киназы, получал агент, ингибирующий одну или более чем одну Янус-киназу, выбранную из группы, состоящей из JAK1, JAK2 и JAK3. В некоторых воплощениях ингибитор Янус-киназы ингибирует передачу сигнала одной или более чем одной из JAK1, JAK2 и JAK3 в исследовании на клетках. Например, пациент мог получать лечение одним или более чем одним ингибитором Янус-киназ, выбранным из группы, состоящей из: руксолитиниба, федратиниба (SAR302503), моноэлотиниба (CYT387), пакритиниба, лестауртиниба, AZD-1480, BMS-911543, NS-018, LY2784544, SEP-701, XL019 и AT-9283. В некоторых воплощениях пациент мог получать лечение руксолитинибом.

В некоторых аспектах антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов для применения согласно способам и применениям, описанным в данном документе, представляет собой агент, ингибирующий по меньшей мере GDF11 (например, антагонист GDF11). Воздействие на ингибирование GDF11 можно определять, например, используя исследования на клетках, включая описанные в данном документе (например, репортерный анализ сигнального пути Smad). Таким образом, в некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов по описанию могут связываться по меньшей мере с GDF11. Лиганд-связывающая активность может определяться, например, с применением теста на аффинность связывания, включая описанные в данном документе. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов по описанию связывается по меньшей мере с GDF11 K_D по меньшей мере 1×10^{-7} М (например, по меньшей мере 1×10^{-8} М, по меньшей мере 1×10^{-9} М, по меньшей мере 1×10^{-10} М, по меньшей мере 1×10^{-11} М или по меньшей мере 1×10^{-12} М). Как описано в данном документе, различные антагонисты ActRIIB, ингибирующие GDF11, могут применяться согласно способам и применениям, описанным в данном документе, включая, например, ловушки лигандов (например, полипептиды ActRIIB, ловушки GDF, полипептиды фоллистатина и полипептиды FLRG), антитела, малые молекулы, нуклеотидные последовательности и их комбинации. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов, ингибирующих GDF11, может дополнительно ингибировать одно или более чем одно из следующего: активин (например, активин А, активин В, активин АВ, активин С, активин АС, активин ВС, активин Е, активин АЕ и/или активин ВЕ), GDF8, GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 и ALK7.

В некоторых аспектах антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов для применения согласно способам и применениям, описанным в данном документе, представляет собой агент, ингибирующий по меньшей мере GDF8 (например, антагонист GDF8). Воздействие на ингибирование GDF8 может определяться, например, с применением исследования на клетках, включая описанные в данном документе (например, репортерный анализ сигнального пути Smad). Таким образом, в некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов по описанию могут связываться по меньшей мере с GDF8. Лиганд-связывающая активность может определяться, например, с применением теста на аффинность связывания, включая описанные в данном документе. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов по описанию связывается по меньшей мере с GDF8 с K_D по меньшей мере 1×10^{-7} М (например, по меньшей мере 1×10^{-8} М, по меньшей мере 1×10^{-9} М, по меньшей мере 1×10^{-10} М, по меньшей мере 1×10^{-11} М или по меньшей мере 1×10^{-12} М). Как описано в данном документе, различные антагонисты ActRIIB, ингибирующие GDF8, могут применяться согласно способам и применениям, описанным в данном документе, включая, например, ловушки лигандов (например, полипептиды ActRIIB, ловушки GDF, полипептиды фоллистатина и полипептиды FLRG), антитела, малые молекулы, нуклеотидные последовательности и их комбинации. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов, ингибирующих GDF8, может дополнительно ингибировать одно или более чем одно из следующего: активин (например, активин А, активин В, активин АВ, активин С, активин АС, активин ВС, активин Е, активин АЕ и/или активин ВЕ), GDF11, GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4,

ALK5 и ALK7.

В некоторых аспектах антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов для применения согласно способам и применениям, описанным в данном документе, представляет собой агент, ингибирующий по меньшей мере GDF3 (например, антагонист GDF3). Воздействие на ингибирование GDF3 может определяться, например, с применением исследования на клетках, включая описанные в данном документе (например, репортерный анализ сигнального пути Smad). Таким образом, в некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов по описанию могут связываться по меньшей мере с GDF3. Лиганд-связывающая активность может определяться, например, с применением теста на аффинность связывания, включая описанные в данном документе. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов по описанию связывается по меньшей мере с GDF3 с K_D по меньшей мере 1×10^{-7} М (например, по меньшей мере 1×10^{-8} М, по меньшей мере 1×10^{-9} М, по меньшей мере 1×10^{-10} М, по меньшей мере 1×10^{-11} М или по меньшей мере 1×10^{-12} М). Как описано в данном документе, различные антагонисты ActRIIB, ингибирующие GDF3, могут применяться согласно способам и применениям, описанным в данном документе, включая, например, ловушки лигандов (например, полипептиды ActRIIB, ловушки GDF, полипептиды фоллистатина и полипептиды FLRG), антитела, малые молекулы, нуклеотидные последовательности и их комбинации. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов, ингибирующих GDF3, может дополнительно ингибировать одно или более чем одно из следующего: активин (например, активин А, активин В, активин АВ, активин С, активин АС, активин ВС, активин Е, активин АЕ и/или активин ВЕ), GDF8, GDF11, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 и ALK7.

В некоторых аспектах антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов для применения согласно способам и применениям, описанным в данном документе, представляет собой агент, ингибирующий по меньшей мере BMP6 (например, антагонист BMP6). Воздействие на ингибирование BMP6 может определяться, например, с применением исследования на клетках, включая описанные в данном документе (например, репортерный анализ сигнального пути Smad). Таким образом, в некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов по описанию могут связываться по меньшей мере с BMP6. Лиганд-связывающая активность может определяться, например, с применением теста на аффинность связывания, включая описанные в данном документе. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов по описанию связывается по меньшей мере с BMP6 с K_D по меньшей мере 1×10^{-7} М (например, по меньшей мере 1×10^{-8} М, по меньшей мере 1×10^{-9} М, по меньшей мере 1×10^{-10} М, по меньшей мере 1×10^{-11} М или по меньшей мере 1×10^{-12} М). Как описано в данном документе, различные антагонисты ActRIIB, ингибирующие BMP6, могут применяться согласно способам и применениям, описанным в данном документе, включая, например, ловушки лигандов (например, полипептиды ActRIIB, ловушки GDF, полипептиды фоллистатина и полипептиды FLRG), антитела, малые молекулы, нуклеотидные последовательности и их комбинации. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов, ингибирующих BMP6, может дополнительно ингибировать одно или более чем одно из следующего: активин (например, активин А, активин В, активин АВ, активин С, активин АС, активин ВС, активин Е, активин АЕ и/или активин ВЕ), GDF8, GDF3, GDF11, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 и ALK7.

В некоторых аспектах антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов для применения согласно способам и применениям, описанным в данном документе, представляет собой агент, ингибирующий по меньшей мере BMP10 (например, антагонист BMP10). Воздействие на ингибирование BMP10 может определяться, например, с применением исследования на клетках, включая описанные в данном документе (например, репортерный анализ сигнального пути Smad). Таким образом, в некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов по описанию могут связываться по меньшей мере с BMP10. Лиганд-связывающая активность может определяться, например, с применением теста на аффинность связывания, включая описанные в данном документе. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов по описанию связывается по меньшей мере с BMP10 с K_D по меньшей мере 1×10^{-7} М (например, по меньшей мере 1×10^{-8} М, по меньшей мере 1×10^{-9} М, по меньшей мере 1×10^{-10} М, по меньшей мере 1×10^{-11} М или по меньшей мере 1×10^{-12} М). Как описано в данном документе, различные антагонисты ActRIIB, ингибирующие BMP10, могут применяться согласно способам и применениям, описанным в данном документе, включая, например, ловушки лигандов (например, полипептиды ActRIIB, ловушки GDF, полипептиды фоллистатина и полипептиды FLRG), антитела, малые молекулы, нуклеотидные последовательности и их комбинации. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов, ингибирующих BMP10, может дополнительно ингибировать одно или более чем одно из следующего: активин (например, активин А, активин В, активин АВ, активин С, активин АС, активин ВС, активин Е, активин АЕ и/или активин ВЕ), GDF8, GDF3, GDF11, BMP6, ActRIIB, ALK4, ALK5 и ALK7.

В некоторых аспектах антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов для применения согласно способам и применениям, описанным в данном документе, представляет собой агент, ингибирующий по меньшей мере активин (например, активин А, активин В, активин АВ, активин С, активин АС, активин

BC, активин E, активин AE и/или активин BE) (например, антагонист активина). Воздействие на ингибирование активина может определяться, например, с применением исследования на клетках, включая описанные в данном документе (например, репортерный анализ сигнального пути Smad). Таким образом, в некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов по описанию могут связываться по меньшей мере с активинном. Лиганд-связывающая активность может определяться, например, с применением теста на аффинность связывания, включая описанные в данном документе. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов по описанию связывается по меньшей мере с активинном с K_D по меньшей мере 1×10^{-7} М (например, по меньшей мере 1×10^{-8} М, по меньшей мере 1×10^{-9} М, по меньшей мере 1×10^{-10} М, по меньшей мере 1×10^{-11} М или по меньшей мере 1×10^{-12} М). Как описано в данном документе, различные антагонисты ActRIIB, ингибирующие активин, могут применяться согласно способам и применениям, описанным в данном документе, включая, например, ловушки лигандов (например, полипептиды ActRIIB, ловушки GDF, полипептиды фоллистатина и полипептиды FLRG), антитела, малые молекулы, нуклеотидные последовательности и их комбинации. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов, ингибирующих активин, может дополнительно ингибировать одно или более чем одно из следующего: GDF8, GDF3, GDF11, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 и ALK7. В некоторых предпочтительных воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов для применения согласно способам и применениям, описанным в данном документе, представляет собой агент, ингибирующий по меньшей мере активин B. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов для применения согласно способам и применениям, описанным в данном документе, по существу не связывается с активинном A (например, связывается с активинном A с K_D превышающей 1×10^{-7} М или обладает относительно умеренным связыванием, например, приблизительно 1×10^{-8} М или приблизительно 1×10^{-9} М) и/или ингибирует активность активина A. В некоторых предпочтительных воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов для применения согласно способам и применениям, описанным в данном документе, представляет собой агент, ингибирующий по меньшей мере активин B, но по существу не связывается с активинном A (например, связывается с активинном A с K_D превышающей 1×10^{-7} М или обладает относительно умеренным связыванием, например, приблизительно 1×10^{-8} М или приблизительно 1×10^{-9} М) и/или ингибирует активность активина A.

В некоторых аспектах антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов для применения согласно способам и применениям, описанным в данном документе, представляет собой агент, ингибирующий по меньшей мере ActRIIB (например, антагонист ActRIIB). Воздействие на ингибирование ActRIIB может определяться, например, с применением исследования на клетках, включая описанные в данном документе (например, репортерный анализ сигнального пути Smad). Таким образом, в некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов по описанию могут связываться по меньшей мере с ActRIIB. Лиганд-связывающая активность может определяться, например, с применением теста на аффинность связывания, включая описанные в данном документе. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов по описанию связывается по меньшей мере с ActRIIB с K_D по меньшей мере 1×10^{-7} М (например, по меньшей мере 1×10^{-8} М, по меньшей мере 1×10^{-9} М, по меньшей мере 1×10^{-10} М, по меньшей мере 1×10^{-11} М или по меньшей мере 1×10^{-12} М). Как описано в данном документе, различные антагонисты ActRIIB, ингибирующие ActRIIB, могут применяться согласно способам и применениям, описанным в данном документе, включая, например, ловушки лигандов (например, полипептиды ActRIIB, ловушки GDF, полипептиды фоллистатина и полипептиды FLRG), антитела, малые молекулы, нуклеотидные последовательности и их комбинации. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов, ингибирующих ActRIIB, может дополнительно ингибировать одно или более чем одно из следующего: активин (например, активин A, активин B, активин AB, активин C, активин AC, активин BC, активин E, активин AE и/или активин BE), GDF8, GDF3, GDF11, BMP6, BMP10, ALK4, ALK5 и ALK7.

В некоторых аспектах антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов для применения согласно способам и применениям, описанным в данном документе, представляет собой агент, ингибирующий по меньшей мере ALK4 (например, антагонист ALK4). Воздействие на ингибирование ALK4 может определяться, например, с применением исследования на клетках, включая описанные в данном документе (например, репортерный анализ сигнального пути Smad). Таким образом, в некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов по описанию могут связываться по меньшей мере с ALK4. Лиганд-связывающая активность может определяться, например, с применением теста на аффинность связывания, включая описанные в данном документе. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов по описанию связывается по меньшей мере с ALK4 с K_D по меньшей мере 1×10^{-7} М (например, по меньшей мере 1×10^{-8} М, по меньшей мере 1×10^{-9} М, по меньшей мере 1×10^{-10} М, по меньшей мере 1×10^{-11} М или по меньшей мере 1×10^{-12} М). Как описано в данном документе, различные антагонисты ActRIIB, ингибирующие ALK4, могут применяться согласно способам и применениям, описанным в данном документе, включая, например, ловушки лигандов (например, полипептиды ActRIIB, ловушки GDF, полипептиды фоллистатина и полипептиды FLRG), антитела, малые молекулы,

нуклеотидные последовательности и их комбинации. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов, ингибирующих ALK4, может дополнительно ингибировать одно или более чем одно из следующего: активин (например, активин А, активин В, активин АВ, активин С, активин АС, активин ВС, активин Е, активин АЕ и/или активин ВЕ), GDF8, GDF3, GDF11, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK5 и ALK7.

В некоторых аспектах антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов для применения согласно способам и применениям, описанным в данном документе, представляет собой агент, ингибирующий по меньшей мере ALK5 (например, антагонист ALK5). Воздействие на ингибирование ALK5 может определяться, например, с применением исследования на клетках, включая описанные в данном документе (например, репортерный анализ сигнального пути Smad). Таким образом, в некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов по описанию могут связываться по меньшей мере с ALK5. Лиганд-связывающая активность может определяться, например, с применением теста на аффинность связывания, включая описанные в данном документе. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов по описанию связывается по меньшей мере с ALK5 с K_D по меньшей мере 1×10^{-7} М (например, по меньшей мере 1×10^{-8} М, по меньшей мере 1×10^{-9} М, по меньшей мере 1×10^{-10} М, по меньшей мере 1×10^{-11} М или по меньшей мере 1×10^{-12} М). Как описано в данном документе, различные антагонисты ActRIIB, ингибирующие ALK5, могут применяться согласно способам и применениям, описанным в данном документе, включая, например, ловушки лигандов (например, полипептиды ActRIIB, ловушки GDF, полипептиды фоллистатина и полипептиды FLRG), антитела, малые молекулы, нуклеотидные последовательности и их комбинации. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов, ингибирующих ALK5, может дополнительно ингибировать одно или более чем одно из следующего: активин (например, активин А, активин В, активин АВ, активин С, активин АС, активин ВС, активин Е, активин АЕ и/или активин ВЕ), GDF8, GDF3, GDF11, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4 и ALK7.

В некоторых аспектах антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов для применения согласно способам и применениям, описанным в данном документе, представляет собой агент, ингибирующий по меньшей мере ALK7 (например, антагонист ALK7). Воздействие на ингибирование ALK7 может определяться, например, с применением исследования на клетках, включая описанные в данном документе (например, репортерный анализ сигнального пути Smad). Таким образом, в некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов по описанию могут связываться по меньшей мере с ALK7. Лиганд-связывающая активность может определяться, например, с применением теста на аффинность связывания, включая описанные в данном документе. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов по описанию связывается по меньшей мере с ALK7 с K_D по меньшей мере 1×10^{-7} М (например, по меньшей мере 1×10^{-8} М, по меньшей мере 1×10^{-9} М, по меньшей мере 1×10^{-10} М, по меньшей мере 1×10^{-11} М или по меньшей мере 1×10^{-12} М). Как описано в данном документе, различные антагонисты ActRIIB, ингибирующие ALK7, могут применяться согласно способам и применениям, описанным в данном документе, включая, например, ловушки лигандов (например, полипептиды ActRIIB, ловушки GDF, полипептиды фоллистатина и полипептиды FLRG), антитела, малые молекулы, нуклеотидные последовательности и их комбинации. В некоторых воплощениях антагонист ActRIIB или комбинация антагонистов, ингибирующих ALK7, может дополнительно ингибировать одно или более чем одно из следующего: активин (например, активин А, активин В, активин АВ, активин С, активин АС, активин ВС, активин Е, активин АЕ и/или активин ВЕ), GDF8, GDF3, GDF11, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK5 и ALK4.

Отчасти описание относится к антагонистам ActRIIB, представляющим собой полипептиды ActRIIB. Термин "полипептид ActRIIB" охватывает полипептиды ActRIIB естественного происхождения, а также его усеченные формы и варианты, такие как описанные в данном документе (например, полипептиды ловушки GDF). Предпочтительно, полипептиды ActRIIB содержат, по существу состоят из или состоят из лиганд-связывающего домена полипептида ActRIIB или его модифицированной формы (варианта). Например, в некоторых воплощениях полипептиды ActRIIB содержат, по существу состоят из или состоят из лиганд-связывающего домена полипептида ActRIIB, например, части внеклеточного домена ActRIIB. Предпочтительно, полипептиды ActRIIB для применения согласно способам, описанным в данном документе, представляют собой растворимые полипептиды.

В некоторых аспектах описание относится к композициям, содержащим полипептид ActRIIB, и к их применению. Например, в некоторых воплощениях полипептид ActRIIB по описанию содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот 29-109 из SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях полипептид ActRIIB может содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот 29-109 из SEQ ID NO: 1, где полипептид ActRIIB содержит отрицательно заряженную аминокислоту [естественного происхождения (Е или D) или отрицательно заряженную аминокислоту искусственного происхождения] в положении 79 относи-

может содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30. В некоторых воплощениях полипептид ActRIIB может содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30, где полипептид ActRIIB содержит отрицательно заряженную аминокислоту в положении 79 относительно SEQ ID NO: 1. В следующих воплощениях полипептид ActRIIB может содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31. В некоторых воплощениях полипептид ActRIIB может содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31, где полипептид ActRIIB содержит отрицательно заряженную аминокислоту в положении 79 относительно SEQ ID NO: 1. В следующих воплощениях полипептид ActRIIB может содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45. В некоторых воплощениях полипептид ActRIIB может содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45, где полипептид ActRIIB содержит отрицательно заряженную аминокислоту в положении 79 относительно SEQ ID NO: 1. В следующих воплощениях полипептид ActRIIB может содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 50. В некоторых воплощениях полипептид ActRIIB может содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 50, где полипептид ActRIIB содержит отрицательно заряженную аминокислоту в положении 79 относительно SEQ ID NO: 1. В следующих воплощениях полипептид ActRIIB может содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53. В некоторых воплощениях полипептид ActRIIB может содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53, где полипептид ActRIIB содержит отрицательно заряженную аминокислоту в положении 79 относительно SEQ ID NO: 1. В следующих воплощениях полипептид ActRIIB может содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54. В некоторых воплощениях полипептид ActRIIB может содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54, где полипептид ActRIIB содержит отрицательно заряженную аминокислоту в положении 79 относительно SEQ ID NO: 1. В следующих воплощениях полипептид ActRIIB может содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 58. В некоторых воплощениях полипептиды ActRIIB для применения согласно способам и применениям, описанным в данном документе, не содержат отрицательно заряженную аминокислоту в положении, соответствующем L79 последовательности SEQ ID NO: 1.

Как описано в данном документе, полипептиды ActRIIB и их варианты (ловушки GDF) могут представлять собой гомомультимеры, например, гомодимеры, гомотримеры, гомотетрамеры, гомопентамеры и гомомультимерные комплексы более высокого порядка. В некоторых предпочтительных воплощениях полипептиды ActRIIB и их варианты представляют собой гомодимеры. В некоторых воплощениях димеры полипептида ActRIIB, описанные в данном документе, содержат первый полипептид ActRIIB, ковалентно или нековалентно связанный со вторым полипептидом ActRIIB, где первый полипептид содержит домен ActRIIB и аминокислотную последовательность первого члена (или второго члена) взаимодействующей пары (например, константный домен иммуноглобулина), и второй полипептид содержит полипептид ActRIIB и аминокислотную последовательность второго члена (или первого члена) взаимодействующей пары.

В некоторых аспектах полипептиды ActRIIB, включая их варианты (например, ловушки GDF), могут быть слитыми белками. Например, в некоторых воплощениях полипептид ActRIIB может представлять собой слитый белок, содержащий домен полипептида ActRIIB и один или более чем один домен гетерологичного полипептида (не-ActRIIB). В некоторых воплощениях полипептид ActRIIB может представлять собой слитый белок, который имеет в качестве одного домена аминокислотную последовательность, имеющую происхождение от полипептида ActRIIB (например, лиганд-связывающий домен рецеп-

тора ActRIIB или его варианта), и один или более чем один гетерологичный домен, которые обеспечивают желаемое свойство, такое как улучшенная фармакокинетика, более легкая очистка, нацеленность на конкретные ткани и т.д. Например, домен слитого белка может усиливать одно или более из следующего: стабильность *in vivo*, время полужизни *in vivo*, всасывание/введение, локализацию или распределение в тканях, образование белковых комплексов, мультимеризацию слитого белка и/или очистку. Возможно, домен полипептида ActRIIB слитого белка непосредственно соединен (слит) с одним или более чем одним доменом гетерологичного полипептида или между аминокислотной последовательностью полипептида ActRIIB и аминокислотной последовательностью одного или более чем одного домена может располагаться опосредующая последовательность, такая как линкер. В некоторых воплощениях слитый белок ActRIIB содержит относительно неструктурированный линкер, расположенный между гетерологичным доменом и доменом ActRIIB. Этот неструктурированный линкер может соответствовать неструктурированной области примерно из 15 аминокислот, находящейся на С-конце внеклеточного домена ActRIIB ("хвосте") или он может представлять собой искусственную последовательность размером от 3 до 15, 20, 30, 50 или более аминокислот, которые относительно свободны от вторичной структуры. Линкер может быть обогащен остатками глицина и пролина и может, например, содержать повторяющиеся последовательности треонина/серина и глицина. Примеры линкеров включают, без ограничения, последовательности TGGG (SEQ ID NO: 18), SGGG (SEQ ID NO: 19), TGGGG (SEQ ID NO: 16), SGGGG (SEQ ID NO: 17), GGGGS (SEQ ID NO: 20), GGGG (SEQ ID NO: 15) и GGG (SEQ ID NO: 14). В некоторых воплощениях слитый белок ActRIIB может содержать константный домен иммуноглобулина, включая, например, Fc часть иммуноглобулина. Например, аминокислотная последовательность, которая происходит из Fc домена иммуноглобулина IgG (IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA (IgA1 или IgA2), IgE или IgM. Например, Fc часть домена иммуноглобулина может содержать, по существу состоять из или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 9-13. Такие домены иммуноглобулинов могут содержать одну или более чем одну аминокислотную модификацию (например, делецию, вставку и/или замену), которая придает Fc измененную активность, например ослабляет одну или более чем одну эффекторную функцию Fc. В некоторых воплощениях слитый белок ActRIIB содержит аминокислотную последовательность, приведенную в формуле A-B-C. Например, часть B представляет собой усеченный по N- и C-концу полипептид ActRIIB, описанный в данном документе. Части A и C могут независимо представлять собой ноль, одну или более чем одну аминокислоту, и обе части A и C являются гетерологичными по отношению к B. Части A и/или C могут быть присоединены к части B посредством линкерной последовательности. В некоторых воплощениях слитый белок ActRIIB содержит лидерную последовательность. Лидерная последовательность может представлять собой нативную лидерную последовательность ActRIIB или гетерологичную лидерную последовательность. В некоторых воплощениях лидерная последовательность представляет собой лидерную последовательность тканевого активатора плазминогена (ТРА).

Полипептид ActRIIB, включая его варианты (например, ловушки GDF), может содержать последовательность для очистки, такую как эпитопная метка, метка FLAG, полигистидиновая последовательность и слияние с GST. Возможно, полипептид ActRIIB содержит один или более чем один модифицированный аминокислотный остаток, выбранный из: гликозилированной аминокислоты, ПЭГилированной аминокислоты, фарнезилированной аминокислоты, ацетилированной аминокислоты, биотинилированной аминокислоты и/или аминокислоты, конъюгированной с липидной группировкой. Полипептиды ActRIIB могут содержать по меньшей мере один N-связанный сахар, и могут включать два, три или более N-связанных сахаров. Такие полипептиды также могут содержать O-связанные сахара. В целом, предпочтительно, чтобы полипептиды ActRIIB экспрессировались в линии клеток млекопитающих, которая опосредует надлежащее гликозилирование полипептида, чтобы уменьшить вероятность нежелательного иммунного ответа у пациента. Полипептиды ActRIIB можно получать в различных клеточных линиях, которые гликозилируют белок подходящим для применения у пациента образом, включая сконструированные клетки насекомых или дрожжей и клетки млекопитающих, такие как клетки COS, клетки CHO, клетки HEK и клетки NSO. В некоторых воплощениях полипептид ActRIIB гликозилирован и имеет паттерн гликозилирования, полученный в линии клеток яичников китайского хомячка. В некоторых воплощениях полипептиды ActRIIB по описанию имеют время полужизни в сыворотке млекопитающего (например, мыши или человека) по меньшей мере 4, 6, 12, 24, 36, 48 или 72 ч. Возможно, ActRIIB может иметь время полужизни в сыворотке млекопитающего (например, мыши или человека) по меньшей мере 6, 8, 10, 12, 14, 20, 25 или 30 суток.

В некоторых аспектах описания предложены фармацевтические препараты, содержащие один или более чем один антагонист ActRIIB по данному описанию и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтический препарат может также содержать один или более чем один дополнительный активный агент, такой как соединение, которое применяют для лечения миелофиброза, в частности, лечения или предупреждения одного или более чем одного осложнения миелофиброза (например, спленомегалии, экстрамедуллярного гемопоэза, анемии и фиброза), и/или лечения пациента, получавшего лечение ингибитором Янус-киназы. В целом, фармацевтический препарат предпочтительно должен быть апиоро-

генным (означает, свободным от пирогенов в степени, соответствующей нормативным требованиям к качеству продуктов, применяемых в терапии).

В некоторых случаях при введении антагониста ActRIIB или комбинации антагонистов по описанию при нарушениях или состояниях, описанных в данном документе, может быть желательным отслеживать влияние на эритроциты при введении антагониста ActRIIB или определять или корректировать дозировку антагониста ActRIIB для уменьшения нежелательного влияния на эритроциты. Например, увеличение уровней эритроцитов, уровней гемоглобина или уровней гематокрита может вызывать нежелательное увеличение артериального давления.

В некоторых аспектах антагонист ActRIIB представляет собой антитело или комбинацию антител. В некоторых воплощениях антитело связывается по меньшей мере с ActRIIB. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с ActRIIB, ингибирует передачу сигнала ActRIIB, возможно, в исследовании на клетках, таком, как описано в данном документе. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с ActRIIB, ингибирует связывание с ActRIIB одного или более чем одного лиганда суперсемейства TGF-бета, рецептора I типа супер семейства TGF-бета или ко-рецептора суперсемейства TGF-бета. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с ActRIIB, ингибирует связывание с ActRIIB одного или более чем одного лиганда суперсемейства TGF-бета, выбранного из группы, состоящей из: активина (например, активина А, активина В, активина С, активина АВ, активина АС, активина ВС, активина Е, активина АЕ и активина ВЕ), GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP10, BMP9 и BMP5. В некоторых воплощениях антитело связывается по меньшей мере с GDF11. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с GDF11, ингибирует передачу сигнала ActRIIB, возможно, в исследовании на клетках, таком, как описано в данном документе. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с GDF11, ингибирует связывание GDF11-ActRIIB. В некоторых воплощениях антитело связывается по меньшей мере с GDF8. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с GDF8, ингибирует передачу сигнала ActRIIB, возможно, в исследовании на клетках, таком, как описано в данном документе. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с GDF8, ингибирует связывание GDF8-ActRIIB. В некоторых воплощениях антитело связывается по меньшей мере с BMP6. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с BMP6, ингибирует передачу сигнала ActRIIB, возможно, в исследовании на клетках, таком, как описано в данном документе. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с BMP6, ингибирует связывание BMP6-ActRIIB. В некоторых воплощениях антитело связывается по меньшей мере с BMP10. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с BMP10, ингибирует передачу сигнала ActRIIB, возможно, в исследовании на клетках, таком, как описано в данном документе. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с BMP10, ингибирует связывание BMP10-ActRIIB. В некоторых воплощениях антитело связывается по меньшей мере с GDF3. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с GDF3, ингибирует передачу сигнала ActRIIB, возможно, в исследовании на клетках, таком, как описано в данном документе. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с GDF3, ингибирует связывание GDF3-ActRIIB. В некоторых воплощениях антитело связывается по меньшей мере с активинном (например, активинном А, активинном В, активинном С, активинном АВ, активинном АС, активинном ВС, активинном Е, активинном АЕ и активинном ВЕ). В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с активинном (например, активинном А, активинном В, активинном С, активинном АВ, активинном АС, активинном ВС, активинном Е, активинном АЕ и активинном ВЕ), ингибирует передачу сигнала ActRIIB, возможно, в исследовании на клетках, таком, как описано в данном документе. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с активинном (например, активинном А, активинном В, активинном С, активинном АВ, активинном АС, активинном ВС, активинном Е, активинном АЕ и активинном ВЕ), ингибирует связывание активин-ActRIIB. В некоторых воплощениях антитело связывается с активинном В. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с активинном В, ингибирует передачу сигнала ActRIIB, возможно, в исследовании на клетках, таком, как описано в данном документе. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с активинном В, ингибирует связывание активин В-ActRIIB. В некоторых воплощениях антитело представляет собой мультиспецифическое антитело или комбинацию мультиспецифических антител, которые связываются с одним или более чем одним из: ActRIIB, GDF11, GDF8, активина А, активина В, BMP6 и BMP10. В некоторых воплощениях антитело связывается по меньшей мере с ALK4. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с ALK4, ингибирует передачу сигнала ALK4, возможно, в исследовании на клетках, таком, как описано в данном документе. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с ALK4, ингибирует связывание с ALK4 одного или более чем одного лиганда ActRIIB, рецептора II типа или ко-рецептора. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с ALK4, ингибирует связывание с ALK4 одного или более чем одного лиганда ActRIIB, выбранного из группы, состоящей из: активина (например, активина А, активина В, активина С, активина АВ, активина АС, активина ВС, активина Е, активина АЕ и активина ВЕ), GDF8, GDF11, BMP6, BMP10 и GDF3. В некоторых воплощениях антитело связывается по меньшей мере с ALK5. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с ALK5, ингибирует передачу сигнала ALK5, возможно, в исследовании на клетках, таком, как описано в данном документе. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с ALK5, ингибирует связывание с ALK5 одного или более чем одного лиганда ActRIIB, рецептора II типа или ко-

рецептора. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с ALK5, ингибирует связывание с ALK5 одного или более чем одного лиганда ActRIIB, выбранного из группы, состоящей из: активина (например, активина А, активина В, активина С, активина АВ, активина АС, активина ВС, активина Е, активина АЕ и активина ВЕ), GDF8, GDF11, BMP6, BMP10 и GDF3. В некоторых воплощениях антитело связывается по меньшей мере с ALK7. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с ALK7, ингибирует передачу сигнала ALK7, возможно, в исследовании на клетках, таком, как описано в данном документе. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с ALK7, ингибирует связывание с ALK7 одного или более чем одного лиганда ActRIIB, рецептора II типа или ко-рецептора. В некоторых воплощениях антитело, которое связывается с ALK7, ингибирует связывание с ALK7 одного или более чем одного лиганда ActRIIB, выбранного из группы, состоящей из: активина (например, активина А, активина В, активина С, активина АВ, активина АС, активина ВС, активина Е, активина АЕ и активина ВЕ), GDF8, GDF11, BMP6, BMP10 и GDF3. В некоторых воплощениях антитело связывается по меньшей мере с GDF11. В некоторых аспектах мультиспецифическое антитело или комбинация мультиспецифических антител в исследовании на клетках ингибирует передачу сигнала одного или более чем одного из: ActRIIB, GDF11, GDF8, активина А, активина В, GDF3, BMP6 и BMP10. В некоторых воплощениях антитело представляет собой химерное антитело, гуманизованное антитело или человеческое антитело. В некоторых воплощениях антитело представляет собой одноцепочечное антитело, F(ab')₂ фрагмент, одноцепочечное диатело, tandemные одноцепочечные Fv фрагменты, tandemное одноцепочечное диатело или слитый белок, содержащий одноцепочечное диатело и по меньшей мере часть константной области тяжелой цепи иммуноглобулина.

В некоторых аспектах антагонист ActRIIB представляет собой низкомолекулярный ингибитор или комбинацию низкомолекулярных ингибиторов. В некоторых воплощениях низкомолекулярный ингибитор представляет собой ингибитор по меньшей мере ActRIIB. В некоторых воплощениях низкомолекулярный ингибитор представляет собой ингибитор по меньшей мере ALK4. В некоторых воплощениях низкомолекулярный ингибитор представляет собой ингибитор по меньшей мере ALK5. В некоторых воплощениях низкомолекулярный ингибитор представляет собой ингибитор по меньшей мере ALK7. В некоторых воплощениях низкомолекулярный ингибитор представляет собой ингибитор по меньшей мере GDF11. В некоторых воплощениях низкомолекулярный ингибитор представляет собой ингибитор по меньшей мере GDF8. В некоторых воплощениях низкомолекулярный ингибитор представляет собой ингибитор по меньшей мере BMP6. В некоторых воплощениях низкомолекулярный ингибитор представляет собой ингибитор по меньшей мере BMP10. В некоторых воплощениях низкомолекулярный ингибитор представляет собой ингибитор по меньшей мере GDF3. В некоторых воплощениях низкомолекулярный ингибитор представляет собой ингибитор по меньшей мере активина (например, активина А, активина В, активина С, активина АВ, активина АС, активина ВС, активина Е, активина АЕ и активина ВЕ). В некоторых воплощениях низкомолекулярный ингибитор представляет собой ингибитор по меньшей мере активина В.

В некоторых аспектах антагонист ActRIIB представляет собой нуклеиновокислотный ингибитор или комбинацию нуклеиновокислотных ингибиторов. В некоторых воплощениях нуклеиновокислотный ингибитор представляет собой ингибитор по меньшей мере ActRIIB. В некоторых воплощениях нуклеиновокислотный ингибитор представляет собой ингибитор по меньшей мере ALK4. В некоторых воплощениях нуклеиновокислотный ингибитор представляет собой ингибитор по меньшей мере ALK5. В некоторых воплощениях нуклеиновокислотный ингибитор представляет собой ингибитор по меньшей мере ALK7. В некоторых воплощениях нуклеиновокислотный ингибитор представляет собой ингибитор по меньшей мере GDF11. В некоторых воплощениях нуклеиновокислотный ингибитор представляет собой ингибитор по меньшей мере GDF8. В некоторых воплощениях нуклеиновокислотный ингибитор представляет собой ингибитор по меньшей мере BMP6. В некоторых воплощениях нуклеиновокислотный ингибитор представляет собой ингибитор по меньшей мере BMP10. В некоторых воплощениях нуклеиновокислотный ингибитор представляет собой ингибитор по меньшей мере GDF3. В некоторых воплощениях нуклеиновокислотный ингибитор представляет собой ингибитор по меньшей мере активина (например, активина А, активина В, активина С, активина АВ, активина АС, активина ВС, активина Е, активина АЕ и активина ВЕ). В некоторых воплощениях нуклеиновокислотный ингибитор представляет собой ингибитор по меньшей мере активина В.

В некоторых аспектах антагонист ActRIIB представляет собой полипептид фоллистатин. В некоторых воплощениях полипептид фоллистатин содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 63. В некоторых воплощениях полипептид фоллистатин содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 64. В некоторых воплощениях полипептид фоллистатин содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 65. В некоторых воплощениях полипептид фоллистатин содержит аминокислотную последователь-

ность, которая по меньшей мере на 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66. В некоторых воплощениях полипептид фоллистатин содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 67.

В некоторых аспектах антагонист ActRIIB представляет собой полипептид FLRG. В некоторых воплощениях полипептид FLRG содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75% 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 68.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано выравнивание внеклеточных доменов человеческого ActRIIA (SEQ ID NO: 36) и человеческого ActRIIB (SEQ ID NO: 2) при этом остатки, предсказанные на основе полного анализа множества кристаллических структур ActRIIB и ActRIIA, которые непосредственно контактируют с лигандом, выделены в рамках.

На фиг. 2 показано выравнивание множества последовательностей белка ActRIIB различных позвоночных и человеческого ActRIIA (SEQ ID NOs: 37-43), а также консенсусная последовательность ActRII, выведенная на основе выравнивания (SEQ ID NO: 44).

На фиг. 3 показана полная аминокислотная последовательность ловушки GDF ActRIIB(L79D 20-134)-hFc (SEQ ID NO: 45), включая лидерную последовательность TPA (двойное подчеркивание), внеклеточный домен ActRIIB (остатки 20-134 в SEQ ID NO: 1; одинарное подчеркивание) и hFc домен. Аспарат, замещенный в положении 79 в нативной последовательности, подчеркнут двойной линией и выделен, как и глицин, который, по данным секвенирования, является N-концевым остатком в зрелом слитом белке.

На фиг. 4A и 4B показана нуклеотидная последовательность, кодирующая ActRIIB(L79D 20-134)-hFc. SEQ ID NO: 48 соответствует смысловой цепи, а SEQ ID NO: 49 соответствует антисмысловой цепи. Лидерная последовательность TPA (нуклеотиды 1-66) подчеркнута двойной линией, а внеклеточный домен ActRIIB (нуклеотиды 76-420) подчеркнута одинарной линией.

На фиг. 5 показана полная аминокислотная последовательность усеченной ловушки GDF ActRIIB(L79D 25-131)-hFc (SEQ ID NO: 50), включая лидерную последовательность TPA (двойное подчеркивание), усеченный внеклеточный домен ActRIIB (остатки 25-131 в SEQ ID NO: 1; одинарное подчеркивание) и hFc домен. Аспарат, замещенный в положении 79 в нативной последовательности, подчеркнут двойной линией и выделен, как и глутамат, который, по данным секвенирования, является N-концевым остатком в зрелом слитом белке.

На фиг. 6A и 6B показана нуклеотидная последовательность, кодирующая ActRIIB(L79D 25-131)-hFc. SEQ ID NO: 51 соответствует смысловой цепи, а SEQ ID NO: 52 соответствует антисмысловой цепи. Лидерная последовательность TPA (нуклеотиды 1-66) подчеркнута двойной линией, а усеченный внеклеточный домен ActRIIB (нуклеотиды 76-396) подчеркнут одинарной линией. Также показана аминокислотная последовательность внеклеточного домена ActRIIB (остатки 25-131 в SEQ ID NO: 1).

На фиг. 7 показана полная аминокислотная последовательность усеченной ловушки GDF ActRIIB(L79D 25-131)-hFc без лидерной последовательности (SEQ ID NO: 53). Усеченный внеклеточный домен ActRIIB (остатки 25-131 в SEQ ID NO: 1) подчеркнут. Аспарат, замещенный в положении 79 в нативной последовательности, подчеркнут двойной линией и выделен, как и глутамат, который, по данным секвенирования, является N-концевым остатком в зрелом слитом белке.

На фиг. 8 показана полная аминокислотная последовательность усеченной ловушки GDF ActRIIB(L79D 25-131)-hFc без лидерной последовательности, домена hFc и линкера (SEQ ID NO: 54). Аспарат, замещенный в положении 79 в нативной последовательности, подчеркнут и выделен, как и глутамат, который, по данным секвенирования, является N-концевым остатком в зрелом слитом белке.

На фиг. 9A и 9B показана альтернативная нуклеотидная последовательность, кодирующая ActRIIB(L79D 25-131)-hFc. SEQ ID NO: 55 соответствует смысловой цепи, а SEQ ID NO: 56 соответствует антисмысловой цепи. Лидерная последовательность TPA (нуклеотиды 1-66) подчеркнута двойной линией, а усеченный внеклеточный домен ActRIIB (нуклеотиды 76-396) подчеркнут, замены в нуклеотидной последовательности внеклеточного домена дикого типа подчеркнуты двойной линией и выделены (сравн. с SEQ ID NO: 51, фиг. 6A и 6B). Также показана аминокислотная последовательность внеклеточного домена ActRIIB (остатки 25-131 в SEQ ID NO: 1).

На фиг. 10 показаны нуклеотиды 76-396 (SEQ ID NO: 57) альтернативной нуклеотидной последовательности, показанной на фиг. 9A и 9B (SEQ ID NO: 55). Те же нуклеотидные замены, которые указаны на фиг. 9A и 9B, также подчеркнуты и выделены. SEQ ID NO: 57 кодирует только усеченный внеклеточный домен ActRIIB (соответствующий остаткам 25-131 в SEQ ID NO: 1) с заменой L79D, например, ActRIIB(L79D25-131).

На фиг. 11 показано выравнивание множества последовательностей Fc доменов человеческого IgG различных изотипов с использованием Clustal 2.1. Шарнирные участки отмечены точками.

На фиг. 12 показана полная аминокислотная последовательность ActRIIB (25-131)-hFc (SEQ ID NO:

58), не подвергаясь процессингу. Подчеркнута лидерная последовательность ТРА (остатки 1-22) и дважды усеченный внеклеточный домен ActRIIB (остатки 24-131, с использованием нумерации на основе нативной последовательности в SEQ ID NO: 1). Выделен глутамат, который, по данным секвенирования, является N-концевой аминокислотой в зрелом слитом белке, находящийся в положении 25 относительно SEQ ID NO: 1.

На фиг. 13А и 13В показана нуклеотидная последовательность, кодирующая ActRIIB(25-131)-hFc (кодирующая цепь показана вверх, SEQ ID NO: 59, а комплементарная показана вниз 3'-5', SEQ ID NO: 60). Последовательности, кодирующие лидерную последовательность ТРА (нуклеотиды 1-66) и внеклеточный домен ActRIIB (нуклеотиды 73-396) подчеркнуты. Также показана соответствующая аминокислотная последовательность ActRIIB(25-131).

На фиг. 14А и 14В показана альтернативная нуклеотидная последовательность, кодирующая ActRIIB(25-131)-hFc (кодирующая цепь показана вверх, SEQ ID NO: 61, а комплементарная показана вниз 3'-5', SEQ ID NO: 62). Данная последовательность обеспечивает более высокий уровень экспрессии белка у первых трансформантов, что ускоряет процесс развития клеточной линии. Последовательности, кодирующие лидерную последовательность ТРА (нуклеотиды 1-66) и внеклеточный домен ActRIIB (нуклеотиды 73-396) подчеркнуты, а замены нуклеотидной последовательности внеклеточного домена дикого типа (см. фиг. 13А и 13В) выделены. Также показана соответствующая аминокислотная последовательность ActRIIB(25-131).

Подробное описание изобретения

1. Общие сведения.

Суперсемейство трансформирующего фактора роста-бета (TGF-бета) включает различные факторы роста, которые обладают общими элементами последовательности и структурными мотивами. Известно, что эти белки оказывают биологические эффекты на различные типы клеток позвоночных и беспозвоночных. Представители семейства выполняют важные функции в ходе эмбриогенеза в формировании паттернов и специализации тканей и могут оказывать влияние на различные процессы дифференцировки, включая адипогенез, миогенез, хондрогенез, кардиогенез, гемопоэз, нейрогенез и дифференцирование эпителиальных клеток. Регулируя активность представителя семейства TGF-бета, часто возможно вызывать существенные биологические изменения в организме. Например, породы рогатого скота Piedmontese и Belgian Blue несут мутацию с утратой функции гена GDF8 (также обозначаемого миостатином), приводящую к существенному увеличению мышечной массы [см., например, Grobet et al. (1997) Nat Genet. 17(1):71-4]. Кроме того, у человека неактивные аллели GDF8 ассоциированы с увеличением мышечной массы и согласно имеющимся данным, исключительной силой [см., например, Schuelke et al. (2004) N Engl J Med, 350:2682-8].

Сигналы TGF-β опосредованы гетеромерными комплексами рецепторных серин/треонин-киназ типа I и типа II, которые при стимулировании лигандами фосфорилируют и активируют последующие звенья сигнального пути, белки SMAD (например, белки SMAD 1, 2, 3, 5 и 8) [см., например, Massagué (2000) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178]. Эти рецепторы I и II типа представляют собой трансмембранные белки, состоящие из лиганд-связывающего внеклеточного домена с богатой цистеином областью, трансмембранного домена и цитоплазматического домена с предсказанной специфичностью к серину/треонину. Рецепторы I типа играют существенную роль в передаче сигнала. Рецепторы II типа требуются для связывания лигандов и для активации рецепторов I типа. Рецепторы активина I и II типа образуют стабильный комплекс после связывания лигандов, в результате чего происходит фосфорилирование рецепторов I и II типа.

Два родственных рецептора II типа (ActRII), ActRIIA и ActRIIB идентифицированы в качестве II типа рецепторов активинов [см., например, Mathews and Vale (1991) Cell 65:973-982; и Attisano et al. (1992) Cell 68: 97-108]. Помимо активинов ActRIIA и ActRIIB могут биохимически взаимодействовать с несколькими другими белками семейства TGF-β, включая, например, BMP6, BMP7, Nodal, GDF8 и GDF11 [см., например, Yamashita et al. (1995) J. Cell Biol. 130:217-226; Lee and McPherron (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9306-9311; Yeo and Whitman (2001) Mol. Cell 7: 949-957; и Oh et al. (2002) Genes Dev. 16:2749-54]. ALK4 является основным рецептором I типа для активинов, в частности, для активина А, а ALK-7 может также служить рецептором для других активинов, в частности, для активина В.

Активины представляют собой димерные полипептидные факторы роста, которые относятся к суперсемейству TGF-бета. Существуют три основные формы активина (А, В и АВ), которые являются гомо/гетеродимерами из двух близкородственных субъединиц β (β_Аβ_А, β_Вβ_В и β_Аβ_В, соответственно). Человеческий геном также кодирует активин С и активин Е, которые преимущественно экспрессируются в печени, и также известны гетеродимерные формы, содержащие β_С или β_Е.

В суперсемействе TGF-бета активины являются уникальными и многофункциональными факторами, которые могут стимулировать продуцирование гормонов в клетках яичников и плаценты, поддерживать выживаемость нейронов, оказывать положительное или отрицательное влияние на прохождение клеточного цикла, в зависимости от типа клетки, и индуцировать дифференцировку мезодермы по меньшей мере у эмбрионов амфибий [DePaolo et al. (1991) Proc Soc Exp Biol Med. 198:500-512; Dyson et al.

(1997) *Curr Biol.* 7:81-84; и Woodruff (1998) *Biochem Pharmacol.* 55:953-963]. Кроме того, обнаружили, что фактор эритроидной дифференцировки (EDF), выделенный из стимулированных моноцитоподобных клеток человека с острым моноцитарным лейкозом, идентичен активину А [Murata et al. (1988) *PNAS*, 85:2434]. Предположили, что активин А способствует эритропоэзу в костном мозге. В нескольких типах тканей антагонистом сигнального пути активина является его гетеродимер, ингибин. Например, при высвобождении фолликулостимулирующего гормона (FSH) гипофизом активин способствует секреции и синтезу FSH, тогда как ингибин предотвращает секрецию и синтез FSH. Другие белки, способные регулировать биологическую активность активина и/или связываться с активином, включают фоллистатин (FS), фоллистатин-подобный белок (FSRP, также известный как FLRG или FSTL3) и α_2 -макроглобулин.

Согласно данному описанию, агенты, которые связываются с "активином А", представляют собой агенты, которые специфически связываются с субъединицей β_A , как с изолированной субъединицей β_A , так и в составе димерного комплекса (например, гомодимера $\beta_A\beta_A$ или гетеродимера $\beta_A\beta_B$). В случае гетеродимерного комплекса (например, гетеродимера $\beta_A\beta_B$), агенты, которые связываются с "активином А", являются специфичными в отношении эпитопов, присутствующих в составе субъединицы β_A , но не связываются с эпитопами, присутствующими в составе субъединицы комплекса, не являющейся субъединицей β_A (например, субъединицей β_B комплекса). Аналогично, агенты, которые являются антагонистами (ингибируют) "активин А", представляют собой агенты, которые ингибируют одну или более чем одну активность, опосредуемую субъединицей β_A , как изолированной субъединицей β_A , так и в составе димерного комплекса (например, гомодимера $\beta_A\beta_A$ или гетеродимера $\beta_A\beta_B$). В случае гетеродимеров $\beta_A\beta_B$ агенты, которые ингибируют "активин А", представляют собой агенты, которые специфически ингибируют одну или более чем одну активность субъединицы β_A , но не ингибируют активность субъединицы комплекса, не являющейся субъединицей β_A (например, субъединицей β_B комплекса). Данный принцип также относится к агентам, которые связываются и/или ингибируют "активин В", "активин С" и "активин Е". Агенты, раскрытые в данном документе, которые являются антагонистами "активина АВ", представляют собой агенты, которые ингибируют одну или более чем одну активность, опосредуемую субъединицей β_B .

Фактор роста и дифференцировки -8 (GDF8) также известен как миостатин. GDF8 представляет собой отрицательный регулятор массы скелетных мышц. GDF8 имеет высокий уровень экспрессии в развивающихся и взрослых скелетных мышцах. Нуль-мутация GDF8 у трансгенных мышей характеризуется выраженной гипертрофией и гиперплазией скелетных мышц [McPherron et al., *Nature* (1997) 387:83-90]. Аналогичное увеличение массы скелетных мышц является очевидным при мутациях естественного происхождения у рогатого скота [см., например, Ashmore et al. (1974) *Growth*, 38:501-507; Swatland and Kieffer (1994) *J. Anim. Sci.* 38:752-757; McPherron and Lee (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12457-12461; и Kambadur et al. (1997) *Genome Res.* 7:910⁹15] и, что поразительно, у человека [см., например, Schuelke et al. (2004) *N Engl J Med* 350:2682-8]. Исследования также показали, что потеря мышечной массы, ассоциированная с ВИЧ-инфекцией у человека, сопровождается увеличением экспрессии белка GDF8 [см., например, Gonzalez-Cadavid et al. (1998) *PNAS* 95:14938-43]. Кроме того, GDF8 может регулировать продукцию специфичных мышцам ферментов (например, креатинкиназы) и регулировать пролиферацию миоцитов (см., например, международную заявку на патент WO 00/43781). Пропептид GDF8 может нековалентно связываться с димеризованными доменами зрелого GDF8, инактивируя его биологическую активность [см., например, Miyazono et al. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263: 6407-6415; Wakefield et al. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263: 7646-7654; и Brown et al. (1990) *Growth Factors*, 3: 35-43]. Другие белки, связывающиеся с GDF8 или структурно родственными белками и ингибирующие их биологическую активность, включают фоллистатин и, возможно, фоллистатин-подобные белки [см., например, Gamer et al. (1999) *Dev. Biol.*, 208: 222-232].

Фактор роста и дифференцировки-11 (GDF11) также известный как BMP11, представляет собой секретлируемый белок [McPherron et al. (1999) *Nat. Genet.* 22. 260-264]. GDF11 экспрессируется в хвостовой почке, зачатке конечности, верхнечелюстной и нижнечелюстной дугах и дорсальных корешковых ганглиях при онтогенезе мышей [см., например, Nakashima et al. (1999) *Mech. Dev.* 80: 185-189]. GDF11 играет уникальную роль в формировании мезодермы и нервной ткани [см., например, Gamer et al. (1999) *Dev Biol.*, 208:222-32]. Показано, что GDF11 является отрицательным регулятором хондрогенеза и миогенеза при развитии крыла цыпленка [см., например, Gamer et al. (2001) *Dev Biol.* 229:407-20]. Экспрессия GDF11 в мышцах также предполагает его роль в регуляции роста мышц, аналогичную GDF8. Кроме того, экспрессия GDF11 в головном мозге предполагает, что GDF11 может также обладать активностями, которые относятся к функции нервной системы. Интересен тот факт, что GDF11 ингибирует нейрогенез в обонятельном эпителии [см., например, Wu et al. (2003) *Neuron.* 37:197-207].

Отчасти данное описание относится к наблюдению, что антагонист ActRIIB (ингибитор) может применяться для лечения пациентов с миелофиброзом, в частности, улучшения различных осложнений заболевания, включая, например, спленомегалию, экстрамедуллярный гемопоэз и фиброз. В частности, представленные данные свидетельствуют, что полипептид ловушка GDF уменьшает спленомегалию, экстрамедуллярный гемопоэз и фиброз на модели миелофиброза JAK2V617F. Соответственно, в некото-

рых аспектах описание относится к композициям и способам лечения миелофиброза, в частности, лечения или предупреждения одного или более чем одного осложнения миелофиброза (например, спленомегалии, экстрамедуллярного гемопоэза, анемии и фиброза), путем введения пациенту, которому это необходимо, эффективного количества одного или более чем одного антагониста ActR11B, возможно в комбинации с одним или более чем одним способом поддерживающей терапии или другим активным агентом для лечения миелофиброза.

Термины, используемые в данном описании, как правило, имеют стандартное значение в области техники, в контексте данного изобретения и в конкретном контексте, где используется каждый термин. Некоторые термины обсуждаются ниже или далее в описании и служат дополнительными указаниями практикующему специалисту при описании композиций и способов по изобретению, их получения и применения. Границы или значение любого используемого термина будут очевидны из конкретного контекста, в котором применяется термин.

"Гомологичный" и его грамматические формы и варианты написания относятся к взаимодействию между двумя белками, которые обладают "общим эволюционным происхождением", включая белки суперсемейства у организмов того же биологического вида, а также гомологичные белки от организмов разных видов. Такие белки (и кодирующие их нуклеиновые кислоты) имеют гомологичные последовательности, о чем свидетельствует сходство их последовательностей, как по показателю процента идентичности, так и по наличию специфических остатков или мотивов и положений консервативных аминокислот. В обычном употреблении и в данной заявке термин "гомологичный" с таким наречием как "высоко" может относиться к сходству последовательностей и может относиться или не относиться к общему эволюционному происхождению.

Термин "сходство последовательностей" и все его грамматические формы относятся к степени идентичности или соответствия между нуклеиновокислотными или аминокислотными последовательностями, которые могут обладать или не обладать общим эволюционным происхождением.

"Процент (%) идентичности" относительно эталонной полипептидной (или нуклеотидной) последовательности определяют как процент аминокислотных остатков (или нуклеиновых кислот) в кандидатной последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам (или нуклеиновым кислотам) в эталонной полипептидной (нуклеотидной) последовательности после выравнивания последовательностей и расстановки пропусков (гэпов), если это необходимо для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и без принятия каких-либо консервативных замен за часть идентичной последовательности. Выравнивание в целях определения процента идентичности аминокислотной последовательности может выполняться различными способами, известными в данной области техники, например с помощью общедоступных компьютерных программ, таких как BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить надлежащие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Однако, в данном описании значения % идентичности аминокислотных (нуклеиновокислотных) последовательностей получены при помощи компьютерной программы для сравнения последовательностей ALIGN-2. Компьютерная программа для сравнения последовательностей ALIGN-2 была разработана в компании Genentech, Inc., исходный код был представлен вместе с пользовательской документацией в бюро по охране авторских прав США, Washington D.C., 20559, где было зарегистрировано авторское право под номером TXU510087. Доступ к программе ALIGN-2 предоставляется компанией Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, Калифорния, или код программы может быть скомпилирован на основе исходного кода. Программа ALIGN-2 должна быть скомпилирована для работы на платформе UNIX, включая платформу digital UNIX V4.0D. Все параметры для сравнения последовательностей заданы программой ALIGN-2 и остаются неизменными.

"Являться агонистом" и все грамматические формы этого выражения относятся к процессу активации белка и/или гена (например, посредством активации или усиления экспрессии гена этого белка или посредством индуцирования перехода неактивного белка в активное состояние) или увеличению активности белка и/или гена.

"Являться антагонистом" и все грамматические формы этого выражения относятся к процессу ингибирования белка и/или гена (например, посредством ингибирования или снижения экспрессии гена этого белка или посредством индуцирования перехода активного белка в неактивное состояние) или снижению активности белка и/или гена.

Термины "примерно" и "приблизительно", которые используются в описании и в формуле изобретения применительно к численным значениям, обозначают точность, понятную и приемлемую для специалиста в области техники. Как правило, такая точность составляет $\pm 10\%$. В альтернативном варианте, и в частности, в биологических системах термины "приблизительно" и "примерно" могут означать значения, которые находятся в пределах одного порядка, предпочтительно, отличаясь от указанного значения не более чем в 5 раз и более предпочтительно не более чем в 2 раза.

Диапазоны численных значений в данном описании включают значения, обозначающие эти диапазоны.

Формы единственного числа включают ссылку на формы множественного числа, если из контекста,

в котором используется термин, явным образом не следует иное. Термины в единственном числе, а также термины "один или более чем один" и "по меньшей мере один" в данном документе могут использоваться взаимозаменяемо. Кроме того, "и/или" в данном документе следует понимать, как конкретное описание каждого из двух или более конкретных признаков или компонентов совместно или в отдельности. Так, термин "и/или", используемый в таком выражении, как "А и/или В" в данном документе включает "А и В," "А или В," "А" (отдельно) и "В" (отдельно). Аналогично, термин "и/или", используемый в таком выражении, как "А, В и/или С" в данном документе охватывает каждое из: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно).

В данном описании термин "содержать" или такие его варианты как "содержит" или "содержащий" следует понимать, как включение указанного целого значения или группы целых значений, но не исключение любого другого целого значения или группы целых значений.

2. Антагонисты ActRIIB.

Отчасти данное описание относится к наблюдению, что антагонист ActRIIB (ингибитор) может применяться для лечения пациентов с миелофиброзом, в частности, улучшения различных осложнений заболевания, включая, например, спленомегалию, экстрамедуллярный гемопоэз и фиброз. В частности, представленные здесь данные свидетельствуют, что полипептид ловушка GDF уменьшает спленомегалию, экстрамедуллярный гемопоэз и фиброз на модели миелофиброза JAK2V617F. Хотя воздействие растворимых полипептидов ловушек GDF на миелофиброз может быть опосредовано иным механизмом, нежели антагонизм ActRIIB [например, ингибированием одного или более чем одного из: GDF11, GDF8, активина В, BMP6, GDF3 и BMP10 может быть индикатором склонности агента ингибировать активности ряда дополнительных агентов, включая, возможно, других представителей суперсемейства TGF-бета, и такое коллективное ингибирование может приводить к желаемому воздействию, например, на миелофиброз], тем не менее описание демонстрирует, что желаемые терапевтические агенты могут быть выбраны по антагонизму ActRIIB. Таким образом, не желая связываться с каким-либо конкретным механизмом действия, ожидают, что другие антагонисты ActRIIB [например, антагонисты рецептора ActRIIB, антагонисты одного или более чем одного лиганда, связывающегося с ActRIIB (например, GDF11, GDF8, активина, BMP6, GDF3 и BMP10), антагонисты одного или более чем одного рецептора I типа (например, ALK4, ALK5 и/или ALK7), антагонисты одного или более чем одного ко-рецептора, антагонисты одного или более чем одного компонента последующих звеньев сигнального пути ActRIIB (например, Smad)], или комбинации таких антагонистов] могут быть полезны в лечении миелофиброза, в частности, в лечении или предупреждении различных осложнений, связанных с миелофиброзом (например, спленомегалии, экстрамедуллярного гемопоэза и фиброза). Такие агенты в данном документе совместно обозначаются "антагонисты ActRIIB" или "ингибиторы ActRIIB".

А. Полипептиды ActRIIB и их варианты.

В некоторых аспектах данное описание относится к полипептидам ActRIIB и их вариантам (например, ловушкам GDF). В частности, в описании предложены способы применения полипептидов ActRIIB в отдельности или в комбинации с одной или более чем одной дополнительной поддерживающей терапией для лечения миелофиброза, в частности, лечения или предупреждения одного или более чем одного осложнения миелофиброза (например, спленомегалии, экстрамедуллярного гемопоэза, анемии и фиброза) и/или лечения пациента, получавшего лечение ингибитором Янус-киназы. В данном описании термин "ActRIIB" относится к белкам семейства рецепторов активина типа IIB (ActRIIB) любых биологических видов и вариантов, которые произошли от таких белков ActRIIB в результате мутагенеза или другой модификации. Упоминание ActRIIB в данном описании следует понимать, как упоминание любой из идентифицированных в настоящее время форм. Представители семейства рецепторов ActRIIB, как правило, представляют собой трансмембранные белки, состоящие из лиганд-связывающего внеклеточного домена с богатой цистеином областью, трансмембранного домена и цитоплазматического домена с предсказанной серин/треонин киназной активностью.

Термин "полипептид ActRIIB" охватывает полипептиды, содержащие любой полипептид представителя семейства ActRIIB естественного происхождения, а также любые его варианты (включая мутанты, фрагменты, слитые белки и пептидомиметики), которые сохраняют полезную активность. Примеры такого варианта полипептидов ActRIIB приведены в данном описании, а также в международных заявках на патент WO 2006/012627 и WO 2008/097541, содержание которых включено во всей полноте путем ссылки. Нумерация аминокислот для всех родственных ActRIIB полипептидов, описанных в данном документе, основана на нумерации последовательности человеческого белка-предшественника ActRIIB, приведенной ниже (SEQ ID NO: 1), если явным образом не указано иное.

Ниже приведена последовательность человеческого белка-предшественника ActRIIB.

```

1 MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER TNQSLERCE
51 GEQDKRLHCY ASWRNSSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY
101 FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPP TAPTLLTVLA YSLLPIGGLS
151 LIVLLAFWY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLEIKARGR
201 FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA
251 EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLGKN IITWNECHV AETMSRGLSY
301 LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK
351 PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG LVLWELVSRG
401 KAADGPVDEY MLPFEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKMRPTI KDHWLKHPGL
451 AQLCVTIEEC WDHDAEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV
501 TNVDLPPKES SI (SEQ ID NO: 1).

```

Сигнальный пептид подчеркнут одинарной линией, внеклеточный домен указан жирным шрифтом, а потенциальные сайты эндогенного N-гликозилирования подчеркнуты двойной линией.

Ниже приведена последовательность внеклеточного ActRIIB полипептида, прошедшего процессинг (зрелого) полипептида:

```

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDLDFN
CYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPAPT (SEQ ID NO: 2).

```

В некоторых воплощениях белок может быть получен с последовательностью "SGR..." на N-конце. С-концевой "хвост" внеклеточного домена подчеркнут одинарной линией. Ниже приведена последовательность с делецией "хвоста" (последовательность A15):

```

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDLDFN
CYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (SEQ ID NO: 3).

```

Форма ActRIIB с аланином в положении 64 последовательности SEQ ID NO: 1 (A64) также описана в литературе [Hilden et al. (1994) Blood, 83(8): 2163-2170]. Заявители продемонстрировали, что слитый белок ActRIIB-Fc, содержащий внеклеточный домен ActRIIB с заменой A64 имеет относительно низкую аффинность к активину и GDF11. Напротив, тот же самый слитый белок ActRIIB-Fc с аргинином в положении 64 (R64) имеет аффинность к активину и GDF11 диапазоне от низко-наномолярного до высокопиколярного. Таким образом, в данном документе последовательности с R64 использовали в качестве эталонных последовательностей "дикого типа" для человеческого ActRIIB.

Ниже показана форма ActRIIB с аланином в положении 64.

```

1 MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER TNQSLERCE
51 GEQDKRLHCY ASWANSSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC VATEENPQVY
101 FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPP TAPTLLTVLA YSLLPIGGLS
151 LIVLLAFWY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLEIKARGR
201 FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA
251 EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLGKN IITWNECHV AETMSRGLSY
301 LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK
351 PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG LVLWELVSRG
401 KAADGPVDEY MLPFEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKMRPTI KDHWLKHPGL
451 AQLCVTIEEC WDHDAEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV
501 TNVDLPPKES SI (SEQ ID NO: 4).

```

Сигнальный пептид подчеркнут одинарной линией, а внеклеточный домен выделен жирным шрифтом.

Ниже приведена последовательность внеклеточного прошедшего процессинг (зрелого) полипептида ActRIIB альтернативной формы с A64:

```

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDLDFN
CYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPAPT (SEQ ID NO: 5).

```

В некоторых воплощениях белок может быть получен с последовательностью "SGR" на N-конце. С-концевой "хвост" внеклеточного домена подчеркнут одинарной линией. Ниже приведена последовательность с делецией "хвоста" (последовательность A15):

```

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDLDFN
CYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (SEQ ID NO: 6).

```

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-предшественник человеческого ActRIIB приведена ниже (SEQ ID NO: 7) и состоит из нуклеотидов 25-1560 эталонной последовательности Genbank NM_001106.3, кодирующей аминокислоты 1-513 предшественника ActRIIB. В приведенной последовательности аргинин находится в положении 64 и может быть заменен на аланин. Сигнальная последовательность подчеркнута.

1 ATGACGGCGC CCTGGGTGGC CCTCGCCCTC CTCTGGGGAT CGCTGTGCGC
51 CGGCTCTGGG CGTGGGGAGG CTGAGACACG GGAGTGCATC TACTACAACG
101 CCAACTGGGA GCTGGAGCGC ACCAACCAGA GCGGCCTGGA GCGCTGCGAA
151 GCGGAGCAGG ACAAGCGGCT GCACTGTACT GCCTCCTGGC GCAACAGCTC
201 TGGCACCATC GAGCTCGTGA AGAAGGGCTG CTGGCTAGAT GACTTCAACT
251 GCTACGATAG GCAGGAGTGT GTGGCCACTG AGGAGAACCC CCAGGTGTAC
301 TTCTGCTGCT GTGAAGGCAA CTTCTGCAAC GAACGCTTCA CTCATTTGCC
351 AGAGGCTGGG GGCCCGAAG TCACGTACGA GCCACCCCGG ACAGCCCCCA
401 CCCTGCTCAC GGTGCTGGCC TACTCACTGC TGCCCATCGG GGGCCTTTCC
451 CTCATCGTCC TGCTGGCCTT TTGGATGTAC CGGCATCGCA AGCCCCCTA
501 CGGTCATGTG GACATCCATG AGGACCCTGG GCCTCCACCA CCATCCCCTC
551 TGGTGGGCTT GAAGCCACTG CAGCTGCTGG AGATCAAGGC TCGGGGGCGC
601 TTTGGCTGTG TCTGGAAGGC CCAGCTCATG AATGACTTTG TAGCTGTCAA
651 GATCTTCCCA CTCCAGGACA AGCAGTCTGT GCAGAGTGAA CGGGAGATCT
701 TCAGCACACC TGGCATGAAG CACGAGAACC TGCTACAGTT CATTGCTGCC
751 GAGAAGCAGG GCTCCAACCT CGAAGTAGAG CTGTGGCTCA TCACGGCCTT
801 CCATGACAAG GGCTCCCTCA CGGATTACCT CAAGGGGAAC ATCATCACAT
851 GGAACGAAC GTGTCATGTA GCAGAGACGA TGTACAGAGG CCTCTCATA
901 CTGCATGAGG ATGTGCCCTG GTGCCGTGGC GAGGGCCACA AGCCGTCTAT
951 TGCCACAGG GACTTTAAAA GTAAGAATGT ATTGCTGAAG AGCGACCTCA
1001 CAGCCGTGCT GGCTGACTTT GGCTTGGCTG TTCGATTTGA GCCAGGGAAA
1051 CCTCCAGGGG ACACCCACGG ACAGGTAGGC ACGAGACGGT ACATGGCTCC
1101 TGAGGTGCTC GAGGGAGCCA TCAACTTCCA GAGAGATGCC TTCCTGCGCA
1151 TTGACATGTA TGCCATGGGG TTGGTGTGTG GGGAGCTTGT GTCTCGCTGC
1201 AAGGCTGCAG ACGGACCCGT GGATGAGTAC ATGCTGCCCT TTGAGGAAGA
1251 GATTGGCCAG CACCCTTCTG TGGAGGAGCT GCAGGAGGTG GTGGTGCACA
1301 AGAAGATGAG GCCCACCATT AAAGATCACT GGTGAAACA CCCGGGCTG
1351 GCCCAGCTTT GTGTGACCAT CGAGGAGTGC TGGGACCATG ATGCAGAGGC
1401 TCGCTTGTCC GCGGGCTGTG TGGAGGAGCG GGTGTCCCTG ATTCGGAGGT
1451 CGGTCAACGG CACTACCTCG GACTGTCTCG TTTCCCTGGT GACCTCTGTC
1501 ACCAATGTGG ACCTGCCCCC TAAAGAGTCA AGCATC (SEQ ID NO: 7).

Ниже приведена нуклеотидная последовательность, кодирующая внеклеточный человеческий полипептид ActRIIB, прошедший процессинг (SEQ ID NO: 8):

1 GGGGCTGGGG AGGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA ACGCCAACCT
51 GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCTT GGAGCGCTGC GAAGGCGAGC
101 AGGACAAGCG GCTGCACTGC TAGCCCTCCT GCGCAACAG CTCTGGCACC
151 ATCGAGCTCG TCAAGAACGG CTGCTGGCTA GATCACTTCA ACTGCTACCA
201 TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCAGGTG TACTTCTGCT
251 GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAACGCT TCACTCATTT GCCAGAGGCT
301 GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGCCC CCACC (SEQ ID NO: 8)

В приведенной последовательности аргинин находится в положении 64 и может быть заменен на аланин.

Выравнивание аминокислотных последовательностей внеклеточного домена человеческого ActRIIB и внеклеточного домена человеческого ActRIIA показана на фиг. 1. В этом выравнивании показаны аминокислотные остатки в обоих рецепторах, которые, как полагают, непосредственно контактируют с лигандами ActRII. Например, групповые структуры ActRII указали, что лиганд-связывающий карман ActRIIB определяется, частично остатками Y31, N33, N35, L38 - T41, E47, E50, Q53 - K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 - N83, Y85, R87, A92 и E94 - F101. Предполагают, что в указанных положениях будут допустимы консервативные мутации.

Кроме того, ActRIIB позвоночных, как правило, консервативен, при этом большие участки внеклеточного домена полностью консервативны. Например, на фиг. 2 показано выравнивание множества последовательностей внеклеточного домена человеческого ActRIIB по сравнению с различными ортологами ActRIIB. Многие лиганды, которые связываются с ActRIIB, также высоко консервативны. Соответственно, на основе данных выравниваний можно предсказать ключевые положения аминокислот в составе лиганд-связывающего домена, которые важны для нормальной лиганд-связывающей активности ActRIIB, а также предсказать аминокислотные положения, в которых возможно будут допустимы замены без существенного изменения нормальной лиганд-связывающей активности ActRIIB. Таким образом, активный вариант человеческого полипептида ActRIIB, который может найти применение согласно изложенным способам, может включать одну или более чем одну аминокислоту в соответствующих положениях последовательности ActRIIB другого позвоночного или может включать остаток, схожий с таковым в последовательностях человека или других позвоночных.

Не являясь исчерпывающими, приведенные примеры иллюстрируют данный подход для определения активного варианта ActRIIB. L46 в человеческом внеклеточном домене (SEQ ID NO: 2) представляет

собой валин в ActRIIB *Xenopus* (SEQ ID NO: 42), и поэтому в данном положении можно произвести замену и, возможно, замену на другой гидрофобный остаток, такой как V, I или F, или на неполярный остаток, такой как A. E52 в человеческом внеклеточном домене представляет собой K у *Xenopus*, указывая, что в данном сайте допустимы различные изменения, включая полярные остатки, такие как E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y и, возможно, A. T93 в человеческом внеклеточном домене представляет собой K у *Xenopus*, указывая, что в данном положении допустима большая структурная вариабельность, при этом предпочтительны полярные остатки, такие как S, K, R, E, D, H, G, P, G и Y. F108 в человеческом внеклеточном домене представляет собой Y у *Xenopus*, и поэтому Y или другая гидрофобная группа, такая как I, V или L должна быть допустима. E111 в человеческом внеклеточном домене представляет собой K у *Xenopus*, указывая, что в данном положении будут допустимы заряженные остатки, включая D, R, K и H, а также Q и N. R112 в человеческом внеклеточном домене представляет собой K у *Xenopus*, указывая, что в данном положении будут допустимы основные остатки, включая R и H. A в положении 119 в человеческом внеклеточном домене относительно слабо консервативен и представляет собой P у грызунов (SEQ ID NO: 37 и 39) и V у *Xenopus*, поэтому в данном положении должна быть допустима по существу любая аминокислота.

Кроме того, структурные/функциональные характеристики белков ActRII описаны в области техники, в частности, в том, что касается связывания с лигандами [Attisano et al. (1992) *Cell* 68(1):97-108; Greenwald et al. (1999) *Nature Structural Biology* 6(1): 18-22; Allendorph et al. (2006) *PNAS* 103(20): 7643-7648; Thompson et al. (2003) *The EMBO Journal* 22(7): 1555-1566; а также патенты US 7709605, 7612041 и 7842663]. Помимо данного описания, в процитированных документах приведены подробные сведения о создании вариантов ActRII, которые сохраняют одну или более чем одну необходимую активность (например, лиганд-связывающую активность).

Например, для связывания лиганда рецепторами I и II типа важно определить структурный мотив, известный как трехпалая укладка токсина (three-finger toxin fold) и образованный консервативными остатками цистеина, расположенными в различных положениях в составе внеклеточного домена каждого мономерного рецептора [Greenwald et al. (1999) *Nat Struct Biol* 6:18-22; и Hinck (2012) *FEBS Lett* 586:1860-1870]. Соответственно, основные лиганд-связывающие домены человеческого ActRIIB, границы которых определены консервативными цистеинами, находящимися ближе всего к наружной поверхности, соответствуют положениям 29-109 SEQ ID NO: 1 (предшественник ActRIIB). Таким образом, структурно менее упорядоченные аминокислоты, фланкирующие указанные ограниченные цистеинами ключевые последовательности, могут быть усечены приблизительно на 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 остатков по N-концу и/или приблизительно на 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 остатков по C-концу, что не обязательно изменит связывание с лигандом. Примеры внеклеточных доменов ActRIIB для усечения по N-концу и/или по C-концу включают SEQ ID NO: 2, 3, 5 и 6.

Attisano et al. показали, что делеция пролинового узла на C-конце внеклеточного домена ActRIIB снижала аффинность рецептора к активину. Слитый белок ActRIIB-Fc, содержащий аминокислоты 20¹¹⁹ данной последовательности SEQ ID NO: 1, "ActRIIB(20-119)-Fc", связывается с GDF11 и активином слабее, чем ActRIIB(20-134)-Fc, включающий в себя область пролинового узла и полный юкстамембранный домен (см., например, патент US 7842663). Однако, белок ActRIIB(20-129)-Fc сохраняет схожую, но несколько сниженную по сравнению с белком дикого типа активность даже при разрушении области пролинового узла. Таким образом, предполагают, что все внеклеточные домены ActRIIB, которые заканчиваются аминокислотами 134, 133, 132, 131, 130 и 129 (относительно SEQ ID NO: 1), будут обладать активностью, но конструкции, заканчивающиеся аминокислотами 134 или 133 будут обладать наибольшей активностью. Аналогично, предполагают, что мутации любого из остатков 129-134 (относительно SEQ ID NO: 1) не будут значительно изменять аффинность связывания с лигандом. В подтверждение этого предположения в области техники есть сведения, что мутации P129 и P130 (относительно SEQ ID NO: 1) не снижают существенным образом связывания с лигандом. Таким образом, полипептид ActRIIB по данному описанию может заканчиваться уже на аминокислоте 109 (последний цистеин), однако формы, заканчивающиеся на или между 109 и 119 (например, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118 или 119) предположительно будут связываться с лигандом слабее. Аминокислота 119 (относительно данной SEQ ID NO: 1) слабо консервативна и поэтому может быть легко заменена или отсечена. Полипептиды ActRIIB, заканчивающиеся на аминокислоте 128 (относительно SEQ ID NO: 1) или дальше должны сохранять лиганд-связывающую активность. Полипептиды ActRIIB, которые заканчиваются на или между аминокислотами 119 и 127 (например, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126 или 127) относительно SEQ ID NO: 1, будут обладать промежуточной связывающей способностью. Любая из указанных форм может быть востребованной для применения, в зависимости от клинических или экспериментальных условий.

Предполагают, что белок ActRIIB, начинающийся на N-конце аминокислотой 29 или ранее (относительно SEQ ID NO: 1) будет сохранять лиганд-связывающую активность. Аминокислота 29 представляет собой первый цистеин. Мутация в положении 24 (относительно SEQ ID NO: 1) с заменой аланина на аспарагин создает последовательность N-гликозилирования без существенного влияния на связывание лиганда [патент US 7842663]. Это подтверждает, что мутации в области между отщепляемым сигнальным

пептидом и областью с цистеиновыми мостиками, соответствующей аминокислотам 20-29, допустимы. В частности, полипептиды ActRIIB, начинающиеся в положении 20, 21, 22, 23 и 24 (относительно SEQ ID NO: 1) должны сохранять общую лиганд-связывающую активность, а полипептиды ActRIIB, начинающиеся в положениях 25, 26, 27, 28 и 29 (относительно SEQ ID NO: 1) также предположительно сохраняют лиганд-связывающую активность. Например, в патенте US 7842663 показано, что конструкции ActRIIB, начинающиеся аминокислотами 22, 23, 24 или 25 неожиданно проявляли наибольшую активность.

В совокупности, общая формула части ActRIIB, обладающей активностью (например, лиганд-связывающей части), содержит аминокислоты 29-109 последовательности SEQ ID NO: 1. Таким образом, полипептиды ActRIIB могут, например, содержать, по существу состоять из или состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична части ActRIIB, начинающейся остатком, соответствующим любой из аминокислот 20-29 (например, начинающейся любой из аминокислот 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29) последовательности SEQ ID NO: 1 и заканчивающейся в положении, соответствующем любой из аминокислот 109-134 (например, заканчивающейся любой из аминокислот 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134) SEQ ID NO: 1. Другие примеры включают полипептиды, которые начинаются в положениях 20-29 (например, в любом из положений 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29) или 21-29 (например, в любом из положений 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29) и заканчиваются в положениях 119-134 (например, в любом из положений 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134), 119-133 (например, в любом из положений 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132 или 133), 129-134 (например, в любом из положений 129, 130, 131, 132, 133 или 134) или 129-133 (например, в любом из положений 129, 130, 131, 132 или 133) SEQ ID NO: 1. Другие примеры включают полипептиды, которые начинаются в положениях 20-24 (например, в любом из положений 20, 21, 22, 23 или 24), 21-24 (например, в любом из положений 21, 22, 23 или 24) или 22-25 (например, в любом из положений 22, 23 или 25) и заканчиваются в положениях 109-134 (например, в любом из положений 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134), 119-134 (например, в любом из положений 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134) или 129-134 (например, в любом из положений 129, 130, 131, 132, 133 или 134) SEQ ID NO: 1. Варианты с границами в указанных диапазонах также входят в рамки изобретения, в частности, такие, которые идентичны по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% соответствующей части SEQ ID NO: 1.

Варианты, описанные в данном документе, можно комбинировать различным образом. В некоторых воплощениях варианты ActRIIB содержат не более чем 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 15 консервативных аминокислотных замен в лиганд-связывающем кармане и ноль, одну или более неконсервативных модификаций в положениях 40, 53, 55, 74, 79 и/или 82 в лиганд-связывающем кармане. Сайты за пределами связывающего кармана, в которых вариативность может быть наиболее допустима, включают аминокси- и карбокси-концы внеклеточного домена (как отмечено выше) и положения 42-46 и 65-73 (относительно SEQ ID NO: 1). Замена аспарагина на аланин в положении 65 (N65A) на самом деле улучшает связывание лиганда формой, несущей A64, и поэтому полагают, что она не будет оказывать отрицательного влияния на связывание лиганда формой, несущей R64 [патент US 7842663]. Это изменение, возможно, устраняет гликозилирование по N65 формы, несущей A64, демонстрируя таким образом, что существенное изменение в данной области с большой вероятностью допустимо. Тогда как замена R64A плохо выдерживается, R64K выдерживается хорошо и поэтому другой основной остаток, такой как H может допускаться в положении 64 [патент US 7842663]. Кроме того, результаты мутагенеза, описанные в области техники, указывают, что существуют положения аминокислот в ActRIIB, которые зачастую выгодно сохранять. Относительно SEQ ID NO: 1 эти положения включают положение 80 (отрицательно заряженная или гидрофобная аминокислота), положение 78 (гидрофобная аминокислота и, в частности, триптофан), положение 37 (отрицательно заряженная аминокислота и, в частности, аспарат или глутаминовая кислота), положение 56 (положительно заряженная аминокислота), положение 60 (гидрофобная аминокислота, в частности, фенилаланин или тирозин). Таким образом, в данном описании предложен каркас аминокислот, которые могут быть сохранены в полипептидах ActRIIB. Другими положениями, которые может быть желательно сохранять, являются: положение 52 (отрицательно заряженная аминокислота), положение 55 (положительно заряженная аминокислота), положение 81 (отрицательно заряженная аминокислота), 98 (полярная или заряженная аминокислота, в частности, E, D, R или K), все относительно SEQ ID NO: 1.

Ранее было продемонстрировано, что добавление дополнительного сайта N-гликозилирования (N-X-S/T) во внеклеточный домен ActRIIB допустимо (см., например, патент US 7842663). Таким образом, последовательности N-X-S/T обычно можно встраивать в положения за пределами лиганд-связывающего кармана полипептида ActRIIB по данному описанию, обозначенные на фиг. 1. Наиболее подходящими сайтами для встраивания последовательностей N-X-S/T, не являющихся эндогенными, являются аминокислоты 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 или 129-134 (относительно SEQ ID NO: 1). Последователь-

ности N-X-S/T также можно вводить в линкер между последовательностью ActRIIB и Fc доменом или другим компонентом слитого белка. Такой сайт можно встроить с минимальными усилиями путем встраивания N в надлежащее положение относительно предсуществующего S или T или путем встраивания S или T в положение, соответствующее предсуществующему N. Таким образом, желаемыми заменами, способными приводить к образованию сайта N-гликозилирования, являются: A24N, R64N, S67N (возможно в комбинации с модификацией N65A), E105N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S и R112T (относительно SEQ ID NO: 1).

Любой S, который согласно расчетам является гликозилированным, может быть изменен на T без создания иммуногенного сайта, благодаря защите, обеспечиваемой гликозилированием. Аналогично, любой T, который согласно расчетам, является гликозилированным, может быть изменен на S. Таким образом, предполагаются модификации S67T и S44T (относительно SEQ ID NO: 1). Аналогично, у варианта A24N можно использовать модификацию S26T. Соответственно, полипептид ActRIIB по данному описанию может представлять собой вариант, имеющий одну или более чем одну дополнительную не являющуюся эндогенной консенсусную последовательность N-гликозилирования, как описано выше.

В некоторых воплощениях описание относится к антагонистам ActRIIB, которые содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, который включает в себя фрагменты, функциональные варианты и их модифицированные формы. Предпочтительно, полипептиды ActRIIB для применения по данному изобретению являются растворимыми (например, внеклеточный домен ActRIIB). В некоторых воплощениях полипептиды ActRIIB для применения по данному изобретению ингибируют (являются антагонистами) активность (например, передачу сигнала Smad) одного или более чем одного лиганда суперсемейства TGF-бета [например, GDF11, GDF8, активина (активина А, активина В, активина АВ, активина С, активина Е) BMP6, GDF3 и/или BMP10. В некоторых воплощениях полипептиды ActRIIB для применения по данному изобретению связываются с одним или более чем одним лигандом суперсемейства TGF-бета [например, GDF11, GDF8, активин (активин А, активин В, активин АВ, активин С, активин Е) BMP6, GDF3, BMP10 и/или BMP9. В некоторых воплощениях полипептид ActRIIB по данному изобретению содержит, по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична части ActRIIB, начинающейся остатком, соответствующим аминокислотам 20-29 (например, начинающейся любой из аминокислот 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29) последовательности SEQ ID NO: 1 и заканчивающейся в положении, соответствующем аминокислотам 109-134 (например, заканчивающейся любой из аминокислот 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, или 134) последовательности SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях полипептиды ActRIIB по изобретению содержат, по существу состоят из или состоят из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотам 29-109 последовательности SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях полипептиды ActRIIB по изобретению содержат, по существу состоят из или состоят из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотам 29-109 последовательности SEQ ID NO: 1, где положение, соответствующее L79 в SEQ ID NO: 1, представляет собой отрицательно заряженную аминокислоту (отрицательно заряженные аминокислоты естественного происхождения D и E или отрицательно заряженную аминокислоту искусственного происхождения). В некоторых предпочтительных воплощениях полипептиды ActRIIB по изобретению содержат, по существу состоят из или состоят из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотам 25-131 последовательности SEQ ID NO: 1. В некоторых предпочтительных воплощениях полипептиды ActRIIB по изобретению содержат, по существу состоят из или состоят из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотным последовательностям любых из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 25, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 45, 50, 53, 54 и 58. В некоторых воплощениях полипептиды ActRIIB по изобретению содержат, по существу состоят из или состоят из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотным последовательностям любых из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 25, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 45, 50, 53, 54 и 58, где положение, соответствующее L79 в SEQ ID NO: 1, представляет собой отрицательно заряженную аминокислоту. В некоторых воплощениях полипептиды ActRIIB по изобретению содержат, по существу состоят из или состоят из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотным последовательностям любых из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 25, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 45, 50, 53, 54 и 58, где положение, соответствующее L79 в SEQ ID NO: 1, представляет собой отрицательно заряженную аминокислоту. В некоторых воплощениях полипептиды ActRIIB по изобретению содержат по меньшей мере один полипептид ActRIIB, где положение, соответствующее L79 последовательности SEQ ID NO: 1, не является отрицательно заряженной

аминокислотой (т.е. не является отрицательно заряженными аминокислотами естественного происхождения D и E или отрицательно заряженным аминокислотным остатком искусственного происхождения).

В некоторых аспектах данное описание относится к полипептидам ловушкам GDF (также обозначаемым "ловушки GDF"). В некоторых воплощениях ловушки GDF по данному изобретению представляют собой варианты полипептидов ActRIIB, которые содержат одну или более чем одну мутацию (например, добавления, делеции, замены аминокислот и их комбинации) во внеклеточном домене (также обозначаемом лиганд-связывающий домен) полипептида ActRIIB (например, полипептида ActRII "дикого типа" или немодифицированного), так что вариант полипептида ActRIIB имеет одну или более чем одну лиганд-связывающую активность, измененную по сравнению с полипептидом ActRIIB дикого типа. В предпочтительных воплощениях полипептиды ловушки GDF по данному описанию сохраняют по меньшей мере одну схожую активность, как соответствующий полипептид ActRIIB дикого типа. Например, предпочтительные ловушки GDF связывают и ингибируют (например, являются антагонистами) функции GDF11 и/или GDF8. В некоторых воплощениях ловушки GDF по данному описанию дополнительно связываются с и ингибируют один или более чем один лиганд суперсемейства TGF-бета. Соответственно, в данном описании предложены полипептид ловушки GDF, которые обладают измененной специфичностью связывания по отношению к одному или более чем одному лиганду ActRIIB.

В качестве иллюстрации, можно выбрать одну или более чем одну мутацию для увеличения селективности измененного лиганд-связывающего домена к GDF11 и/или GDF8 по сравнению с одним или более чем одним ActRIIB-связывающимся лигандом, таким как активины (активин А, активин В, активин АВ, активин С и/или активин Е), в частности, активин А. Возможно, измененный лиганд-связывающий домен имеет соотношение K_D для связывания активина и K_D для связывания GDF11 и/или GDF8 по меньшей мере в 2-, 5-, 10²-, 20-, 50-, 100- или даже в 1000 раз выше чем таковое соотношение у лиганд-связывающего домена дикого типа. Возможно, измененный лиганд-связывающий домен имеет соотношение IC_{50} для ингибирования активина и IC_{50} для ингибирования GDF11 и/или GDF8 по меньшей мере в 2-, 5-, 10²-, 20-, 50-, 100- или даже в 1000 раз выше чем такое соотношение для лиганд-связывающего домена дикого типа. Возможно, измененный лиганд-связывающий домен ингибирует GDF11 и/или GDF8 с IC_{50} по меньшей мере в 2-, 5-, 10²-, 20-, 50-, 100- или даже в 1000 раз меньше, чем IC_{50} для ингибирования активина (например, активина А).

В некоторых предпочтительных воплощениях ловушки GDF по данному описанию созданы для предпочтительного связывания GDF11 и/или GDF8 (также известного как миостатин). Возможно, ловушки, связывающие GDF11 и/или GDF8, могут дополнительно связываться с активинем В. Возможно, ловушки, связывающие GDF11 и/или GDF8, могут дополнительно связываться с BMP6. Возможно, ловушки, связывающие GDF11 и/или GDF8, могут дополнительно связываться с BMP10. Возможно, ловушки, связывающие GDF11 и/или GDF8, могут дополнительно связываться с активинем В и BMP6. В некоторых воплощениях ловушки GDF по данному описанию обладают пониженной аффинностью связывания с активинами (например, активинем А, активинем А/В, активинем В, активинем С, активинем Е), например, в сравнении с полипептидом ActRIIB дикого типа. В некоторых предпочтительных воплощениях полипептид ловушка GDF по данному описанию обладает пониженной аффинностью связывания с активинем А.

Аминокислотные остатки белков ActRIIB (например, E39, K55, Y60, K74, W78, L79, D80 и F101) находятся в лиганд-связывающем кармане ActRIIB и способствуют опосредованному связыванию с его лигандами, включая, например, активин А, GDF11 и GDF8. Таким образом, в данном описании предложены полипептиды ловушки GDF, содержащие измененный лиганд-связывающий домен (например, GDF8/GDF11-связывающий домен) рецептора ActRIIB, который содержит одну или более чем одну мутацию указанных аминокислотных остатков.

В качестве конкретного примера, положительно заряженный аминокислотный остаток Asp (D80) лиганд-связывающего домена ActRIIB может быть мутирован в другой аминокислотный остаток с получением полипептида ловушки GDF, который предпочтительно связывается с GDF8, но не с активинем. Предпочтительно, остаток D80 относительно SEQ ID NO: 1 заменен аминокислотным остатком, выбранным из группы, состоящей из: незаряженного аминокислотного остатка, отрицательно заряженного аминокислотного остатка и гидрофобного аминокислотного остатка. В качестве другого конкретного примера, гидрофобный остаток L79 последовательности SEQ ID NO: 1 может быть изменен с целью придания измененных свойств связывания активин-GDF11/GDF8. Например, замена L79P уменьшает связывание GDF11 в большей степени, чем связывание активина. Напротив, замена L79 отрицательно заряженной аминокислотой [аспарагиновой кислотой или глутаминовой кислотой; замена L79D или L79E] в большой степени снижает аффинность связывания активина А при сохранении аффинности связывания GDF11. В приведенных в качестве примера воплощениях в описанных способах применяют полипептид ловушку GDF, который представляет собой вариант полипептида ActRIIB, содержащий отрицательно заряженную аминокислоту, например, D или E) в положении, соответствующем положению 79 в последовательности SEQ ID NO: 1, возможно в комбинации с одной или более чем одной дополнительной заменой, добавлением или делецией аминокислот.

В некоторых воплощениях данное описание предусматривает создание функциональных вариантов

посредством модификации структуры полипептида ActRIIB для таких задач, как увеличение терапевтической эффективности или стабильности (например, время хранения и устойчивость к протеолитической деградации *in vivo*). Варианты могут быть получены посредством замены, делеции, добавления аминокислот или их комбинаций. Например, резонно ожидать, что изолированное замещение лейцина изолейцином или валином, аспартата глутаматом, треонина серином или аналогичное замещение аминокислоты структурно родственной аминокислотой (например, консервативные мутации) не будут оказывать значимого влияния на биологическую активность получаемой в результате молекулы. Консервативные замены представляют собой замены, которые происходят в семействе аминокислот, имеющих схожие боковые цепи. Приведет ли замена в аминокислотной последовательности полипептида по описанию к получению функционального гомолога, можно легко определить, оценивая способность варианта полипептида вызывать клеточный ответ схожим с полипептидом дикого типа образом или связывать один или более чем один лиганд TGF-бета, включая, например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, белок nodal, нейротрофический фактор глиальных клеток (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, мюллерову ингибирующую субстанцию (MIS) и белок Lefty.

В некоторых воплощениях данного изобретения предусмотрены специфические мутации полипептида ActRIIB для изменения гликозилирования полипептида. Такие мутации могут быть выбраны для внедрения или удаления одного или более чем одного сайта гликозилирования, такого как сайт О-гликозилирования или N-гликозилирования. Сайты гликозилирования по аспарагину обычно содержат трипептидную последовательность, аспарагин-Х-треонин или аспарагин-Х-серин (где "Х" представляет собой любую аминокислоту), которая специфически распознается соответствующими клеточными ферментами, осуществляющими гликозилирование. Изменение также может быть осуществлено посредством добавления или замены одного или более чем одного остатка серина или треонина к последовательности полипептида (для сайтов О-гликозилирования). Ряд аминокислотных замен или делеций в одном из положений или в обоих положениях первой и третьей аминокислоты сайта гликозилирования (и/или делеция аминокислоты во втором положении) приводит к отсутствию гликозилирования модифицированной трипептидной последовательности. Другим способом увеличения числа углеводных группировок на полипептиде является химическое или ферментативное связывание гликозидов с полипептидом. В зависимости от использованного способа присоединения, углевод(ы) может(гут) быть присоединен(ы) к: (а) аргинину и гистидину; (б) свободным карбоксильным группам; (в) свободным сульфгидрильным группам, таким как у цистеина; (г) свободным гидроксильным группам, таким как у серина, треонина или гидроксипролина; (д) ароматическим остаткам, таким как у фенилаланина, тирозина или триптофана, или (е) амидной группе глутамина. Удаление одной или более чем одной углеводной группировки, присутствующей на полипептиде, можно выполнять химическим и/или ферментативным способом. Химическое дегликозилирование может включать, например, воздействие на полипептид соединения трифторметансульфоновой кислоты или соединения-эквивалента. Такое воздействие приводит к отщеплению большинства или всех углеводов, за исключением связывающего углевода (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), при этом аминокислотная последовательность остается интактной. Ферментативное отщепление углеводов группировок на полипептиде может достигаться при использовании различных эндо- и экзо-гликозидаз, таких как описанные Thotakura et al. [Meth. Enzymol. (1987) 138:350]. Последовательность полипептида можно корректировать надлежащим образом, в зависимости от типа используемой системы экспрессии, поскольку клетки млекопитающих, дрожжей, насекомых и растений могут создавать различные паттерны гликозилирования, которые могут зависеть от аминокислотной последовательности пептида. В целом, полипептиды по данному описанию для применения у человека можно экспрессировать в клеточной линии млекопитающих, которая обеспечивает надлежащее гликозилирование, такой как клеточные линии НЕК293 или CHO, хотя предположительно можно применять и другие экспрессирующие клеточные линии млекопитающих.

В данном описании также предусмотрен способ создания мутантов, в частности, ряда комбинаторных мутантов полипептида ActRIIB, а также усеченных мутантов. Пулы комбинаторных мутантов особенно эффективны для обнаружения функционально активных (например, связывающих лиганд супер семейства TGF-бета) последовательностей ActRIIB. Целью скрининга таких комбинаторных библиотек может быть создание, например, вариантов полипептидов, которые обладают измененными свойствами, такими как измененная фармакокинетика или измененное связывание лиганда. Ниже представлены разнообразные способы скрининга и такие исследования можно применять для оценки вариантов. Например, скрининг вариантов ActRIIB можно осуществлять по способности связывать один или более чем один лиганд супер семейства TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активин А, активин В, активин АВ, активин АС, белок nodal, нейротрофический фактор глиальных клеток (GDNF), нейротурин, артемин, персефин, мюллерову ингибирующую субстанцию (MIS) и белок Lefty) для предупреждения связывания лиганда супер-

семейства TGF-бета с рецептором суперсемейства TGF-бета и/или для предотвращения передаче сигнала, инициированного лигандом суперсемейства TGF-бета.

Активность полипептидов ActRIIB также можно изучать в исследованиях на клетках или исследованиях *in vivo*. Например, можно оценивать влияние полипептида ActRIIB на экспрессию генов, опосредующих острую миелофиброзу. При необходимости это можно осуществлять в присутствии одного или более чем одного рекомбинантного белка-лиганда ActRII (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активина А, активина В, активина С, активина Е, активина АВ, активина АС, белка nodal, нейротрофического фактора глиальных клеток (GDNF), нейротурин, артемина, персефина, MIS и белка Lefty), и можно трансфицировать клетки, чтобы они производили полипептид ActRIIB и, возможно, лиганд ActRIIB. Аналогично, полипептид ActRIIB можно вводить мышам или другим животным и оценивать влияние на миелофиброз способами, известными в области техники. Аналогично, активность полипептида ActRIIB или его варианта можно исследовать на гемопоэтических клетках-предшественниках, для обнаружения какого-либо влияния на рост этих клеток, например, в исследованиях, описанных в данном документе или известных в области техники. Для наблюдения за влиянием на последующие звенья сигнального пути в таких клеточных линиях можно использовать SMAD-зависимый ген-репортер.

Можно создавать комбинаторные варианты, которые обладают повышенной селективностью или повышенной общей активностью по сравнению с эталонным полипептидом ActRIIB. При экспрессии в рекомбинантных ДНК-конструкциях такие варианты можно применять в протоколах генной терапии. Аналогично, мутагенез может дать начало вариантам, у которых время полужизни внутри клетки заметно отличается от соответствующего немодифицированного полипептида ActRIIB. Например, измененный белок можно сделать более стабильным или менее стабильным к протеолитическому расщеплению или другим клеточным процессам, которые приводят к разрушению или иной инактивации немодифицированного полипептида. Такие варианты и гены, кодирующие их, можно использовать для изменения уровней полипептидного комплекса путем регулирования времени полужизни полипептида. Например, короткое время полужизни может привести к более транзиторным биологическим эффектам и, будучи частью индуцибельной экспрессирующей системы, обеспечивать более тонкую регуляцию уровней рекомбинантного полипептидного комплекса внутри клетки. Для изменения времени полужизни полипептида ActRIIB в слитых с Fc белках мутации могут затрагивать линкер (при наличии такового) и/или Fc часть.

Комбинаторная библиотека может быть создана в форме вырожденной библиотеки генов, кодирующих библиотеку полипептидов, каждый из которых включает в себя по меньшей мере часть потенциальных последовательностей ActRIIB. Например, смесь синтетических олигонуклеотидов можно ферментативным способом лигировать с последовательностью генов таким образом, чтобы ряд вырожденных нуклеотидных последовательностей, потенциально кодирующих ActRIIB, экспрессировался в виде отдельных полипептидов, или в альтернативном варианте, в виде ряда более крупных слитых белков (например, для фагового дисплея).

Существует множество способов создания библиотеки потенциальных гомологов из вырожденной олигонуклеотидной последовательности. Химический синтез вырожденной последовательности гена можно проводить с помощью автоматического синтезатора ДНК, а синтезированные гены можно затем лигировать в соответствующий вектор для экспрессии. Синтез вырожденных олигонуклеотидов хорошо известен в области техники [Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al. (1981) *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura et al. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al. (1984) *Science* 198:1056; и Ike et al. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477]. Такие способы использовались в направленном изменении других белков [Scott et al., (1990) *Science* 249:386-390; Roberts et al. (1992) *PNAS USA* 89:2429-2433; Devlin et al. (1990) *Science* 249: 404-406; Swirla et al, (1990) *PNAS USA* 87: 6378-6382; а также патенты US 5223409, 5198346 и 5096815].

В альтернативном варианте, для создания комбинаторной библиотеки можно применять другие формы мутагенеза. Например, полипептиды ActRIIB по описанию можно создавать и выделять из библиотеки посредством скрининга, например, с использованием, например, аланин-сканирующего мутагенеза [Ruf et al. (1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balint et al. (1993) *Gene* 137:109-118; Grodberg et al. (1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashima et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892; Lowman et al. (1991) *Biochemistry* 30:10832-10838; and Cunningham et al. (1989) *Science* 244:1081-1085], посредством сканирования с помощью линкера [Gustin et al. (1993) *Virology* 193:653-660; и Brown et al. (1992) *Mol. Cell Biol.* 12:2644-2652; McKnight et al. (1982) *Science* 232:316], посредством насыщающего мутагенеза [Meyers et al., (1986) *Science* 232:613]; мутагенеза посредством PCR (полимеразная цепная реакция) [Leung et al. (1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19]; или случайного мутагенеза, включая химический мутагенез [Miller et al. (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; and Greener et al. (1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34]. Сканирование с помощью линкера, в частности, в комбинаторных подходах, является привлекательным способом обнаружения усеченных (биологически активных) форм полипептидов ActRIIB.

В области техники известен широкий спектр способов скрининга генных продуктов комбинаторных

библиотек, созданных в результате точечных мутаций и усечений и даже скрининга библиотек кДНК на генные продукты, обладающие определенными свойствами. Такие способы обычно адаптируются для быстрого скрининга библиотек генов, созданных посредством комбинаторного мутагенеза полипептидов ActRIIB. Наиболее широко используемые способы скрининга больших библиотек генов обычно включают клонирование библиотеки гена в реплицируемые экспрессирующие векторы, трансформацию соответствующих клеток полученными библиотеками векторов и экспрессию комбинаторных генов в условиях, при которых выявление желаемой активности способствует относительно легкому выделению вектора, кодирующего ген, продукт которого выявляют. Предпочтительные исследования включают исследования связывания лиганда TGF-бета (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активина А, активина В, активина С, активина Е, активина АВ, активина АС, белка nodal, нейротрофического фактора глиальных клеток (GDNF), нейротурин, артемина, персефина, MIS и белка Lefty), и/или исследования клеточной сигнализации, опосредованной лигандом TGF-бета.

Специалисты в области техники поймут, что большинство описанных мутаций, вариантов или модификаций, описанных в данном документе, могут быть осуществлены на уровне нуклеиновой кислоты или, в некоторых случаях, посредством посттрансляционной модификации или химического синтеза. Такие способы хорошо известны в области техники и некоторые из них описаны в данном документе. Отчасти данное описание позволяет выявить функционально активные части (фрагменты) и варианты полипептидов ActRIIB, которые могут применяться в качестве ориентира для создания и применения других вариантов полипептидов ActRIIB, входящих в рамки предложенных изобретений.

В некоторых воплощениях функционально активные фрагменты полипептидов ActRIIB по данному описанию могут быть получены посредством скрининга полипептидов, полученных рекомбинантными способами из соответствующего фрагмента нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид (например, SEQ ID NOs: 7, 8, 26, 32, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61 и 62). Кроме того, фрагменты могут быть химически синтезированы способами, хорошо известными в области техники, такими как предложенный Меррифилдом стандартный твердофазный метод использованием f-Мос или t-Вос-защищенных аминокислот. Фрагменты могут быть получены (рекомбинантным способом или при помощи химического синтеза) и исследованы для обнаружения таких пептидных фрагментов, которые могут выполнять функцию антагонистов (ингибиторов) рецепторов ActRII, и/или одного или более чем одного лиганда (например, BMP2, BMP2/7, BMP3, BMP4, BMP4/7, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP9, BMP10, GDF3, GDF5, GDF6/BMP13, GDF7, GDF8, GDF9b/BMP15, GDF11/BMP11, GDF15/MIC1, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активина А, активина В, активина С, активина Е, активина АВ, активина АС, белка nodal, нейротрофического фактора глиальных клеток (GDNF), нейротурин, артемина, персефина, MIS и белка Lefty).

В некоторых воплощениях полипептиды ActRIIB по данному изобретению могут дополнительно содержать посттрансляционные модификации помимо тех, которые присутствуют в полипептиде ActRIIB естественным образом. Такие модификации включают, без ограничения, ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, липидирование и ацилирование. В результате полипептид ActRIIB может содержать не являющиеся аминокислотами элементы, такие как полиэтиленгликоли, липиды, полисахариды или моносахариды и фосфаты. Влияние таких не являющихся аминокислотами элементов на функциональность полипептида-ловушки лиганда можно исследовать, как описано в данном документе для других вариантов ActRIIB. Когда полипептид по описанию продуцируют в клетках путем расщепления синтезируемой формы полипептида, посттрансляционный процессинг может быть также важен для правильного сворачивания и/или функции белка. Различные клетки (например, CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 или HEK293) имеют специфический клеточный аппарат и характерные механизмы для такой посттрансляционной активности и могут быть выбраны для обеспечения правильной модификации и процессинга полипептидов ActRII).

В некоторых аспектах полипептиды ActRIIB по данному описанию включают слитые белки, имеющие по меньшей мере часть (домен) полипептида ActRIIB и одну или более чем одну гетерологичную часть (домен). Хорошо известные примеры таких слитых доменов включают, без ограничения, полигистидин, Glu-Glu, глутатион-S-трансферазу (GST), тиоредоксин, белок А, белок G, константную область тяжелой цепи иммуноглобулина (Fc), белок, связывающий мальтозу (MBP) или человеческий сывороточный альбумин. Слитый домен может быть выбран так, чтобы придавать желаемое свойство. Например, некоторые слитые домены особенно эффективны для выделения слитых белков посредством аффинной хроматографии. Для аффинной очистки применяют соответствующие матрицы, такие как смолы, конъюгированные с глутатионом, амилазой, а также никелем или кобальтом. Многие из таких матриц имеются в продаже в форме "наборов", таких как система для очистки меченых GST белков фирмы Pharmacia и система QIAexpress™ (Qiagen), используемая для слитых с гексагистидином (HIS₆) партнеров по связыванию. В качестве другого примера, слитый домен может быть выбран так, чтобы облегчать выявление полипептида ActRIIB. Примеры таких доменов для выявления включают различные флуорес-

центные белки (например, GFP), а также "эпитопные метки", которые обычно представляют собой короткие пептидные последовательности, к которым имеется специфическое антитело. Хорошо известные эпитопные метки, для которых легко найти специфические моноклональные антитела, включают эпитопы FLAG, гемагглютинин (HA) вируса гриппа и эпитопы с-тус. В некоторых случаях слитые домены имеют сайт расщепления протеазой, такой как для фактора Ха или тромбина, что позволяет соответствующим протеазам частично расщеплять слитые белки и таким образом высвободить рекомбинантные белки. Высвобожденные белки затем можно выделять из слитых доменов посредством последующего хроматографического разделения. Другие виды слитых доменов, которые могут быть выбраны, включают мультимеризующиеся (например, димеризующиеся, тетрамеризующиеся) домены и функциональные домены (которые придают дополнительную биологическую функцию), включая, например, константные домены иммуноглобулинов (например, домены Fc).

В некоторых аспектах полипептиды ActRIIB по данному описанию имеют одну или более чем одну модификацию, способную "стабилизировать" полипептиды. Под "стабилизацией" понимают все, что увеличивает время полужизни *in vitro*, время полужизни в сыворотке, независимо от того, происходит ли это благодаря уменьшению распада, уменьшению клиренса почками или другим фармакокинетическим эффектам агента. Например, такие модификации улучшают время хранения полипептидов, улучшают время полужизни полипептидов в циркуляции и/или снижают протеолитическую деградацию полипептидов. Такие стабилизирующие модификации включают, без ограничения, слитые белки (включая, например, слитые белки, содержащие домен полипептида ActRIIB и стабилизирующий домен), модификации сайта гликозилирования (включая, например, добавление сайта гликозилирования к полипептиду по изобретению) и модификации углеводной группировки (включая, например, удаление углеводных группировок у полипептида по изобретению). В данном описании термин "стабилизирующий домен" относится не только к слитому домену (например, Fc домену иммуноглобулина), как в случае слитых белков, но также включает небелковые модификации, такие как углеводная группировка или небелковые группировки, такие как полиэтиленгликоль. В некоторых предпочтительных воплощениях полипептид ActRIIB слит с гетерологичным доменом, стабилизирующим полипептид ("стабилизирующий" домен), предпочтительно, с гетерологичным доменом, который увеличивает стабильность полипептида *in vivo*. Слияние с константным доменом иммуноглобулина (например, Fc доменом), как известно, придает желаемые фармакокинетические свойства широкому спектру белков. Аналогично, слияние с человеческим сывороточным альбумином может придавать желаемые свойства.

Пример нативной аминокислотной последовательности, которую можно применять для Fc части человеческого IgG1 (G1Fc) приведен ниже (SEQ ID NO: 9). Пунктирная линия обозначает шарнирный участок, а сплошная линия указывает расположение с вариантами естественного происхождения. В части изобретения предложенных полипептиды, которые содержат, по существу состоят из или состоят из аминокислотных последовательностей, которые на 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны SEQ ID NO: 9. Варианты G1Fc естественного происхождения будут включать E134D и M136L согласно системе нумерации, использованной для SEQ ID NO: 9 (см. Uniprot P01857).

```

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLTCLVKGK
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFPLYSKLTV DKSRRWQQGNV
201 FSCVMHEAL HNHYTQKSL S LSPGK (SEQ ID NO: 9)

```

Возможно, Fc домен IgG1 имеет один или более чем один мутированный остаток, такой как Asp-265, лизин 322 и Asn-434. В некоторых случаях мутантный Fc домен IgG1, имеющий одну или более чем одну такую мутацию (например, мутацию Asp-265), обладает пониженной способностью связываться с Fc γ рецептором по сравнению с Fc доменом дикого типа. В других случаях мутантный Fc домен IgG1, имеющий одну или более чем одну такую мутацию (например, мутацию Asn-434), обладает повышенной способностью связываться с Fc-рецептором, схожим с белками MHC класса I (FcRN), по сравнению с Fc доменом IgG1 дикого типа.

Пример нативной аминокислотной последовательности, которую можно применять для Fc части человеческого IgG2 (G2Fc) приведен ниже (SEQ ID NO: 10). Пунктирная линия обозначает шарнирный участок, а двойная линия указывает положения, где в последовательности существуют противоречия между базами данных (согласно UniProt P01859). В части изобретения предложены полипептиды, которые содержат, по существу состоят из или состоят из аминокислотных последовательностей, которые на 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны SEQ ID NO: 10.

```

1  VECPPCPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ
51  FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS
101 NKGLPAPIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFP
151 SDIAVEWESN GPENNYKTT PPLDSDGSGF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
201 CSMVHEALHN HYTQKSL SLS PGK (SEQ ID NO 10)

```

Ниже приведены два примера аминокислотных последовательностей, которые можно применять для Fc части человеческого IgG3 (G3Fc). Шарнирный участок G3Fc может быть длиннее практически в 4 раза по сравнению с другими цепями Fc и содержать три идентичных сегмента из 15 остатков, перед которыми расположен схожий сегмент из 17 остатков. Первая последовательность G3Fc, приведенная ниже (SEQ ID NO: 11), содержит короткий шарнирный участок, состоящий из единственного сегмента из 15 остатков, а вторая последовательность G3Fc (SEQ ID NO: 12) содержит полноразмерный шарнирный участок. В каждом случае пунктирная линия обозначает шарнирный участок, а сплошная линия указывает положения с вариантами естественного происхождения согласно UniProt P01859. В части изобретения предложены полипептиды, которые содержат, по существу состоят из или состоят из аминокислотных последовательностей, которые на 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны SEQ ID NO: 11 и 12.

```

1  EPKSCDTPPP CPRCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
51  VSHEDEPEVQF KQYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTFRVVSV LTVLHQDWLN
101 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKTRGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
151 TCLVKGFYPS DIAVEWESSG QPENNYNTTP PMLDSGGSFF LYSKLTVDKS
201 RWQQGNIFSC SVMHEALHNR FTQKLSLSLSP GK (SEQ ID NO 11)

1  ELKTFPLGDTT HTCPRCPEPK SCDTPPPCPR CPEPKSCDTP PPCPRCPEPK
51  SCDTPPPCPR CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTP ETCVVVDVSH
101 EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
151 YKCKVSNKAL PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL
201 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ
251 QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KLSLSLSLGK (SEQ ID NO 12)

```

Варианты G3Fc естественного происхождения (например, см. UniProt P01860) включают E68Q, P76L, E79Q, Y81F, D97N, N100D, T124A, S169N, S169del, F221Y при переходе к системе нумерации, использованной для SEQ ID NO: 11, и в данном описании предложены слитые белки, содержащие домены G3Fc, имеющие одну или более чем одну указанную вариацию. Кроме того, ген иммуноглобулина человека IgG3 (IGHG3) демонстрирует структурный полиморфизм, характеризующийся различной длиной шарнирных участков [см. UniProt P01859]. В частности, у варианта WIS отсутствует большая часть области V и вся область CH1. Он имеет дополнительную дисульфидную связь в положении 7 шарнирного участка дополнительно к присутствующей обычно в положении 11. У варианта ZUC отсутствует большая часть области V, вся область CH1 и часть шарнирного участка. Вариант OMM может представлять собой аллельную форму или иметь гамма цепь другого подкласса. В данном описании предложены дополнительные слитые белки, содержащие домены G3Fc, содержащие один или более чем один из указанных вариантов.

Пример нативной аминокислотной последовательности, которую можно применять для Fc части человеческого IgG4 (G4Fc), приведен ниже (SEQ ID NO: 13). Пунктирная линия обозначает шарнирный участок. В части изобретения предложены полипептиды, которые содержат, по существу состоят из или состоят из аминокислотных последовательностей, которые на 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны SEQ ID NO: 13.

```

1  ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTP ETCVVVDVSQ
51  EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
101 YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL
151 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ
201 EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KLSLSLSLGK (SEQ ID NO 13)

```

В данном документе представлены различные мутации последовательности G1Fc (SEQ ID NO: 9), полученные методом генетической инженерии, и аналогичные мутации могут быть получены в G2Fc, G3Fc и G4Fc использованием выравнивания с G1Fc, приведенного на фиг. 11. Из-за неравной длины шарнирных участков в аналогичных положениях Fc при выравнивании изотипов (фиг. 11) находятся различные аминокислоты в SEQ ID NOs: 9, 10, 11, 12 и 13. Кроме того, следует отметить, что положение заданной аминокислоты в последовательности иммуноглобулина, состоящей из шарнирного участка, областей C_H2 и C_H3 (например, SEQ ID NOs: 9, 10, 11, 12 и 13) будет обозначаться другим номером, если нумерация охватывает весь константный домен тяжелой цепи IgG1 (состоящий из областей C_H1, шарнирного участка, C_H2 и C_H3), как в базе данных UniProt. Например, ниже приведены некоторые соответствующие положения в C_H3 области последовательности G1Fc человека (SEQ ID NO: 9), константном домене тяжелой цепи IgG1 (UniProt P01857) и тяжелой цепи IgG1 человека.

Соответствие положений C _H 3 в различных системах нумерации		
G1Fc (Нумерация начинается первым треонином шарнирной области)	Константный домен тяжелой цепи IgG1 (Нумерация начинается C _H 1)	Тяжелая цепь IgG1 (Схема нумерации EU по Kabat et al., 1991*)
Y127	Y232	Y349
S132	S237	S354
E134	E239	E356
T144	T249	T366
L146	L251	L368
K170	K275	K392
D177	D282	D399
Y185	Y290	Y407
K187	K292	K409

* Kabat et al. (eds) 1991; pp. 688-696 in *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Vol. 1, NIH, Bethesda, MD.

Следует понимать, что различные элементы слитых белков (например, белков, слитых с Fc иммуноглобулина) могут располагаться любым образом, соответствующим желаемой функциональности. Например, домен полипептида ActRIIB может располагаться в направлении С-конца относительно гетерологичного домена или, в альтернативном варианте, гетерологичный домен может располагаться в направлении С-конца относительно домена полипептида ActRIIB. Домен полипептида ActRIIB и гетерологичный домен не обязательно должны быть смежными в составе слитого белка, и между доменами могут располагаться дополнительные домены или аминокислотные последовательности, как в направлении С-конца, так и в направлении N-конца относительно любого домена или между доменами.

Например, слитый с рецептором ActRIIB белок может содержать аминокислотную последовательность, приведенную в формуле А-В-С. Часть В соответствует домену полипептида ActRIIB. Части А и С могут независимо быть 0, 1 или более чем одной аминокислотой, и обе части А и С являются гетерологичными по отношению к В. Части А и/или С могут быть присоединены к части В посредством линкерной последовательности. Линкер может быть обогащен глицином (например, 2-10, 2-5, 2-4, 2-3 остатками глицина) или остатками глицина и пролина, например, содержать единственную последовательность, состоящую из треонина/серина или глицинов или повторяющиеся последовательности, состоящие из треонина/серина или глицинов, например, GGG (SEQ ID NO: 14), GGGG (SEQ ID NO: 15), TGGGG (SEQ ID NO: 16), SGGGG (SEQ ID NO: 17), TGGG (SEQ ID NO: 18), SGGG (SEQ ID NO: 19) или GGGGS (SEQ ID NO: 20) как в одинарном виде, так и в повторяющемся. В некоторых воплощениях слитые с ActRIIB белки содержат аминокислотную последовательность, приведенную в формуле А-В-С, где А представляет собой лидерную (сигнальную) последовательность, В состоит из домена полипептида ActRIIB, а С представляет собой часть полипептида, которая улучшает одно или более чем одно из следующего: стабильность *in vivo*, время полужизни *in vivo*, всасывание/введение, локализацию или распределение в ткани, образование белковых комплексов и/или очистку. В некоторых воплощениях слитые с ActRIIB белки содержат аминокислотную последовательность, приведенную в формуле А-В-С, где А представляет собой лидерную последовательность ТРА, В состоит из домена полипептида ActRIIB, а С представляет собой Fc домен иммуноглобулина. Предпочтительные слитые белки содержат аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 24, 25, 28, 29, 31, 33, 34, 45, 50, 53 и 58.

В предпочтительных воплощениях полипептиды ActRIIB для применения согласно способам, описанным в данном документе, представляют собой выделенные полипептиды. В данном описании выделенный белок или полипептид представляет собой белок или полипептид, изолированный от компонентов его естественного окружения. В некоторых воплощениях полипептид по изобретению очищен до степени чистоты более чем 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по данным, например, электрофоретического (например, с помощью SDS-PAGE (электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия), изоэлектрического фокусирования (IEF), капиллярного электрофореза) или хроматографического определения (например, с помощью ионообменной или обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC)). Способы оценки чистоты антител хорошо известны в области техники [см., например, Flatman et al., (2007) *J. Chromatogr. B* 848:79-87]. В некоторых воплощениях полипептиды ActRIIB для применения согласно способам, описанным в данном документе, представляют собой рекомбинантные полипептиды.

Полипептиды ActRIIB по изобретению можно получать различными известными в области техники способами. Например, полипептиды по изобретению можно синтезировать стандартными методами синтеза белков, такими, которые описаны Bodansky, M. *Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Berlin (1993) and Grant G.A. (ed.), *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W.H. Freeman and Company, New York (1992). Кроме того, имеются в продаже автоматизированные синтезаторы пептидов (например, Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Biosearch 9600). В альтернативном варианте полипептиды по изобретению, включая фрагменты или их варианты могут быть получены рекомбинантным способом, с использо-

ванием различных систем экспрессии (например, *E. coli*, клеток яичников китайского хомячка (CHO), клеток COS, бакуловируса), как хорошо известно в области техники. В следующем воплощении модифицированные или немодифицированные полипептиды по изобретению могут быть получены путем расщепления полученных рекомбинантным способом полипептидов ActRIIB с применением, например, протеазы, например, трипсина, термолизина, химотрипсина, пепсина или фермента, расщепляющего белок в месте спаренных основных аминокислот (РАСЕ). Для обнаружения сайтов расщепления протеазы можно применять компьютерный анализ (с применением имеющихся в продаже программ, например, MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.). В альтернативном варианте такие полипептиды можно получать из полноразмерных полипептидов ActRIIB, полученных рекомбинантным способом, с применением химического расщепления (например, бромцианом, гидроксиламином и т.д.)

Б. Нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды ActRIIB.

В некоторых воплощениях данного описания предложены выделенные и/или рекомбинантные нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды ActRIIB (включая фрагменты, функциональные варианты (например, ловушки GDF) и их слитые белки). Например, SEQ ID NO: 7 кодирует полипептид-предшественник человеческого ActRIIB естественного происхождения (вариант R64, описанный в данном документе), тогда как SEQ ID NO: 8 кодирует прошедший процессинг внеклеточный домен ActRIIB (варианта R64, описанного в данном документе). Рассматриваемые нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными или двуцепочечными. Такие нуклеиновые кислоты могут представлять собой молекулы ДНК или РНК. Такие нуклеиновые кислоты можно применять, например, в способах для создания полипептидов-ловушек лигандов на основе ActRII, как описано в данном документе.

Выделенная нуклеиновая кислота в данном документе обозначает молекулу нуклеиновой кислоты, изолированную от компонентов ее естественного окружения. Выделенная нуклеиновая кислота охватывает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, как правило содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, при этом молекула нуклеиновой кислоты находится внехромосомно или в участке хромосомы, отличном от ее естественного положения на хромосоме.

В некоторых воплощениях нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды ActRIIB по изобретению, понимают как охватывающие нуклеиновые кислоты, представляющие собой варианты любой из SEQ ID NO: 7, 8, 26, 32, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61 и 62. Варианты нуклеотидных последовательностей включают последовательности, которые отличаются одной или более чем одной нуклеотидной заменой, добавлением или делецией, включая аллельные варианты, и, следовательно, включают кодирующие последовательности, отличающиеся от нуклеотидной последовательности, обозначенной любой из SEQ ID NO: 7, 8, 26, 32, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61 и 62.

В некоторых воплощениях полипептиды ActRIIB по изобретению кодируются последовательностями выделенных или рекомбинантных нуклеиновых кислот, которые по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны любой из SEQ ID NO: 7, 8, 26, 32, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61 и 62. Специалисту в области техники понятно, что по последовательности нуклеиновых кислот, которые по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны последовательностям, комплементарным SEQ ID NO: 7, 8, 26, 32, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61 и 62 и их вариантам, также входят в объем данного изобретения. В следующих воплощениях последовательности нуклеиновых кислот по изобретению могут быть выделенными, рекомбинантными и/или слитыми с гетерологичной нуклеотидной последовательностью или в библиотеке ДНК.

В других воплощениях нуклеиновые кислоты по данному изобретению также охватывают нуклеотидные последовательности, которые гибридизуются в очень жестких условиях с нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 7, 8, 26, 32, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61 и 62, последовательностями, комплементарными SEQ ID NO: 7, 8, 26, 32, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61 и 62 или их фрагментами. Как обсуждалось выше, специалист в области техники легко поймет, что соответствующие жесткие условия, способствующие гибридизации ДНК, могут варьировать. Как обсуждалось выше, специалист в области техники легко поймет, что соответствующие жесткие условия, способствующие гибридизации ДНК, могут варьировать. Например, можно осуществлять гибридизацию 6,0 x хлорид натрия/цитрат натрия (SSC) приблизительно при 45°C, с последующей промывкой 2,0 x SSC при 50°C. Например, концентрация соли на стадии промывки может быть выбрана от низкой жесткости приблизительно 2,0 x SSC при 50°C до высокой жесткости приблизительно 0,2 x SSC при 50°C. Кроме того, температура на стадии промывки может быть повышена от комнатной температуры в условиях низкой жесткости, приблизительно при 22°C, до приблизительно 65°C в условиях высокой жесткости. Как температура, так и концентрация соли могут варьировать, или температура, так и концентрация соли могут оставаться постоянными при изменении другой переменной. В одном воплощении описания предложены нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются в условиях низкой жесткости при 6 x SSC при комнатной температуре с последующей промывкой 2 x SSC при комнатной температуре.

Выделенные нуклеиновые кислоты, которые отличаются от нуклеиновых кислот, приведенных в SEQ ID NO: 7, 8, 26, 32, 48, 49, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61 и 62 вследствие вырожденности генетического

кода, также входят в объем данного изобретения. Например, ряд аминокислот кодируется более чем одним триплетом. Кодоны, которые кодируют одну и ту же аминокислоту, или синонимичные кодоны (например, CAU и CAC являются синонимичными кодонами, кодирующими гистидин), могут приводить к "молчащим" мутациям, которые не влияют на аминокислотную последовательность белка. Однако, предполагают, что в клетках млекопитающих присутствует полиморфизм последовательности ДНК, который приводит к изменениям аминокислотной последовательности рассматриваемых белков. Специалист в области техники поймет, что у индивидов заданного биологического вида могут существовать такие вариации в одном или более чем одном нуклеотиде (приблизительно до 3-5% нуклеотидов) нуклеиновых кислот, кодирующих конкретный белок, что обусловлено аллельным разнообразием естественного происхождения. Любые из таких нуклеотидных вариантов и обусловленный ими полиморфизм аминокислот входят в объем данного изобретения.

В некоторых воплощениях рекомбинантные нуклеиновые кислоты по данному изобретению могут быть функционально связанными с одной или более чем одной регуляторной нуклеотидной последовательностью в экспрессирующей конструкции. Регуляторные нуклеотидные последовательности обычно соответствуют клетке-хозяину, используемой для экспрессии. В области техники известны различные экспрессирующие векторы и подходящие регуляторные последовательности, и их можно применять в различных клетках-хозяевах. Как правило, одна или более чем одна регуляторная последовательность может включать, без ограничения, последовательности промотора, лидерные или сигнальные последовательности, сайты связывания рибосом, последовательности инициации и терминации транскрипции, а также последовательности энхансера или активатора. Конститутивные или индуцибельные промоторы, известные в области техники, входят в объем изобретения. Промоторы могут представлять собой либо промоторы естественного происхождения, либо гибридные промоторы, сочетающие элементы одного или более чем одного промотора. Экспрессирующая конструкция может находиться в клетке или эписоме, такой как плазида, или экспрессирующая конструкция может быть встроена в хромосому. В некоторых воплощениях экспрессирующий вектор содержит селективируемый маркерный ген, позволяющий отбирать трансформированные клетки-хозяева. Селективируемые маркерные гены хорошо известны в области техники и могут отличаться в зависимости от используемой клетки-хозяина.

В некоторых аспектах рассматриваемая нуклеиновая кислота по данному изобретению представлена в виде экспрессирующего вектора, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид ActRIIB и функционально связанную по меньшей мере с одной регуляторной последовательностью. Регуляторные последовательности известны в области техники и выбираются для направления экспрессии полипептида ActRIIB. Соответственно, термин "регуляторная последовательность" включает промоторы, энхансеры и другие элементы, контролирующие экспрессию. Примеры регуляторных последовательностей описаны Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990). Например, для экспрессии ДНК-последовательностей, кодирующих полипептид ActRIIB, в таких векторах можно применять любые из последовательностей, контролирующих экспрессию, которые могут контролировать экспрессию последовательности ДНК, функционально связанной с ними. Такие последовательности, контролирующие экспрессию, включают, например, ранний и поздний промоторы SV40, промотор tet, немедленный ранний промотор аденовируса или цитомегаловируса, промоторы RSV, систему lac, систему trp, систему TAC или TRC, промотор T7, чья экспрессия контролируется РНК-полимеразой T7, область основного оператора и промотора ага лямбда, контролирующие области белка оболочки бактериофага fd, промотор 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, промоторы кислой фосфатазы, например, Pho5, промоторы α -фактора спаривания дрожжей, промотор полигедрона бакуловirusной системы и другие последовательности, которые, как известно, контролируют экспрессию генов прокариотических или эукариотических клеток или их вирусов и различные их комбинации. Следует понимать, что дизайн экспрессирующего вектора может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации и/или типа белка, который желательно экспрессировать. Кроме того, следует учитывать число копий вектора, способность контролировать такое число копий и экспрессию любого другого белка, кодируемого вектором, такого как маркеры устойчивости к антибиотикам.

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

Некоторые векторы для экспрессии в клетках млекопитающих включают как последовательности прокариот, способствующие продуцированию вектора в бактериях, так и одну или более эукариотических транскрипционных единиц, которые экспрессируются в клетках эукариот. Векторы на основе pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo и pHyg являются примерами векторов для экспрессии в клетках млекопитающих, подходящих для

трансфекции эукариотических клеток. Некоторые из этих векторов модифицируют последовательностями бактериальных плазмид, таких как pBR322, для улучшения репликации и отбора по устойчивости к антибиотикам как в прокариотических, так и в эукариотических клетках. В альтернативном варианте для транзитной экспрессии белков в эукариотических клетках можно использовать производные таких вирусов, как вирус папилломы крупного рогатого скота (BPV-1) или вируса Эпштейна-Барр (производных pHEBo, pREP и p205). Примеры других систем экспрессии на основе вирусов (включая ретровирусы) приведены ниже в описании систем доставки генной терапии. В области техники хорошо известны различные способы, используемые для получения плазмид и для трансформации организмов-хозяев. Другие подходящие системы экспрессии для прокариотических и эукариотических клеток, а также общие рекомбинантные методы описаны, например, в *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3rd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). В некоторых случаях может быть желательно экспрессировать рекомбинантные полипептиды с применением системы экспрессии на основе бакуловируса. Примеры таких систем экспрессии на основе бакуловируса включают векторы производные pVL (такие как pVL1392, pVL1393 и pVL941), векторы производные pAcUW (такие как pAcUW1) и векторы производные pBlueBac (такие как pBlueBac III, содержащий β -gal).

В предпочтительном воплощении вектор будет разработан для получения рассматриваемых полипептидов ActRIIB в клетках CHO, как вектор Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), векторы pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) и векторы pCI-neo (Promega, Madison, Wis). Очевидно, что обсуждаемые генные конструкции можно применять для экспрессии обсуждаемых полипептидов ActRII в культивируемых клетках, например, для продуцирования белков, включая слитые белки или варианты белков, для очистки.

Данное описание также охватывает клетки-хозяева, трансфицированные рекомбинантным геном, включающим кодирующую последовательность одного или более чем одного обсуждаемого полипептида ActRIIB. Клетки-хозяева могут представлять собой любые прокариотические или эукариотические клетки. Например, полипептид ActRIIB по изобретению можно экспрессировать в бактериальных клетках, таких как *E. coli*, клетках насекомых (например, с использованием системы экспрессии на основе бакуловируса), дрожжей или клетках млекопитающих [например, линии клеток яичников китайского хомячка (CHO)]. Специалистам в области техники известны другие подходящие клетки-хозяева.

Соответственно, данное описание также охватывает способы получения обсуждаемых полипептидов ActRIIB. Например, клетку-хозяина, трансфицированную экспрессирующим вектором, кодирующим полипептид ActRIIB, можно культивировать в соответствующих условиях, обеспечивающих экспрессию полипептида ActRIIB. Полипептид может секретироваться и быть выделен из смеси клеток и среды, содержащей полипептид. В альтернативном варианте полипептид ActRIIB может остаться в цитоплазме или в мембранной фракции, а клетки можно собирать, лизировать и выделять белок. Культура клеток включает клетки-хозяева, среду и другие побочные продукты. Подходящие среды для культивирования клеток хорошо известны в области техники. Обсуждаемые полипептиды можно выделять из культуральной жидкости, клеток-хозяев или тех и других способами, известными в области техники для очистки белков, включая ионообменную хроматографию, гель-фильтрацию, ультрафильтрацию, электрофорез, иммуноаффинную очистку с использованием антител, специфических к конкретным эпитопам полипептидов ActRIIB и аффинную очистку с использованием агента, связывающегося с доменом, слитым с полипептидом ActRIIB (например, для очистки слитого белка ActRIIB-Fc можно использовать колонку с белком А). В некоторых воплощениях полипептид ActRIIB представляет собой слитый белок, содержащий домен, облегчающий его очистку.

В некоторых воплощениях очистка достигается благодаря серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующего, в любой последовательности: хроматографию с белком А, хроматографию на Q-сефарозе, хроматографию на фенилсефарозе, эксклюзионную хроматографию и катионообменную хроматографию. Очистка может завершаться фильтрацией вирусов и заменой буфера. Белок ActRIIB может быть очищен до степени чистоты более 90%, более 95%, более 96%, более 98% или более 99% по результатам эксклюзионной хроматографии и более 90%, более 95%, более 96%, более 98% или более 99% по результатам SDS PAGE. Целевой уровень чистоты должен быть достаточным для достижения желаемых результатов в системах млекопитающих, в частности, приматов, не являющихся человеком, грызунов (мышей) и людей.

В другом воплощении слитый ген, кодирующий лидерную последовательность для очистки, такую как последовательность поли-(His)/сайт расщепления энтерокиназой на N-конце желаемой части рекомбинантного полипептида ActRIIB, может позволять очищать экспрессированный слитый белок посредством аффинной хроматографии с использованием смолы с ионами Ni^{2+} . Затем лидерную последовательность для очистки можно удалить путем обработки энтерокиназой для получения очищенного полипептида ActRIIB; см., например, Hochuli et al. (1987) *J. Chromatography* 411:177; и Janknecht et al. (1991) *PNAS USA* 88:8972.

Способы создания слитых генов хорошо известны. По существу, объединение различных фрагментов ДНК, кодирующих различные полипептидные последовательности, осуществляют согласно стандартным способам, используя для лигирования тупые или липкие концы, расщепление рестрикционными

ферментами для получения надлежащих концов, надлежащую стыковку липких концов, обработку щелочной фосфатазой во избежание нежелательного соединения и ферментативное лигирование. В другом воплощении слитый ген может быть синтезирован стандартными способами, включая автоматизированные ДНК-синтезаторы. В альтернативном варианте можно амплифицировать фрагменты гена при помощи PCR с использованием различных якорных праймеров, которые дают начало комплементарным перекрывающимся участкам двух следующих друг за другом фрагментов генов, которые затем можно гибридизовать с образованием последовательности химерного гена; см., например, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al, John Wiley & Sons: 1992.

В. Антагонисты антител.

В некоторых аспектах антагонист ActRIIB для применения согласно способам и применениям, описанным в данном документе, представляет собой антитело (антитело антагонист ActRIIB) или комбинацию антител. Антитело антагонист ActRIIB или комбинация антител может связываться, например, с одним или более чем одним ActRIIB-связывающимся лигандом (например, активин, GDF11, GDF8, GDF3, BMP10 и BMP6), рецептором ActRIIB, рецептором I типа (например, ALK4, ALK5 и/или ALK7) и/или ко-рецептором ActRIIB. Как описано в данном документе, антитела антагонисты ActRIIB можно применять в отдельности или в комбинации с одной или более чем одной дополнительной поддерживающей терапией или другим активным агентом для лечения миелофиброза, в частности, лечения или предупреждения одного или более чем одного осложнения миелофиброза (например, спленомегалии, экстрамедуллярного гемопоэза, анемии и фиброза) и/или лечения пациента, получавшего лечение ингибитором Янус-киназы.

В некоторых аспектах антитело антагонист ActRIIB или комбинация антител представляет собой антитело, ингибирующее по меньшей мере активин (например, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин ВС, активин АЕ и/или активин ВЕ). Таким образом, в некоторых воплощениях антитело антагонист ActRIIB или комбинация антител по описанию связываются по меньшей мере с активин. В данном описании "антитело к активину" обычно относится к антителу, которое связывается с активин с достаточной аффинностью, так что антитело может применяться в качестве диагностического и/или терапевтического агента, мишенью которого является активин. В некоторых воплощениях степень связывания антитела к активину с посторонним белком, не являющимся активин, менее чем приблизительно 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или менее чем приблизительно 1% от связывания антитела с активин по результатам, например, радиоиммунологического определения (RIA), Вiascore или другого исследования взаимодействия белков или аффинности связывания. В некоторых воплощениях антитело к активину связывается с эпитопом активина, который является консервативным для активин различных биологических видов. В некоторых предпочтительных воплощениях антитело к активину связывается с человеческим активин. В некоторых воплощениях антитело к активину может ингибировать связывание активина с рецепторами I и II типов (например, ActRIIB, ALK4, ALK5 и/или ALK7) и таким образом ингибировать опосредованную активин передачу сигнала (например, сигнальный путь Smad). В некоторых воплощениях антитело к активину может ингибировать связывание активина с ко-рецептором ActRIIB и таким образом ингибировать опосредованную активин передачу сигнала (например, сигнальный путь Smad). Следует отметить, что активин А имеет последовательность гомологичную активину В и поэтому антитела, которые связываются с активин А, могут также связываться с активин В и/или ингибировать активин В, что также относится к антителам к активину В. В некоторых воплощениях изобретение относится к мультиспецифическому антителу (например, биспецифическому антителу), которое связывается с активин и дополнительно связывается, например, с одним или более чем одним дополнительным лигандом ActRIIB [например, GDF11, GDF8, GDF3, BMP10 и BMP6], одним или более чем одним рецептором I типа и/или рецептором II типа (например, ActRIIB, ALK4, ALK5 и/или ALK7) и/или одним или более чем одним ко-рецептором, а также к его применениям. В некоторых воплощениях мультиспецифическое антитело, которое связывается с активин, не связывается или по существу не связывается с BMP9 (например, связывается с BMP9 с K_D превышающей 1×10^{-7} М или обладает относительно умеренным связыванием, например, приблизительно 1×10^{-8} М или приблизительно 1×10^{-9} М). В некоторых воплощениях мультиспецифическое антитело, которое связывается с активин, не связывается или по существу не связывается с активин А (например, связывается с активин А с K_D превышающей 1×10^{-7} М или обладает относительно умеренным связыванием, например, приблизительно 1×10^{-8} М или приблизительно 1×10^{-9} М). В некоторых воплощениях изобретение относится к комбинациям антител, где комбинация антител включает антитело к активину и одно или более чем одно дополнительное антитело, которое связывается, например, с одним или более чем одним дополнительным лигандом суперсемейства ActRIIB [например, GDF8, GDF11, GDF3 и BMP6], одним или более чем одним рецептором I типа и/или рецептором II типа (например, ActRIIB, ALK4, ALK5 и/или ALK7) и/или одним или более чем одним ко-рецептором, а также к их применениям. В некоторых воплощениях комбинация антител, которая включает антитело к активину, не включает антитело к BMP9. В некоторых воплощениях комбинация антител, которая включает антитело к активину, не включает антитело к активину А.

В некоторых аспектах антитело антагонист или комбинация антител представляет собой антитело, которое ингибирует по меньшей мере активин В. Так, в некоторых воплощениях антитело антагонист ActRIIB или комбинация антител связывается по меньшей мере с активином В. В данном описании антитело к активину В обычно относится к антителу, которое связывается с активином В с достаточной аффинностью, так что антитело может применяться в качестве диагностического и/или терапевтического агента, мишенью которого является активин В. В некоторых воплощениях степень связывания антитела к активину В с посторонним белком, не являющимся активином В, составляет менее чем приблизительно 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или менее чем приблизительно 1% от связывания антитела с активином В по результатам, например, радиоиммунологического определения (RIA), *Viacore* или другого исследования взаимодействия белков или аффинности связывания. В некоторых воплощениях антитело к активину В связывается с эпитопом активина В, который является консервативным для активинов В различных биологических видов. В некоторых предпочтительных воплощениях антитело к активину В может ингибировать связывание активина В с рецепторами I и II типов (например, ActRIIB, ALK4, ALK5 и/или ALK7) и таким образом ингибировать опосредованную активином В передачу сигнала (например, сигнальный путь Smad). В некоторых воплощениях антитело к активину В может ингибировать связывание активина В с ко-рецептором ActRIIB и таким образом ингибировать опосредованную активином В передачу сигнала (например, сигнальный путь Smad). Следует отметить, что активин В имеет последовательность гомологичную активину А и поэтому антитела, которые связываются с активином В, могут также связываться с активином А и/или ингибировать активин А. В некоторых воплощениях изобретение относится к мультиспецифическому антителу (например, биспецифическому антителу), которое связывается с активином В и дополнительно связывается, например, с одним или более чем одним дополнительным лигандом ActRIIB [например, GDF11, GDF8, GDF3, BMP10 и BMP6], одним или более чем одним рецептором I типа и/или рецептором II типа (например, ActRIIB, ALK4, ALK5 и/или ALK7) и/или одним или более чем одним ко-рецептором, а также к его применениям. В некоторых воплощениях мультиспецифическое антитело, которое связывается с активином В, не связывается или по существу не связывается с BMP9 (например, связывается с BMP9 с K_D превышающей 1×10^{-7} М или обладает относительно умеренным связыванием, например, приблизительно 1×10^{-8} М или приблизительно 1×10^{-9} М). В некоторых воплощениях мультиспецифическое антитело, которое связывается с активином В, не связывается или по существу не связывается с активином А (например, связывается с активином А с K_D превышающей 1×10^{-7} М или обладает относительно умеренным связыванием, например, приблизительно 1×10^{-8} М или приблизительно 1×10^{-9} М). В некоторых воплощениях изобретение относится к комбинациям антител, где комбинация антител включает антитело к активину В и одно или более чем одно дополнительное антитело, которое связывается, например, с одним или более чем одним дополнительным лигандом ActRIIB [например, GDF8, GDF11, GDF3, BMP6 и BMP10], одним или более чем одним рецептором I типа и/или рецептором II типа (например, ActRIIB, ALK4, ALK5 и/или ALK7) и/или одним или более чем одним ко-рецептором, а также к их применениям. В некоторых воплощениях комбинация антител, которая включает антитело к активину В, не включает антитело к BMP9. В некоторых воплощениях комбинация антител, которая включает антитело к активину В, не включает антитело к активину А.

В некоторых аспектах антитело антагонист ActRIIB или комбинация антител представляет собой антитело, ингибирующее по меньшей мере GDF8. Таким образом, в некоторых воплощениях антитело антагонист ActRIIB или комбинация антител связываются по меньшей мере с GDF8. В данном описании "антитело к GDF8" обычно относится к антителу, которое связывается с GDF8 с достаточной аффинностью, так что антитело может применяться в качестве диагностического и/или терапевтического агента, мишенью которого является GDF8. В некоторых воплощениях степень связывания антитела к GDF8 с посторонним белком, не являющимся GDF8, составляет менее чем приблизительно 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или менее чем приблизительно 1% от связывания антитела с GDF8 по результатам, например, радиоиммунологического определения (RIA), *Viacore* или другого исследования взаимодействия белков или аффинности связывания. В некоторых воплощениях антитело к GDF8 связывается с эпитопом GDF8, который является консервативным для GDF8 различных биологических видов. В некоторых предпочтительных воплощениях антитело к GDF8 связывается с человеческим GDF8. В некоторых воплощениях антитело к GDF8 может ингибировать связывание GDF8 с рецепторами I и II типов (например, ActRIIB, ALK4, ALK5 и/или ALK7) и таким образом ингибировать опосредованную GDF8 передачу сигнала (например, сигнальный путь Smad). В некоторых воплощениях антитело к GDF8 может ингибировать связывание GDF8 с ко-рецепторами и таким образом ингибировать опосредованную GDF8 передачу сигнала (например, сигнальный путь Smad). Следует отметить, что GDF8 имеет последовательность гомологичную GDF11 и поэтому антитела, которые связываются с GDF8, в некоторых случаях могут также связываться с GDF11 и/или ингибировать GDF11. В некоторых воплощениях изобретение относится к мультиспецифическому антителу (например, биспецифическому антителу), которое связывается с GDF8 и дополнительно связывается, например, с одним или более чем одним дополнительным лигандом ActRIIB [например, активином (например, активином А, активином В, активином С, активином Е, активином АВ, активином АС, активином ВС, активином АЕ, активином ВЕ), GDF11, GDF3, BMP10 и

BMP6], одним или более чем одним рецептором I типа и/или рецептором II типа (например, ActRIIB, ALK4, ALK5 и/или ALK7) и/или одним или более чем одним ко-рецептором, а также к его применениям. В некоторых воплощениях мультиспецифическое антитело, которое связывается с GDF8, не связывается или по существу не связывается с BMP9 (например, связывается с BMP9 с K_D превышающей 1×10^{-7} М или обладает относительно умеренным связыванием, например, приблизительно 1×10^{-8} М или приблизительно 1×10^{-9} М). В некоторых воплощениях мультиспецифическое антитело, которое связывается с GDF8, не связывается или по существу не связывается с активинном А (например, связывается с активинном А с K_D превышающей 1×10^{-7} М или обладает относительно умеренным связыванием, например, приблизительно 1×10^{-8} М или приблизительно 1×10^{-9} М). В некоторых воплощениях изобретение относится к комбинациям антител, где комбинация антител включает антитело к GDF8 и одно или более чем одно дополнительное антитело, которое связывается, например, с одним или более чем одним дополнительным лигандом ActRIIB [например, активинном (например, активинном А, активинном В, активинном С, активинном Е, активинном АВ, активинном АС, активинном ВС, активинном АЕ, активинном ВЕ), GDF11, GDF3, BMP6, BMP10 и BMP15], одним или более чем одним рецептором I типа и/или рецептором II типа (например, ActRIIB, ALK4, ALK5 и/или ALK7) и/или одним или более чем одним ко-рецептором, а также к их применениям. В некоторых воплощениях комбинация антител, которая включает антитело к GDF8, не включает антитело к BMP9. В некоторых воплощениях комбинация антител, которая включает антитело к GDF8, не включает антитело к активину А.

В некоторых аспектах антитело антагонист ActRIIB или комбинация антител представляет собой антитело, ингибирующее по меньшей мере GDF11. Таким образом, в некоторых воплощениях антитело антагонист ActRIIB или комбинация антител связываются по меньшей мере с GDF11. В данном описании "антитело к GDF11" обычно относится к антителу, которое связывается с GDF11 с достаточной аффинностью, так что антитело может применяться в качестве диагностического и/или терапевтического агента, мишенью которого является GDF11. В некоторых воплощениях степень связывания антитела к GDF11 с посторонним белком, не являющимся GDF11, составляет менее чем приблизительно 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или менее чем приблизительно 1% от связывания антитела с GDF11 по результатам, например, радиоиммунологического определения (RIA), Вiasore или другого исследования взаимодействия белков или аффинности связывания. В некоторых воплощениях антитело к GDF11 связывается с эпитопом GDF11, который является консервативным для GDF11 различных биологических видов. В некоторых предпочтительных воплощениях антитело к GDF11 связывается с человеческим GDF11. В некоторых воплощениях антитело к GDF11 может ингибировать связывание GDF11 с рецепторами I и/или II типов (например, ActRIIB, ALK4, ALK5 и/или ALK7) и таким образом ингибировать опосредованную GDF11 передачу сигнала (например, сигнальный путь Smad). В некоторых воплощениях антитело к GDF11 может ингибировать связывание GDF11 с ко-рецепторами и таким образом ингибировать опосредованную GDF11 передачу сигнала (например, сигнальный путь Smad). Следует отметить, что GDF11 имеет последовательность гомологичную GDF8 и поэтому антитела, которые связываются с GDF11, в некоторых случаях могут также связываться с GDF8 и/или ингибировать GDF8. В некоторых воплощениях изобретение относится к мультиспецифическому антителу (например, биспецифическому антителу), которое связывается с GDF11 и дополнительно связывается, например, с одним или более чем одним дополнительным лигандом ActRIIB [например, активинном (например, активинном А, активинном В, активинном С, активинном Е, активинном АВ, активинном АС, активинном ВС, активинном АЕ, активинном ВЕ), GDF8, GDF3, BMP10 и BMP6], одним или более чем одним рецептором I типа и/или рецептором II типа (например, ActRIIB, ALK4, ALK5 и/или ALK7) и/или одним или более чем одним ко-рецептором, а также к его применениям. В некоторых воплощениях мультиспецифическое антитело, которое связывается с GDF11, не связывается или по существу не связывается с BMP9 (например, связывается с BMP9 с K_D превышающей 1×10^{-7} М или обладает относительно умеренным связыванием, например, приблизительно 1×10^{-8} М или приблизительно 1×10^{-9} М). В некоторых воплощениях мультиспецифическое антитело, которое связывается с GDF11, не связывается или по существу не связывается с активинном А (например, связывается с активинном А с K_D превышающей 1×10^{-7} М или обладает относительно умеренным связыванием, например, приблизительно 1×10^{-8} М или приблизительно 1×10^{-9} М). В некоторых воплощениях изобретение относится к комбинациям антител, где комбинация антител включает антитело к GDF11 и одно или более чем одно дополнительное антитело, которое связывается, например, с одним или более чем одним дополнительным лигандом ActRIIB [например, активинном (например, активинном А, активинном В, активинном С, активинном Е, активинном АВ, активинном АС, активинном ВС, активинном АЕ, активинном ВЕ), GDF8, GDF3, BMP6 и BMP10], одним или более чем одним рецептором I типа и/или рецептором II типа (например, ActRIIB, ALK4, ALK5 и/или ALK7) и/или одним или более чем одним ко-рецептором, а также к их применениям. В некоторых воплощениях комбинация антител, которая включает антитело к GDF11, не включает антитело к BMP9. В некоторых воплощениях комбинация антител, которая включает антитело к GDF11, не включает антитело к активину А.

В некоторых аспектах антитело антагонист ActRIIB или комбинация антител представляет собой антитело, ингибирующее по меньшей мере BMP6. Таким образом, в некоторых воплощениях антитело

антагонист ActRIIB или комбинация антител связываются по меньшей мере с BMP6. В данном описании "антитело к BMP6" обычно относится к антителу, которое связывается с BMP6 с достаточной аффинностью, так что антитело может применяться в качестве диагностического и/или терапевтического агента, мишенью которого является BMP6. В некоторых воплощениях степень связывания антитела к BMP6 с посторонним белком, не являющимся BMP6, составляет менее чем приблизительно 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или менее чем приблизительно 1% от связывания антитела с GDF11 по результатам, например, радиоиммунологического определения (RIA), *Viacore* или другого исследования взаимодействия белков или аффинности связывания. В некоторых воплощениях антитело к BMP6 связывается с эпитопом BMP6, который является консервативным для BMP6 различных биологических видов. В некоторых предпочтительных воплощениях антитело к BMP6 связывается с человеческим BMP6. В некоторых воплощениях антитело к BMP6 может ингибировать связывание BMP6 с рецепторами I и/или II типов (например, ActRIIB, ALK4, ALK5 и/или ALK7) и таким образом ингибировать опосредованную BMP6 передачу сигнала (например, сигнальный путь Smad). В некоторых воплощениях антитело к BMP6 может ингибировать связывание BMP6 с ко-рецепторами и таким образом ингибировать опосредованную BMP6 передачу сигнала (например, сигнальный путь Smad). В некоторых воплощениях изобретение относится к мультиспецифическому антителу (например, биспецифическому антителу), которое связывается с BMP6 и дополнительно связывается, например, с одним или более чем одним дополнительным лигандом ActRIIB [например, активином (например, активином А, активином В, активином С, активином Е, активином АВ, активином АС, активином ВС, активином АЕ, активином ВЕ), GDF8, GDF3, BMP10 и GDF11], одним или более чем одним рецептором I типа и/или рецептором II типа (например, ActRIIB, ALK4, ALK5 и/или ALK7) и/или одним или более чем одним ко-рецептором, а также к его применениям. В некоторых воплощениях мультиспецифическое антитело, которое связывается с BMP6, не связывается или по существу не связывается с BMP9 (например, связывается с BMP9 с K_D превышающей 1×10^{-7} М или обладает относительно умеренным связыванием, например, приблизительно 1×10^{-8} М или приблизительно 1×10^{-9} М). В некоторых воплощениях мультиспецифическое антитело, которое связывается с BMP6, не связывается или по существу не связывается с активином А (например, связывается с активином А с K_D превышающей 1×10^{-7} М или обладает относительно умеренным связыванием, например, приблизительно 1×10^{-8} М или приблизительно 1×10^{-9} М). В некоторых воплощениях изобретение относится к комбинациям антител, где комбинация антител включает антитело к BMP6 и одно или более чем одно дополнительное антитело, которое связывается, например, с одним или более чем одним дополнительным лигандом ActRIIB [например, активином (например, активином А, активином В, активином С, активином Е, активином АВ, активином АС, активином ВС, активином АЕ, активином ВЕ), GDF8, GDF11, GDF3 и BMP10], одним или более чем одним рецептором I типа и/или рецептором II типа (например, ActRIIB, ALK4, ALK5 и/или ALK7) и/или одним или более чем одним ко-рецептором, а также к их применениям. В некоторых воплощениях комбинация антител, которая включает антитело к BMP6, не включает антитело к BMP9. В некоторых воплощениях комбинация антител, которая включает антитело к BMP6, не включает антитело к активину А.

В некоторых аспектах антитело антагонист ActRIIB или комбинация антител представляет собой антитело, ингибирующее по меньшей мере GDF3. Таким образом, в некоторых воплощениях антитело антагонист ActRIIB или комбинация антител связываются по меньшей мере с GDF3. В данном описании "антитело к GDF3" обычно относится к антителу, которое связывается с GDF3 с достаточной аффинностью, так что антитело может применяться в качестве диагностического и/или терапевтического агента, мишенью которого является GDF3. В некоторых воплощениях степень связывания антитела к GDF3 с посторонним белком, не являющимся GDF3, составляет менее чем приблизительно 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или менее чем приблизительно 1% от связывания антитела с GDF11 по результатам, например, радиоиммунологического определения (RIA), *Viacore* или другого исследования взаимодействия белков или аффинности связывания. В некоторых воплощениях антитело к GDF3 связывается с эпитопом GDF3, который является консервативным для GDF3 различных биологических видов. В некоторых предпочтительных воплощениях антитело к GDF3 связывается с человеческим GDF3. В некоторых воплощениях антитело к GDF3 может ингибировать связывание GDF3 с рецепторами I и II типов (например, ActRIIB, ALK4, ALK5 и/или ALK7) и таким образом ингибировать опосредованную GDF3 передачу сигнала (например, сигнальный путь Smad). В некоторых воплощениях антитело к GDF3 может ингибировать связывание GDF3 с ко-рецепторами и таким образом ингибировать опосредованную GDF3 передачу сигнала (например, сигнальный путь Smad). В некоторых воплощениях изобретение относится к мультиспецифическому антителу (например, биспецифическому антителу), которое связывается с GDF3 и дополнительно связывается, например, с одним или более чем одним дополнительным лигандом ActRIIB [например, активином (например, активином А, активином В, активином С, активином Е, активином АВ, активином АС, активином ВС, активином АЕ, активином ВЕ), GDF8, BMP6, BMP10 и GDF11], одним или более чем одним рецептором I типа и/или рецептором II типа (например, ActRIIB, ALK4, ALK5 и/или ALK7) и/или одним или более чем одним ко-рецептором, а также к его применениям. В некоторых воплощениях мультиспецифическое антитело, которое связывается с GDF3, не связывается

или по существу не связывается с BMP9 (например, связывается с BMP9 с K_D превышающей 1×10^{-7} М или обладает относительно умеренным связыванием, например, приблизительно 1×10^{-8} М или приблизительно 1×10^{-9} М). В некоторых воплощениях мультиспецифическое антитело, которое связывается с GDF3, не связывается или по существу не связывается с активинном А (например, связывается с активинном А с K_D превышающей 1×10^{-7} М или обладает относительно умеренным связыванием, например, приблизительно 1×10^{-8} М или приблизительно 1×10^{-9} М). В некоторых воплощениях изобретение относится к комбинациям антител, где комбинация антител включает антитело к GDF3 и одно или более чем одно дополнительное антитело, которое связывается, например, с одним или более чем одним дополнительным лигандом ActRIIB [например, активинном (например, активинном А, активинном В, активинном С, активинном Е, активинном АВ, активинном АС, активинном ВС, активинном АЕ, активинном ВЕ), GDF8, GDF11, BMP6 и BMP10], одним или более чем одним рецептором I типа и/или рецептором II типа (например, ActRIIB, ALK4, ALK5 и/или ALK7) и/или одним или более чем одним ко-рецептором, а также к их применениям. В некоторых воплощениях комбинация антител, которая включает антитело к GDF3, не включает антитело к BMP9. В некоторых воплощениях комбинация антител, которая включает антитело к GDF3, не включает антитело к активину А.

В некоторых аспектах антитело антагонист ActRIIB или комбинация антител представляет собой антитело, ингибирующее по меньшей мере BMP10. Таким образом, в некоторых воплощениях антитело антагонист ActRIIB или комбинация антител связываются по меньшей мере с BMP10. В данном описании "антитело к BMP10" обычно относится к антителу, которое связывается с BMP10 с достаточной аффинностью, так что антитело может применяться в качестве диагностического и/или терапевтического агента, мишенью которого является BMP10. В некоторых воплощениях степень связывания антитела к BMP10 с посторонним белком, не являющимся BMP10, составляет менее чем приблизительно 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или менее чем приблизительно 1% от связывания антитела с BMP10 по результатам, например, радиоиммунологического определения (RIA), Вiascore или другого исследования взаимодействия белков или аффинности связывания. В некоторых воплощениях антитело к BMP10 связывается с эпитопом BMP10, который является консервативным для BMP10 различных биологических видов. В некоторых предпочтительных воплощениях антитело к BMP10 связывается с человеческим BMP10. В некоторых воплощениях антитело к BMP10 может ингибировать связывание BMP10 с рецепторами I и II типов (например, ActRIIB, ALK4, ALK5 и/или ALK7) и таким образом ингибировать опосредованную BMP10 передачу сигнала (например, сигнальный путь Smad). В некоторых воплощениях антитело к BMP10 может ингибировать связывание BMP10 с ко-рецепторами и таким образом ингибировать опосредованную BMP10 передачу сигнала (например, сигнальный путь Smad). В некоторых воплощениях изобретение относится к мультиспецифическому антителу (например, биспецифическому антителу), которое связывается с BMP10 и дополнительно связывается, например, с одним или более чем одним дополнительным лигандом ActRIIB [например, активинном (например, активинном А, активинном В, активинном С, активинном Е, активинном АВ, активинном АС, активинном ВС, активинном АЕ, активинном ВЕ), GDF8, GDF11, GDF3 и BMP6], одним или более чем одним рецептором I типа и/или рецептором II типа (например, ActRIIB, ALK4, ALK5 и/или ALK7) и/или одним или более чем одним ко-рецептором, а также к его применениям. В некоторых воплощениях мультиспецифическое антитело, которое связывается с BMP10, не связывается или по существу не связывается с BMP9 (например, связывается с BMP9 с K_D превышающей 1×10^{-7} М или обладает относительно умеренным связыванием, например, приблизительно 1×10^{-8} М или приблизительно 1×10^{-9} М). В некоторых воплощениях мультиспецифическое антитело, которое связывается с BMP10, не связывается или по существу не связывается с активинном А (например, связывается с активинном А с K_D превышающей 1×10^{-7} М или обладает относительно умеренным связыванием, например, приблизительно 1×10^{-8} М или приблизительно 1×10^{-9} М). В некоторых воплощениях изобретение относится к комбинациям антител, где комбинация антител включает антитело к BMP10 и одно или более чем одно дополнительное антитело, которое связывается, например, с одним или более чем одним дополнительным лигандом ActRIIB [например, активинном (например, активинном А, активинном В, активинном С, активинном Е, активинном АВ, активинном АС, активинном ВС, активинном АЕ, активинном ВЕ), GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP10 и GDF11], одним или более чем одним рецептором I типа и/или рецептором II типа (например, ActRIIB, ALK4, ALK5 и/или ALK7) и/или одним или более чем одним ко-рецептором, а также к их применениям. В некоторых воплощениях комбинация антител, которая включает антитело к BMP10, не включает антитело к BMP9. В некоторых воплощениях комбинация антител, которая включает антитело к BMP10, не включает антитело к активину А.

В некоторых аспектах антитело антагонист ActRIIB или комбинация антител представляет собой антитело, ингибирующее по меньшей мере ActRIIB. Таким образом, в некоторых воплощениях антитело антагонист ActRIIB или комбинация антител связываются по меньшей мере с ActRIIB. В данном описании "антитело к ActRIIB" обычно относится к антителу, которое связывается с ActRIIB с достаточной аффинностью, так что антитело может применяться в качестве диагностического и/или терапевтического агента, мишенью которого является ActRIIB. В некоторых воплощениях степень связывания антитела к ActRIIB с посторонним белком, не являющимся ActRIIB, менее чем приблизительно 10%, 9%, 8%,

7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или менее чем приблизительно 1% от связывания антитела с ActRIIB по результатам, например, радиоиммунологического определения (RIA), Вiasоге или другого исследования взаимодействия белков или аффинности связывания. В некоторых воплощениях антитело к ActRIIB связывается с эпитопом ActRIIB, который является консервативным для ActRIIB различных биологических видов. В некоторых предпочтительных воплощениях антитело к ActRIIB связывается с человеческим ActRIIB. В некоторых воплощениях антитело к ActRIIB может ингибировать связывание ActRIIB с одним или более чем одним лигандом ActRIIB [например, GDF8, активином (например, активином А, активином В, активином С, активином Е, активином АВ, активином АС, активином ВС, активином АЕ и активином ВЕ), GDF11, BMP6, GDF3 и BMP10]. В некоторых воплощениях антитело к ActRIIB представляет собой мультиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело), которое связывается с ActRIIB и с одним или более чем одним лигандом ActRIIB [например, GDF11, GDF8, активином (например, активином А, активином В, активином С, активином Е, активином АВ, активином АС), GDF3, BMP6 и BMP10], рецептором I типа (например, ALK4, ALK5 и/или ALK7), ко-рецептором и/или дополнительным рецептором II типа (например, ActRIIA). В некоторых воплощениях изобретение относится к комбинациям антител, где комбинация антител включает антитело к ActRIIB и одно или более чем одно дополнительное антитело, которое связывается, например, с одним или более чем одним лигандом ActRIIB [например, GDF11, GDF8, активином (например, активином А, активином В, активином С, активином Е, активином АВ, активином АС, активином ВС, активином АЕ, активином ВЕ), BMP6, GDF3 и BMP10], ко-рецептором, рецептором I типа (например, ALK4, ALK5 и/или ALK7) и/или дополнительным рецептором II типа (например, ActRIIA), а также к их применениям. Следует отметить, что ActRIIB имеет сходство последовательности с ActRIIA и поэтому антитела, которые связываются с ActRIIB, в некоторых случаях могут также связываться с GDF8 и/или ингибировать ActRIIA.

В некоторых аспектах антитело антагонист ActRIIB или комбинация антител представляет собой антитело, ингибирующее по меньшей мере ALK4. Таким образом, в некоторых воплощениях антитело антагонист ActRIIB или комбинация антител связываются по меньшей мере с ALK4. В данном описании "антитело к ALK4" обычно относится к антителу, которое связывается с ALK4 с достаточной аффинностью, так что антитело может применяться в качестве диагностического и/или терапевтического агента, мишенью которого является ALK4. В некоторых воплощениях степень связывания антитела к ALK4 с посторонним белком, не являющимся ALK4, составляет менее чем приблизительно 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или менее чем приблизительно 1% от связывания антитела с ALK4 по результатам, например, радиоиммунологического определения (RIA), Вiasоге или другого исследования взаимодействия белков или аффинности связывания. В некоторых воплощениях антитело к ALK4 связывается с эпитопом ALK4, который является консервативным для ALK4 различных биологических видов. В некоторых предпочтительных воплощениях антитело к ALK4 связывается с человеческим ALK4. В некоторых воплощениях антитело к ALK4 может ингибировать связывание ALK4 с одним или более чем одним лигандом ActRIIB [например, GDF8, активином (например, активином А, активином В, активином С, активином Е, активином АВ, активином АС), GDF3, BMP6 и BMP10], рецептором II типа (например, ActRIIB), ко-рецептором и/или дополнительным рецептором I типа (например, ALK5 и/или ALK7). В некоторых воплощениях изобретение относится к комбинациям антител, где комбинация антител включает антитело к ALK4 и одно или более чем одно дополнительное антитело, которое связывается, например, с одним или более чем одним лигандом ActRIIB [например, GDF11, GDF8, активином (например, активином А, активином В, активином С, активином Е, активином АВ, активином АС, активином ВС, активином АЕ и активином ВЕ), BMP6 и BMP10], ко-рецептором, рецептором II типа (например, ActRIIB) и/или дополнительным рецептором I типа (например, ALK5 и/или ALK7), а также к их применениям.

В некоторых аспектах антитело антагонист ActRIIB или комбинация антител представляет собой антитело, ингибирующее по меньшей мере ALK5. Таким образом, в некоторых воплощениях антитело антагонист ActRIIB или комбинация антител связываются по меньшей мере с ALK5. В данном описании "антитело к ALK5" обычно относится к антителу, которое связывается с ALK5 с достаточной аффинностью, так что антитело может применяться в качестве диагностического и/или терапевтического агента, мишенью которого является ALK5. В некоторых воплощениях степень связывания антитела к ALK5 с посторонним белком, не являющимся ALK5, составляет менее чем приблизительно 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или менее чем приблизительно 1% от связывания антитела с ALK5 по результатам, например, радиоиммунологического определения (RIA), Вiasоге или другого исследования взаимодействия белков или аффинности связывания. В некоторых воплощениях антитело к ALK5 связывается с эпитопом ALK5, который является консервативным для ALK5 различных биологических видов. В некоторых предпочтительных воплощениях антитело к ALK5 связывается с человеческим ALK5. В некоторых воплощениях антитело к ALK5 может ингибировать связывание ALK5 с одним или более чем одним ли-

гандом ActRIIB [например, GDF8, активинном (например, активинном А, активинном В, активинном С, активинном Е, активинном АВ, активинном АС, активинном ВС, активинном АЕ и активинном ВЕ), GDF11, BMP6, GDF3 и BMP10]. В некоторых воплощениях антитело к ALK5 представляет собой мультиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело), которое связывается с ALK5 и с одним или более чем одним лигандом ActRIIB [например, GDF11, GDF8, активинном (например, активинном А, активинном В, активинном С, активинном Е, активинном АВ, активинном АС), GDF3, BMP6 и BMP10], рецептором II типа (например, ActRIIB), ко-рецептором и/или дополнительным рецептором I типа (например, ALK4 и/или ALK7). В некоторых воплощениях изобретение относится к комбинациям антител, где комбинация антител включает антитело к ALK5 и одно или более чем одно дополнительное антитело, которое связывается, например, с одним или более чем одним лигандом ActRIIB [например, GDF11, GDF8, активинном (например, активинном А, активинном В, активинном С, активинном Е, активинном АВ, активинном АС, активинном ВС, активинном АЕ и активинном ВЕ), BMP6 и BMP10], ко-рецептором, рецептором II типа (например, ActRIIB) и/или дополнительным рецептором I типа (например, ALK4 и/или ALK7), а также к их применениям.

В некоторых аспектах антитело антагонист ActRIIB или комбинация антител представляет собой антитело, ингибирующее по меньшей мере ALK7. Таким образом, в некоторых воплощениях антитело антагонист ActRIIB или комбинация антител связываются по меньшей мере с ALK7. В данном описании "антитело к ALK7" обычно относится к антителу, которое связывается с ALK7 с достаточной аффинностью, так что антитело может применяться в качестве диагностического и/или терапевтического агента, мишенью которого является ALK7. В некоторых воплощениях степень связывания антитела к ALK7 с посторонним белком, не являющимся ALK7, составляет менее чем приблизительно 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или менее чем приблизительно 1% от связывания антитела с ALK7 по результатам, например, радиоиммунологического определения (RIA), Вiasoge или другого исследования взаимодействия белков или аффинности связывания. В некоторых воплощениях антитело к ALK7 связывается с эпитопом ALK7, который является консервативным для ALK7 различных биологических видов. В некоторых предпочтительных воплощениях антитело к ALK7 связывается с человеческим ALK7. В некоторых воплощениях антитело к ALK7 может ингибировать связывание ALK7 с одним или более чем одним лигандом ActRIIB [например, GDF8, активинном (например, активинном А, активинном В, активинном С, активинном Е, активинном АВ, активинном АС, активинном ВС, активинном АЕ и активинном ВЕ), GDF11, BMP6, GDF3 и BMP10]. В некоторых воплощениях антитело к ALK7 представляет собой мультиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело), которое связывается с ALK7 и с одним или более чем одним лигандом ActRIIB [например, GDF11, GDF8, активинном (например, активинном А, активинном В, активинном С, активинном Е, активинном АВ, активинном АС), GDF3, BMP6 и BMP10], рецептором II типа (например, ActRIIB), ко-рецептором и/или дополнительным рецептором I типа (например, ALK4 и/или ALK5). В некоторых воплощениях изобретение относится к комбинациям антител, где комбинация антител включает антитело к ALK7 и одно или более чем одно дополнительное антитело, которое связывается, например, с одним или более чем одним лигандом ActRIIB [например, GDF11, GDF8, активинном (например, активинном А, активинном В, активинном С, активинном Е, активинном АВ, активинном АС, активинном ВС, активинном АЕ и активинном ВЕ), BMP6 и BMP10], ко-рецептором, рецептором II типа (например, ActRIIB) и/или дополнительным рецептором I типа (например, ALK4 и/или ALK5), а также к их применениям.

Термин "антитело" в данном документе используется в самом широком смысле и охватывает различные структуры антител, включая моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они проявляют желаемую антигенсвязывающую активность, но не ограничиваясь ими. "Фрагмент антитела" относится к молекуле, отличной от интактного антитела, содержащей часть интактного антитела, которая связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, без ограничения, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, диатела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител (например, scFv) и мультиспецифические антитела, образованные фрагментами антител [см., например, Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134; Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); WO 93/16185; и патенты US 5571894; 5587458 и 5869046]. Диатела представляют собой фрагменты с двумя антигенсвязывающими сайтами, которые могут быть двухвалентными или биспецифическими [см., например, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134 (2003); и Hollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448]. Триатела и тетратела также описаны Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134. Однодоменные антитела и фрагменты антител, содержащие весь переменный домен тяжелой цепи антитела или его часть или весь переменный домен легкой цепи антитела или его часть. В некоторых воплощениях однодоменное антитело представляет собой человеческое однодоменное антитело [см., например, патент US 6248516]. Изложенные в данном документе антитела могут представлять собой поликлональные антитела или моноклональные антитела. В некоторых воплощениях антитела по данному изобретению содержат присоединенную к ним метку, которую можно выявить (например, метка может представлять собой радиоактивный изотоп, флуоресцентное соединение, фермент

или кофактор фермента). В некоторых предпочтительных воплощениях антитела по данному изобретению представляют собой выделенные антитела. В некоторых предпочтительных воплощениях антитела по данному изобретению представляют собой рекомбинантные антитела.

Антитела по данному изобретению могут относиться к любому классу. Класс антитела обозначает тип константного домена или константной области его тяжелой цепи. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут далее подразделяться на подклассы (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные домены тяжелой цепи, соответствующие различным классам иммуноглобулинов, обозначают альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю.

Как правило, антитело для применения в способах, раскрытых в данном описании, специфически связывается с его антигеном-мишенью, предпочтительно, с высокой аффинностью связывания. Аффинность может выражаться значением K_D и отражает внутреннюю аффинность связывания (например, с минимизацией авидности). Как правило, аффинность связывания определяют *in vitro*, как в бесклеточном, так и в исследовании с клетками. Для определения аффинности связывания можно использовать любое количество исследований, известных в области техники, включая описанные в данном документе, например, Вiasoge, исследование связывания меченного радиоуклидом антигена (RIA) и ELISA. В некоторых воплощениях антитела по данному описанию связываются со своими антигенами-мишенями (например, ALK4, ALK5, ALK7, ActRIIB, GDF3, активином, GDF11, GDF8, BMP10 и/или BMP6) с K_D по меньшей мере 1×10^{-7} или сильнее, 1×10^{-8} или сильнее, 1×10^{-9} или сильнее, 1×10^{-10} или сильнее, 1×10^{-11} или сильнее, 1×10^{-12} или сильнее, 1×10^{-13} или сильнее, или 1×10^{-14} или сильнее.

В некоторых воплощениях K_D определяют при помощи RIA, который выполняют с Fab версией антитела, представляющего интерес, и его антигеном-мишенью, как описано в следующем исследовании. Аффинность связывания Fab с антигеном в растворе определяют путем уравнивания Fab с минимальной концентрацией радиоактивно меченного антигена (например, меченного ¹²⁵I) в присутствии серийных разведений немеченного антигена, с последующим захватом связанного антигена антителом к Fab, адсорбированным на планшете [см., например, Chen et al. (1999) *J. Mol. Biol.* 293:865-881]. Эксперимент проводили в следующих условиях: на поверхности многоруночных планшетов (например, MICRO-TITER® компании Thermo Scientific) иммобилизовали (например, в течение ночи) захватывающее антитело к Fab (например, компании Cappel Labs) и затем блокировали бычьим сывороточным альбумином, предпочтительно при комнатной температуре (приблизительно 23°C). В неадсорбирующем планшете смешивали радиоактивно меченный антиген и серию разведений Fab, представляющего интерес [например, аналогично определению антитела к VEGF (Fab-12), описанному Presta et al, (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599]. Затем Fab, представляющий интерес, инкубировали, предпочтительно в течение ночи, однако инкубация могла продолжаться в течение более длительного времени (например, приблизительно 65 часов) для достижения равновесия. Затем смеси переносили в планшет для захвата и инкубировали предпочтительно при комнатной температуре приблизительно в течение одного часа. Затем раствор удаляли и промывали планшет несколько раз, предпочтительно смесью полисорбата 20 и PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор). После высыхания планшета добавляли сцинтилляционную жидкость (например, MICROSCINT® компании Packard) и подсчитывали импульсы с помощью гамма-счетчика (например, TOPCOUNT® компании Packard).

Согласно другому воплощению, K_D определяли методом поверхностного плазмонного резонанса, например, на биосенсоре BIACORE® 2000 или BIACORE® 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.) с иммобилизацией антигена на поверхности чипов CM5 до уровня приблизительно 10 единиц ответа (RU). Вкратце, биосенсорные чипы с поверхностью из карбоксиметилированного декстрана (CM5, BIACORE, Inc.) активировали при помощи N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) согласно инструкциям поставщика.

Например, антиген можно разводить 10 мМ ацетатом натрия, pH 4,8, до 5 мкг/мл (приблизительно 0,2 мкМ) перед инъектированием со скоростью 5 мкл/минуту для достижения связывания белка, вызывающего сдвиг на сенсограмме приблизительно 10 единиц ответа (RU). После инъектирования антигена для блокирования непрореагировавших групп осуществляют инъектирование 1М этаноламина. Для измерения кинетики двукратные разведения Fab (от 0,78 до 500 нМ) инъектировали в PBS с 0,05% поверхностно-активным веществом полисорбат 20 (TWEEN-20®) (PBST) при скорости тока приблизительно 25 мкл/мин. Скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) рассчитывают, например, с использованием простой модели связывания один-к-одному, предложенной Лэнгмюром (BIACORE® Evaluation Software version 3.2) Равновесную константу диссоциации (KD) рассчитывают как отношение k_{off} / k_{on} [см., например, Chen et al., (1999) *J. Mol. Biol.* 293:865-881]. Если скорость ассоциации превышает, например, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ при исследовании методом поверхностного плазмонного резонанса, как описано выше, скорость ассоциации можно определять методом тушения флуоресценции, позволяющим определять увеличение или уменьшение интенсивности испускаемой флуоресценции (например, возбуждение - 295 нм; эмиссия - 340 нм, полоса пропускания 16 нм) 20 нМ антитела к антигену (в форме Fab) в PBS в присутствии нарастающих концентраций антигена, измеряемой при помощи спектрофотометра, такого как спектрофотометр, снабженный приставкой для измерений методом остановленного потока (Aviv Instru-

ments) или спектрофотометр SLM-AMINCO® серии 8000 (ThermoSpectronic) с перемешиваемой кюветой.

Фрагменты антитела могут быть получены различными способами, включая, без ограничения, протеолитическое расщепление интактного антитела, а также продуцирование рекомбинантными клетками-хозяевами (например, *E. coli* или фагами), как описано в данном документе. Нуклеиновые кислоты и аминокислотные последовательности человеческих ALK4, ALK5, ALK7, ActRIIB, активина (активина А, активина В, активина С и активина Е), GDF11, GDF8, BMP10, GDF3 и BMP6 известны в области техники. Кроме того, в области техники известны многочисленные способы создания антител, некоторые из них описаны в данном документе. Таким образом, антитело антагонист для применения в соответствии с данным описанием может быть получено рутинным образом специалистом в области техники на основе сведений, известных на уровне техники, и информации, приведенной в данном документе.

В некоторых воплощениях предложенное антитело представляет собой химерное антитело. Термин "химерное антитело" относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи имеет происхождение из определенного источника или биологического вида, тогда как остальная часть тяжелой и/или легкой цепи имеет происхождение из другого источника или биологического вида. Некоторые химерные антитела описаны, например, в патенте US 4816567 и Morrison et al, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855. В некоторых воплощениях химерное антитело содержит вариабельный участок, не являющийся человеческим (например, вариабельный участок, имеющий происхождение из организма мыши, крысы, хомяка, кролика или не являющегося человеком примата, такого как обезьяна), и константный участок человеческого происхождения. В следующем примере химерное антитело представляет собой антитело "с переключенным классом", у которого класс или подкласс были изменены по сравнению с родительским антителом. Как правило, химерные антитела включают также их антигенсвязывающие фрагменты.

В некоторых воплощениях предложенное химерное антитело представляет собой гуманизованное антитело. "Гуманизованное" антитело относится к химерному антителу, содержащему аминокислотные остатки гипервариабельных областей (HVR), не являющиеся человеческими, и аминокислотные остатки каркасных областей (FR) человеческого происхождения. В некоторых воплощениях гуманизованное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, а обычно двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все из HVR (например, CDR) соответствуют таковым из иммуноглобулинов, не являющихся человеческими, и все или по существу все FR соответствуют таковым человеческого антитела. Гуманизованное антитело возможно может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, происходящую из человеческого антитела. "Гуманизованная форма" антитела, например антитела, не являющегося человеческим, относится к антителу, которое прошло гуманизацию. Гуманизованные антитела и способы их получения описаны, например, Almagro and Fransson (2008) Front. Biosci. 13:1619-1633 и дополнительно описаны, например, Riechmann et al, (1988) Nature 332:323-329; Queen et al. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033; в патенте US 5821337; 7527791; 6982321 и 7087409; Kashmiri et al, (2005) Methods 36:25-34 [описание пересадки SDR (a-CDR)]; Padlan, Mol. Immunol. (1991) 28:489-498 (описание "изменения поверхности"); Dall'Acqua et al. (2005) Methods 36:43-60 (описание "перетасовки FR"); Osbourn et al. (2005) Methods 36:61-68 и Klimka et al. Br. J. Cancer 2000 (2000) 252-260 (описание подхода "направленного отбора" при перетасовке FR). Каркасные области человеческого происхождения, которые можно использовать для гуманизации, включают, без ограничения: каркасные области, выбранные с помощью метода "наилучшего соответствия" (см., например, Sims et al. (1993) J. Immunol. 151:2296]; каркасные области, происходящие из консенсусной последовательности человеческих антител с вариабельными областями легких или тяжелых цепей определенной подгруппы (см., например, Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 и Presta et al. (1993) J. Immunol., 151:2623]; зрелые каркасные области человеческого происхождения (с соматическими мутациями) или каркасные области первичных антител (см., например, Almagro and Fransson (2008) Front. Biosci. 13:1619-1633]; и каркасные области, полученные при скрининге библиотек FR (см., например, Vasa et al., (1997) J. Biol. Chem. 272:10678-10684 и Rosok et al., (1996) J. Biol. Chem. 271:22611-22618].

В некоторых воплощениях предложенное антитело представляет собой человеческое антитело. Человеческие антитела можно получать различными способами, известными в области техники. Человеческие антитела в общем описаны van Dijk and van de Winkel (2008) Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) и Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459. Например, человеческие антитела могут быть получены путем введения иммуногена (например, полипептида GDF11, полипептида активина В, полипептида ActRIIA или полипептида ActRIIB) трансгенному животному, модифицированному, чтобы продуцировать интактные человеческие антитела или интактные антитела с вариабельными областями человеческого происхождения в ответ на введение антигена. Такие животные обычно имеют все или часть локусов иммуноглобулинов человека, заменяющие локусы эндогенных иммуноглобулинов, находящиеся вне хромосом или случайным образом интегрированные в хромосомы животных. У таких трансгенных животных локусы эндогенных иммуноглобулинов обычно бывают инактивированы. Обзор способов получения человеческих антител в трансгенных животных представлен, например, Lonberg (2005) Nat. Biotech.

23:1117-1125; в патенте US 6075181 и 6150584 (описывающем технологию XENOMOUSE™); патенте US 5770429 (описывающем технологию HuMab®); патенте US 7041870 (описывающем технологию K-M MOUSE®) и опубликованной заявке на патент US 2007/0061900 (описывающей технологию VelociMouse®). Вариабельные участки человеческого происхождения интактных антител, полученных в таких животных, могут быть далее модифицированы, например, путем комбинации с различными константными участками человеческого происхождения.

Предложенные антитела человека могут также быть получены при помощи гибридной технологии. Описаны клеточные линии миеломы человека и гетеромиеломы мышь-человек для продуцирования моноклональных человеческих антител [см., например, Kozbor J. *Immunol.*, (1984) 133: 3001; Brodeur et al. (1987) *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York; и Voerner et al. (1991) *J. Immunol.*, 147: 86]. Человеческие антитела, полученные с применением гибридной технологии с использованием В-клеток человека описаны Li et al., (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562. Дополнительные способы включают описанные, например, в патенте US 7189826 (описание получения моноклональных антител человека класса IgM из гибридных клеточных линий) и Ni, Xiandai Mianyixue (2006) 26(4):265-268 (2006) (описание гибридом человек-человек). Технология на основе гибридом человека (триомная технология) также описана Vollmers and Brandlein (2005) *Histol. Histopathol.*, 20(3):927-937 (2005) и Vollmers and Brandlein (2005) *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.*, 27(3): 185-91. Человеческие антитела, предложенные в данном документе, также могут быть получены путем выделения последовательностей вариабельных доменов Fv клонов, отобранных из библиотек фагового дисплея, созданных на основе генов человека. Такие последовательности вариабельности доменов затем могут быть объединены с необходимым константным доменом человеческого происхождения. Технологии для отбора человеческих антител из библиотек антител известны в области техники и описаны в настоящем документе.

Например, антитела по данному изобретению могут быть выделены путем скрининга комбинаторных библиотек на антитела с необходимой активностью или активностями. В области техники известны различные способы создания библиотек фагового дисплея и способы скрининга таких библиотек на антитела, обладающие необходимыми характеристиками связывания. Обзор таких способов представлен, например, Hoogenboom et al. (2001) в *Methods in Molecular Biology* 178:1-37, O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, N.J. и дополнительно описан, например, McCafferty et al. (1991) *Nature* 348:552-554; Clackson et al., (1991) *Nature* 352: 624-628; Marks et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 222:581-597; Marks and Bradbury (2003) в *Methods in Molecular Biology* 248:161-175, Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J.; Sidhu et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310; Lee et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093; Fellouse (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472; и Lee et al. (2004) *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132.

В некоторых способах фагового дисплея репертуар генов VH и VL клонируют отдельно при помощи полимеразной цепной реакции (PCR) и рекомбинируют случайным образом в фаговых библиотеках, с дальнейшим скринингом фагов по связыванию с антигеном, как описано Winter et al. (1994) *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455. Как правило, фаги презентуют фрагменты антител, либо в виде одноцепочечных Fv фрагментов (scFv), либо в виде Fab фрагментов. Библиотеки из иммунизированных источников позволяют получить высокоаффинные антитела к иммуногену (например, ALK4, ALK5, ALK7, ActRIIB, активин, GDF11, GDF8, GDF3, BMP10 или BMP6) без необходимости конструирования гибридом. В альтернативном варианте можно клонировать репертуар генов первичных антител (например, человеческих) для получения единого источника антител к широкому спектру "чужих", а также "своих" антигенов без какой-либо иммунизации, как описано Griffiths et al. (1993) *EMBO J.*, 12: 725-734. Наконец, "наивные" или первичные библиотеки также могут быть синтезированы путем клонирования неперестроенных сегментов, включающих V-гены стволовых клеток, и использования PCR-праймеров, содержащих случайные последовательности, которые кодируют высоковариабельные участки CDR3 и обеспечивают перестройку *in vitro*, согласно описанию Hoogenboom and Winter (1992) *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388. Публикации, описывающие фаговые библиотеки человеческих антител, включают, например: патент US 5750373 и публикации US 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 и 2009/0002360.

В некоторых воплощениях предложенное антитело представляет собой мультиспецифическое антитело, например биспецифическое антитело.

Мультиспецифические антитела (как правило, моноклональные антитела), специфически связывающиеся по меньшей мере с двумя различными эпитопами (например, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или более) или одним или более (например, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или более) антигенами.

Методики получения мультиспецифических антител включают совместную рекомбинантную экспрессию пар тяжелая цепь-легкая цепь двух иммуноглобулинов с различной специфичностью [см., например, Milstein and Cuello (1983) *Nature* 305: 537; международную публикацию. WO 93/08829 и Traunecker et al. (1991) *EMBO J.*, 10: 3655 и патент US 5731168 (технологию "knob-in-hole")], но не ограничиваются ими. Мультиспецифические антитела также можно получать, используя эффект электроста-

тического взаимодействия для конструирования гетеродимерных молекул антител с Fc фрагментом (см., например, WO 2009/089004 A1); перекрестное сшивание двух или более антител или фрагментов [см., например, патент US 4676980 и Brennan et al. (1985) Science 229: 81]; использование лейциновых застежек для получения биспецифических антител [см., например, Kostelny et al. (1992) J. Immunol., 148(5): 1547-1553]; использование технологии диател ("diabody") для создания биспецифических фрагментов антител [см., например, Hollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448]; использование димеров одноцепочечных Fv (sFv) [см., например, Gruber et al. (1994) J. Immunol., 152:5368] и получение триспецифических антител (см., например, Tutt et al. (1991) J. Immunol. 147: 60. Мультиспецифические антитела можно получать в форме полноразмерных антител или фрагментов антител. Изобретение также охватывает рекомбинантные антитела с тремя или более функциональными антигенсвязывающими сайтами, например, антитела-"осьминоги" [см., например, US 2006/0025576A1].

В некоторых воплощениях раскрытое в настоящем документе антитело представляет собой моноклональное антитело. Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны и/или связываются с тем же эпитопом, за исключением возможных вариантов антител, например, содержащих естественные мутации или образующиеся в ходе получения препарата моноклональных антител, указанные варианты обычно присутствуют в незначительном количестве. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые, как правило, включают различные антитела, направленные против различных эпитопов, каждое моноклональное антитело в препарате моноклональных антител направлено против единственной детерминанты антигена. Так, прилагательное "моноклональное" указывает на характер антитела, полученного из по существу гомогенной популяции антител, и не должно рассматриваться как необходимость получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела для применения по данному изобретению могут быть получены множеством способов, включая гибридную технологию, способы ДНК-рекомбинации, способы фагового дисплея и способы, в которых применяют трансгенных животных, содержащих все локусы человеческих иммуноглобулинов или их часть, но не ограничиваясь ими, эти и другие приведенные в качестве примера способы получения моноклональных антител описаны в данном документе.

Например, с применением иммуногенов, представляющих собой производные активина, можно получить антисыворотку или моноклональные антитела к белку или к пептиду согласно стандартным протоколам [см., например, Antibodies: A Laboratory Manual ed. by Harlow and Lane (1988) Cold Spring Harbor Press: 1988]. Можно иммунизировать млекопитающее, такое как мышь, хомяк или кролик, иммуногенной формой полипептида активина, антигенным фрагментом, который способен вызывать гуморальный ответ, или слитым белком. Способы придания иммуногенности белку или пептиду включают конъюгацию с носителями или другие способы, также хорошо известные в области техники. Иммуногенную часть полипептида активина можно вводить в присутствии адъюванта. За ходом иммунизации можно наблюдать, проводя определение титров антитела в плазме или сыворотке. Для оценки уровней производимого антитела и/или аффинности связывания можно применять стандартный иммуноферментный анализ (ELISA) или другие иммунологические методы с использованием иммуногена в качестве антигена.

После иммунизации животного антигенным препаратом активина можно получать антисыворотку и, при необходимости, из сыворотки можно выделять поликлональные антитела. Для получения моноклональных антител можно получать у иммунизированного животного антитело-продуцирующие клетки (лимфоциты) и сплавлять их с иммортализирующими клетками, такими как клетки миеломы, при помощи стандартных процедур слияния соматических клеток с образованием клеток-гибридом. Такие способы хорошо известны в области техники и включают, например, гибридную технологию [см., например, Kohler and Milstein (1975) Nature, 256: 495-497], технологии гибридом В клеток человека [см., например, Kozbar et al. (1983) Immunology Today, 4:72], и технологии EBV-гибридом для получения человеческих моноклональных антител [Cole et al. (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96]. Можно проводить иммунохимический скрининг клеток гибридом на предмет продуцирования антител, специфически взаимодействующих с полипептидом активина, и выделять моноклональные антитела из культуры, содержащей такие клетки гибридом.

В некоторых воплощениях в Fc область антитела, описанного в данном документе, могут быть введены одна или более модификаций аминокислот с образованием варианта Fc области. Вариант Fc области может содержать последовательность Fc области человеческого происхождения (например, Fc области IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека), содержащую аминокислотную модификацию (например, замену, делецию и/или вставку) в одном или более чем одном аминокислотном положении.

Например, данное описание предусматривает вариант антитела, обладающий некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, которые делают его подходящим кандидатом для применений, в которых важное значение имеет время полужизни антитела *in vivo*, однако некоторые эффекторные функции [например, комплемент-зависимая клеточная цитотоксичность (CDC) и антитело-зависимая клеточная цитотоксичность (ADCC)] являются необязательными или нежелательными. Для подтверждения снижения/устранения CDC и/или ADCC активностей можно проводить исследование цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo*. Например, исследование связывания с Fc рецепторами (FcR) можно проводить для под-

тверждения того, что антитело не связывается с FcγR (следовательно, по всей вероятности, не обладает ADCC активностью), но сохраняет способность связываться с FcRn. Первичные клетки, опосредующие ADCC, NK клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Данные, касающиеся экспрессии FcR на гемопоэтических клетках, кратко изложены, например, Ravetch and Kinet (1991) *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492. Не являющиеся исчерпывающими примеры исследований *in vitro*, позволяющих оценить ADCC активность молекулы, представляющей интерес, описаны в патенте US 5500362; Hellstrom, I. et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7059-7063]; Hellstrom, I. et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1499-1502; патенте US 5821337; Bruggemann, M. et al. (1987) *J. Exp. Med.* 166:1351-1361. В альтернативном варианте можно использовать нерадиоактивные методы исследования (см., например, нерадиоактивный метод исследования цитотоксичности для проточной цитометрии ACTI™ (CellTechnology, Inc. Mountain View, Calif, и нерадиоактивный метод исследования цитотоксичности CytoTox 96® (Promega, Madison, Wis.). Подходящие эффекторные клетки для таких исследований включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и естественные киллерные клетки (NK). В альтернативном варианте или в качестве дополнения ADCC активность молекулы, представляющей интерес, можно оценивать *in vivo*, например, в модели на животных, такой как описанная Clynes et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:652-656. Можно также исследовать связывание C1q для подтверждения того, что антитело не способно связывать C1q и, следовательно, не обладает CDC активностью [см., например, иммуноферментное определение связывания C1q и C3c в WO 2006/029879 и WO 2005/100402]. Для оценки активации комплемента можно выполнять исследование CDC [см., например, Gazzano-Santoro et al., (1996) *J. Immunol. Methods* 202:163; Cragg, M. S. et al. (2003) *Blood* 101:1045-1052; and Cragg, M. S. and M. J. Glennie (2004) *Blood* 103:2738-2743]. Можно также исследовать связывание FcRn и клиренса/времени полужизни *in vivo*, используя способы, известные в области техники [см., например, Petkova, S.B. et al. (2006) *Intl. Immunol.* 18(12): 1759-1769]. Антитела по данному изобретению со сниженной эффекторной функцией включают антитела с заменой одного или более чем одного остатка в положениях 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 Fc области (патент US 6737056). Такие мутанты Fc области включают мутанты Fc области с заменами двух или более аминокислот в положениях 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемые Fc мутанты "DANA" с заменой остатков в положениях 265 и 297 на аланин (патент US 7332581).

В некоторых воплощениях может быть желательным создание модифицированных цистеином антител, например, "thioMAb", в которых один или более чем один остаток антитела заменен остатками цистеина. В конкретных воплощениях замененные остатки располагаются в доступных сайтах антитела. При замене этих остатков на цистеин реакционноспособные тиоловые группы размещаются в доступных сайтах антитела и могут использоваться для конъюгирования антитела с другими группировками, например лекарственными группировками или группировками линкер-лекарство, для создания конъюгата антитела, согласно описанию ниже. В некоторых воплощениях цистеином могут быть заменены любой или любые из следующих остатков: V205 легкой цепи (нумерация по Кабат); A118 тяжелой цепи (нумерация EU) и S400 тяжелой цепи (нумерация EU) Fc области тяжелой цепи. Модифицированные цистеином антитела могут быть получены, например, как описано в патенте US 7521541.

Кроме того, способы, используемые для скрининга антител для обнаружения необходимого антитела, могут зависеть от свойств получаемого антитела. Например, если антитело будет применяться для связывания антигена в растворе, может быть желательным исследовать связывание в растворе. Для исследования взаимодействия между антителами и антигенами с целью обнаружения конкретных необходимых антител существуют разнообразные способы. Такие способы включают ELISA, исследования методом поверхностного плазмонного резонанса (например, исследование связывания на биосенсоре Biacore, Biacore AB, Uppsala, Sweden), сэндвич-анализ (например, система с парамагнитными частицами компании IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), вестерн-блоттинг, исследования с иммунопреципитацией и иммуногистохимические исследования.

В некоторых воплощениях рассматриваются варианты аминокислотных последовательностей предложенных в данном документе антител и/или связывающихся полипептидов. Например, может требоваться улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств антитела или связывающегося полипептида. Варианты аминокислотных последовательностей антитела и/или связывающихся полипептидов могут быть получены путем введения соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело и/или связывающийся полипептид, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции и/или вставки и/или замены остатков в составе аминокислотных последовательностей антитела и/или связывающегося полипептида. Для получения конечной конструкции можно осуществлять любые комбинации делеций, вставок и замен, при условии, что конечная конструкция будет обладать желаемыми характеристиками, например связыванием мишени (например, связыванием активина, такого как активина E и/или активина C).

Изменения (например, замены) можно осуществлять внутри HVR, например, для улучшения аффинности антитела. Такие изменения можно проводить в "горячих точках" HVR, т.е. в остатках, кодируемых кодонами, которые в процессе соматического созревания с высокой частотой подвергаются му-

тациям [см., например, Chowdhury (2008) *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)] и/или SDR (а-CDRs), с тестирование полученного варианта VH или VL на предмет аффинности связывания. Аффинное созревание в результате конструирования и повторного отбора из вторичных библиотек описано в области техники [см., например, Hoogenboom et al., in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37, O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, N.J., (2001)]. В некоторых воплощениях аффинное созревание достигается в результате увеличения разнообразия переменных генов, выбранных для аффинного созревания, любым из существующих способов (например, PCR пониженной точности, комбинирования переменных доменов легкой и тяжелой цепей или олигонуклеотид-направленного мутагенеза). После этого создают вторичную библиотеку. Затем проводят скрининг библиотеки для обнаружения любых вариантов антител с необходимой аффинностью. Другой способ увеличения разнообразия включает методы, нацеленные на изменение HVR, в которых рандомизируют несколько остатков HVR (например, одновременно 4-6 остатков). HVR остатки, задействованные в связывании антигена, можно специально идентифицировать, например, при помощи аланин-сканирующего мутагенеза или моделирования. В частности, изменениям часто подвергаются CDR-H3 и CDR-L3.

В некоторых воплощениях замены, вставки или делеции могут возникать в составе одного или более чем одного HVR, при условии, что такие изменения существенным образом не снижают способность антитела связывать антиген. Например, могут быть выполнены консервативные замены в HVR (например, консервативные замены, представленные в данном документе), которые существенным образом не снижают аффинность связывания. Такие изменения могут находиться за пределами "горячих точек" HVR или SDR. В некоторых воплощениях каждый HVR либо остается без изменений, либо содержит не более одной, двух или трех аминокислотных замен в составе вариантов последовательностей VH и VL, приведенных выше.

Эффективным способом обнаружения остатков или участков антитела и/или связывающегося полипептида, которые могут быть мишенями направленного мутагенеза, является так называемый "аланин-сканирующий мутагенез", описанный Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244: 1081-1085. В этом способе обнаруживают аминокислотный остаток или группу остатков-мишеней (например, заряженные остатки, такие как Arg, Asp, His, Lys и Glu) и замещают нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (например, аланином или полиаланином), чтобы выяснить, изменится ли взаимодействие антитела с антигеном. Если при первоначальной замене аминокислот происходят изменения функциональных свойств молекулы, в этих положениях можно проводить дальнейшие замены. В альтернативном варианте или в качестве дополнения можно провести анализ кристаллической структуры комплекса антиген-антитело для обнаружения точек контакта между антителом и антигеном. Такие остатки, задействованные в контактах, а также соседние с ними остатки могут быть выбраны или не выбраны в качестве кандидатов для замен. Можно проводить скрининг вариантов, чтобы установить, обладают ли они необходимыми свойствами.

Вставки аминокислотных последовательностей включают слияния по amino- и/или карбокси-концу, варьирующие по длине от одного остатка до полипептидов, содержащих сотни или более остатков, а также вставки одного или более чем одного аминокислотного остатка внутри последовательности. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым остатком метионина. Другие варианты молекулы антитела со вставками включают слияние N- или C-конца антитела с ферментом (например, ADERT) или полипептидом, увеличивающим время полужизни антитела в сыворотке.

В некоторых воплощениях предложенное в настоящем документе антитело и/или связывающийся полипептид могут быть также модифицированы с целью введения дополнительных небелковых группировок, известных в данной области техники и легко доступных. Группировки, подходящие для получения производных антитела и/или связывающегося полипептида, включают водорастворимые полимеры, но не ограничиваются ими. Не являющиеся исчерпывающими примеры водорастворимых полимеров включают полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена и малеинового ангидрида, полиаминокислоты (как гомополимеры, так и случайные сополимеры) и декстран или поли(п-винил пирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры проприленгликоля, сополимеры пропиленоксида и этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси, но не ограничиваются ими. Пропиональдегид полиэтиленгликоля может иметь преимущества при производстве благодаря своей стабильности в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Число полимеров, присоединенных к антителу и/или связывающемуся полипептиду, может варьировать, и в случае присоединения более, чем одного полимера, их молекулы могут быть идентичными или различаться. Как правило, число и/или тип полимеров, применяемых для получения производных, может определяться исходя из того, какие конкретные свойства или функции антитела и/или связывающегося полипептида нуждаются в улучшении, и того, будет ли производное антитела и/или связывающегося полипептида применяться в терапии при определенных условиях, и т.д., но не ограничиваться данными соображениями.

Г. Низкомолекулярные антагонисты.

В других аспектах антагонист ActRIIB для применения согласно способам и применениям, описанным в данном документе, является низкомолекулярным (низкомолекулярный антагонист ActRIIB) или представляет собой комбинацию низкомолекулярных антагонистов. Низкомолекулярный антагонист ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов может связываться, например, с одним или более чем одним лигандом ActRIIB (например, активином, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6 и/или BMP10), рецептором, рецептором I типа (например, ALK4, ALK5 и/или ALK7), рецептором II типа (например, ActRIIB) и/или ко-рецептором. В некоторых воплощениях низкомолекулярный антагонист ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов ингибирует передачу сигнала, опосредованную одним или более чем одним лигандом ActRIIB, например, по результатам исследования на клетках, таком, как описанные в данном документе. Как описано в данном документе, низкомолекулярный антагонист ActRIIB можно применять в отдельности или в комбинации с одной или более чем одной поддерживающей терапией или одним или более чем одним активным агентом для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза, в частности, лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести одного или более чем одного осложнения миелофиброза (например, спленомегалии, экстрамедуллярного гемопоэза, анемии и фиброза) и/или лечения пациента, получавшего лечение ингибитором Янус-киназы.

В некоторых воплощениях низкомолекулярный антагонист ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов ингибирует по меньшей мере GDF11, возможно дополнительно ингибируя одно или более чем одно из следующего: GDF8, активин (например, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин ВС, активин АЕ и/или активин ВЕ), GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 и ALK7. В некоторых воплощениях низкомолекулярный антагонист ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов ингибирует по меньшей мере GDF8, возможно дополнительно ингибируя одно или более чем одно из следующего: GDF11, активин (например, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин ВС, активин АЕ и/или активин ВЕ), GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 и ALK7. В некоторых воплощениях низкомолекулярный антагонист ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов ингибирует по меньшей мере активин (например, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин ВС, активин АЕ и/или активин ВЕ), возможно дополнительно ингибируя одно или более чем одно из следующего: GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 и ALK7. В некоторых воплощениях низкомолекулярный антагонист ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов ингибирует по меньшей мере активин В, возможно дополнительно ингибируя одно или более чем одно из следующего: GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 и ALK7. В некоторых воплощениях низкомолекулярный антагонист ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов ингибирует по меньшей мере BMP6, возможно дополнительно ингибируя одно или более чем одно из следующего: GDF8, активин (например, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин ВС, активин АЕ и/или активин ВЕ), GDF3, GDF11, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 и ALK7. В некоторых воплощениях низкомолекулярный антагонист ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов ингибирует по меньшей мере GDF3, возможно дополнительно ингибируя одно или более чем одно из следующего: GDF8, активин (например, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин ВС, активин АЕ и/или активин ВЕ), BMP15, BMP6, GDF11, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 и ALK7. В некоторых воплощениях низкомолекулярный антагонист ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов ингибирует по меньшей мере BMP10, возможно дополнительно ингибируя одно или более чем одно из следующего: GDF8, активин (например, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин ВС, активин АЕ и/или активин ВЕ), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIB, ALK4, ALK5 и ALK7. В некоторых воплощениях низкомолекулярный антагонист ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов ингибирует по меньшей мере ActRIIB, возможно дополнительно ингибируя одно или более чем одно из следующего: GDF8, активин (например, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин ВС, активин АЕ и/или активин ВЕ), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, BMP10, ALK4, ALK5 и ALK7. В некоторых воплощениях низкомолекулярный антагонист ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов ингибирует по меньшей мере ALK4, возможно дополнительно ингибируя одно или более чем одно из следующего: GDF8, активин (например, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин ВС, активин АЕ и/или активин ВЕ), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIB, BMP10, ALK5 и ALK7. В некоторых воплощениях низкомолекулярный антагонист ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов ингибирует по меньшей мере ALK5, возможно дополнительно ингибируя одно или более чем одно из следующего: GDF8, активин (например, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин ВС, активин АЕ и/или активин ВЕ), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIB, ALK4, BMP10 и ALK7. В некоторых воплощениях низкомолекулярный антагонист ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов ингибирует по меньшей мере ALK7, возможно дополнительно ингибируя одно или более чем одно из следующего: GDF8, активин (например, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин ВС, активин АЕ и/или активин

BE), BMP15, BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIB, ALK4, ALK5 и BMP10. В некоторых воплощениях низкомолекулярный антагонист ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов, описанных в данном документе, не ингибирует или по существу не ингибирует BMP9. В некоторых воплощениях низкомолекулярный антагонист ActRIIB или комбинация низкомолекулярных антагонистов, описанных в данном документе, не ингибирует или по существу не ингибирует активин А.

Низкомолекулярный антагонист ActRIIB может представлять собой ингибитор, действующий непосредственно или опосредовано. Например, низкомолекулярный антагонист или комбинация низкомолекулярных антагонистов может ингибировать экспрессию (например, транскрипцию, трансляцию, клеточную секрецию или их комбинации) по меньшей мере одного или более чем одного лиганда ActRIIB [например, активина (например, активина А, активина В, активина С, активина Е, активина АВ, активина АС, активина ВС, активина АЕ и/или активина ВЕ), GDF11, BMP10, BMP9, BMP6, BMP5, GDF3 и/или GDF8], рецептора I типа (например, ALK4, ALK5 и/или ALK7), рецептора II типа (например, ActRIIB), ко-рецептора и/или одного или более чем одного компонента последующих звеньев сигнального пути ActRIIB (например, Smad). В альтернативном варианте низкомолекулярный антагонист или комбинация низкомолекулярных антагонистов может непосредственно связываться и ингибировать, например, один или более чем один лиганд ActRIIB [например, активин (например, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин ВС, активны АЕ и/или активин ВЕ), GDF11, BMP10, BMP9, BMP6, BMP5, GDF3 и/или GDF8], рецептор I типа (например, ALK4, ALK5 и/или ALK7), рецепторы II типа (например, ActRIIB), ко-рецептор и/или один или более чем один компонент последующих звеньев сигнального пути ActRIIB (например, Smad). Комбинации одного или более чем одного низкомолекулярного антагониста ActRIIB, действующих опосредовано, можно применять согласно способам, описанным в данном документе.

Связывающие низкомолекулярные антагонисты по данному изобретению можно определять и синтезировать химическим путем, используя известные методы (см., например, публикации РСТ с номерами WO 00/00823 и WO 00/39585). В целом, низкомолекулярные антагонисты по изобретению обычно имеют размер менее чем приблизительно 2000 дальтон, в альтернативном варианте, размер менее чем приблизительно 1500, 750, 500, 250 или 200 дальтон, при этом такие органические низкомолекулярные соединения способны связываться, предпочтительно, специфически, с полипептидом, описанным в данном документе. Такие низкомолекулярные антагонисты можно идентифицировать без лишних экспериментов, используя рутинные способы. В этой связи необходимо отметить, что методики скрининга органических низкомолекулярных библиотек для молекул, способных связываться с полипептидом-мишенью, хорошо известны в области техники (см., например, международные публикации WO00/00823 и WO00/39585).

Связывающиеся низкомолекулярные соединения по данному описанию могут представлять собой, например, альдегиды, кетоны, оксимы, гидразоны, семикарбазоны, карбазиды, первичные амины, вторичные амины, третичные амины, N-замещённые гидразины, гидразида, спирты, эфиры, тиолы, тиоэфиры, дисульфиды, карбоновые кислоты, эфиры, амиды, мочевины, карбаматы, карбонаты, кетали, тиокетали, ацетали, тиоацетали, арилгалиды, арилсульфонаты, алкилгалиды, алкилсульфонаты, ароматические соединения, гетероциклические соединения, анилины, алкены, алкины, диолы, аминоспирты, оксазолидины, оксазолины, тиазолидины, тиазолины, енамины, сульфонамиды, эпоксиды, азиридины, изоцианаты, сульфонилахлориды, диазосоединения и хлорангидриды.

Д. Полинуклеотидные антагонисты.

В других аспектах антагонист ActRIIB для применения согласно способам и применениям, описанным в данном документе, представляет собой полинуклеотид (полинуклеотидный антагонист ActRIIB) или комбинацию полинуклеотидов. Полинуклеотидный антагонист ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагонистов может ингибировать, например, один или более чем один лиганд ActRIIB (например, активин, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6 и/или BMP10), рецепторы I типа (например, ALK4, ALK5 и/или ALK7), рецепторы II типа (например, ActRIIB), ко-рецептор и/или компонент последующих звеньев сигнального пути (например, Smad). В некоторых воплощениях полинуклеотидный антагонист ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагонистов ингибирует передачу сигнала, опосредованную одним или более чем одним лигандом ActRIIB, например, по результатам исследования на клетках, таком, как описанные в данном документе. Как описано в данном документе, полинуклеотидный антагонист ActRIIB можно применять в отдельности или в комбинации с одной или более чем одной поддерживающей терапией или одним или более чем одним активным агентом для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза, в частности, лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести одного или более чем одного осложнения миелофиброза (например, спленомегалии, экстрамедуллярного гемопоэза, анемии и фиброза) и/или лечения пациента, получавшего лечение ингибитором Янус-киназы.

В некоторых воплощениях полинуклеотидный антагонист ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагонистов ингибирует по меньшей мере GDF11, возможно дополнительно ингибируя одно или более чем одно из следующего: GDF8, активин (например, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин ВС, активин АЕ и/или активин ВЕ), GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 и ALK7. В некоторых воплощениях полинуклеотидный антагонист ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагони-

стов ингибирует по меньшей мере GDF8, возможно дополнительно ингибируя одно или более чем одно из следующего: GDF11, активин (например, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин ВС, активин АЕ и/или активин ВЕ), GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 и ALK7. В некоторых воплощениях полинуклеотидный антагонист ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагонистов ингибирует по меньшей мере активин (например, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин ВС, активин АЕ и/или активин ВЕ), возможно дополнительно ингибируя одно или более чем одно из следующего: GDF8, GDF11, GDF3, BMP6, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 и ALK7. В некоторых воплощениях полинуклеотидный антагонист ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагонистов ингибирует по меньшей мере BMP6, возможно дополнительно ингибируя одно или более чем одно из следующего: GDF8, активин (например, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин ВС, активин АЕ и/или активин ВЕ), GDF3, GDF11, BMP10, ActRIIB, ALK4, ALK5 и ALK7. В некоторых воплощениях полинуклеотидный антагонист ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагонистов ингибирует по меньшей мере BMP10, возможно дополнительно ингибируя одно или более чем одно из следующего: GDF8, активин (например, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин ВС, активин АЕ и/или активин ВЕ), BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIB, ALK4, ALK5 и ALK7. В некоторых воплощениях полинуклеотидный антагонист ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагонистов ингибирует по меньшей мере ActRIIB, возможно дополнительно ингибируя одно или более чем одно из следующего: GDF8, активин (например, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин ВС, активин АЕ и/или активин ВЕ), BMP6, GDF11, GDF3, BMP10, ALK4, ALK5 и ALK7. В некоторых воплощениях полинуклеотидный антагонист GDF/BMP полинуклеотидный антагонист ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагонистов ингибирует по меньшей мере ALK4, возможно дополнительно ингибируя одно или более чем одно из следующего: GDF8, активин (например, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин ВС, активин АЕ и/или активин ВЕ), BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIB, BMP10, ALK5 и ALK7. В некоторых воплощениях полинуклеотидный антагонист ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагонистов ингибирует по меньшей мере ALK5, возможно дополнительно ингибируя одно или более чем одно из следующего: GDF8, активин (например, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин ВС, активин АЕ и/или активин ВЕ), BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIB, ALK4, BMP10 и ALK7. В некоторых воплощениях полинуклеотидный антагонист ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагонистов ингибирует по меньшей мере ALK7, возможно дополнительно ингибируя одно или более чем одно из следующего: GDF8, активин (например, активин А, активин В, активин С, активин Е, активин АВ, активин АС, активин ВС, активин АЕ и/или активин ВЕ), BMP6, GDF11, GDF3, ActRIIB, ALK4, ALK5 и BMP10. В некоторых воплощениях полинуклеотидный антагонист ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагонистов, описанных в данном документе, не ингибирует или по существу не ингибирует BMP9. В некоторых воплощениях полинуклеотидный антагонист ActRIIB или комбинация полинуклеотидных антагонистов, описанных в данном документе, не ингибирует или по существу не ингибирует активин А.

В некоторых воплощениях полинуклеотидный антагонист по изобретению может представлять собой антисмысловую нуклеиновую кислоту, молекулу RNAi [например, малую интерферирующую РНК (siRNA), малую шпилечную РНК (shRNA), микроРНК (miRNA)], аптамер и/или рибозим. Нуклеиновые кислоты и аминокислотные последовательности человеческих GDF11, GDF8, активина (активина А, активина В, активина С и активина Е), BMP6, GDF3, ActRIIB, ALK4, ALK5, ALK7 и BMP10 известны в области техники. Кроме того, в области техники хорошо известны различные способы создания полинуклеотидных антагонистов. Таким образом, полинуклеотидные антагонисты для применения в соответствии с данным описанием могут быть получены рутинным образом специалистом в области техники на основе сведений, известных на уровне техники, и информации, приведенной в данном документе.

Антисмысловую технологию можно применять для контролирования экспрессии генов посредством антисмысловых ДНК или РНК или посредством образования тройной спирали. Антисмысловые технологии обсуждаются, например, Okano (1991) *J. Neurochem.* 56:560; *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1988). Образование тройной спирали обсуждается, например, Cooney et al. (1988) *Science* 241:456; и Dervan et al., (1991) *Science* 251:1300. Эти способы основаны на связывании полинуклеотида с комплементарной ДНК или РНК. В некоторых воплощениях антисмысловые нуклеиновые кислоты содержат последовательность одноцепочечной РНК или ДНК, которая комплементарна по меньшей мере части РНК транскрипта гена, описанного в данном документе. При этом абсолютная комплементарность предпочтительна, но не является обязательной.

Последовательность "комплементарная по меньшей мере части РНК" в данном описании обозначает последовательность, обладающую достаточной комплементарностью, чтобы гибридизоваться с РНК,

образуя стабильный дуплекс; в случае двуцепочечных антисмысловых нуклеиновых кислот гена, описанного в данном документе, таким образом можно исследовать одну цепь ДНК-дуплекса или можно оценивать образование триплекса. Способность гибридизоваться будет зависеть как от степени комплементарности, так и от длины антисмысловых нуклеиновых кислот. В целом, чем длиннее гибридизирующаяся нуклеиновая кислота, тем больше несовпадений оснований с РНК она может содержать и все еще образовывать стабильный дуплекс (или, при соответствующих обстоятельствах, триплекс). Специалист в области техники может установить допустимую степень несовпадений при помощи стандартных процедур для определения точки плавления гибридизирующегося комплекса.

Полинуклеотиды, которые комплементарны 5'-концу транскрипта, например, 5'-нетранслируемой последовательности до и включая иницирующий кодон AUG, будут наиболее эффективны в ингибировании трансляции. Однако, было показано, что последовательности, комплементарные 3'-нетранслируемым последовательностям мРНК, также эффективны в ингибировании трансляции мРНК [см., например, Wagner, R., (1994) *Nature* 372:333-335]. Таким образом, олигонуклеотиды, комплементарные либо 5'-, либо 3'-нетранслируемым некодирующим областям гена по изобретению, можно применять в антисмысловой технологии ингибирования трансляции эндогенной мРНК. Полинуклеотиды, комплементарные 5'-нетранслируемой области мРНК, должны включать в себя комплемент стартового кодона AUG. Антисмысловые полинуклеотиды, комплементарные кодирующим областям мРНК, являются менее эффективными ингибиторами трансляции, но могут применяться согласно способам данного изобретения. Независимо от того, созданы ли они для гибридизации с 5'-, 3'- или кодирующей областью мРНК по изобретению, антисмысловые нуклеиновые кислоты должны иметь длину по меньшей мере 6 нуклеотидов и предпочтительно быть олигонуклеотидами, длина которых варьирует от 6 до приблизительно 50 нуклеотидов. В определенных аспектах олигонуклеотид состоит по меньшей мере из 10 нуклеотидов, по меньшей мере из 17 нуклеотидов, по меньшей мере из 25 нуклеотидов или по меньшей мере из 50 нуклеотидов.

В одном воплощении антисмысловая нуклеиновая кислота по данному изобретению получена внутриклеточно посредством транскрипции экзогенной последовательности. Например, транскрибируется вектор или его часть с образованием антисмысловой нуклеиновой кислоты (РНК) гена по изобретению. Такой вектор будет содержать последовательность, кодирующую необходимую антисмысловую нуклеиновую кислоту. Такой вектор может оставаться эпизомным или интегрироваться в хромосому при условии, что он может транскрибироваться с образованием желаемой антисмысловой РНК. Такие векторы можно конструировать посредством технологии рекомбинантной ДНК, известной в области техники. Векторы могут быть плазмидными, вирусными или другими известными в области техники, используемыми для репликации и экспрессии в клетках позвоночных. Экспрессия последовательности, кодирующей необходимые гены по данному изобретению или их фрагменты, может быть опосредована любым промотором, известным в области техники, работающим в клетках позвоночных, предпочтительно, в клетках человека. Такие промоторы могут быть индуцибельными или конститутивными. Такие промоторы включают, без ограничения, область раннего промотора SV40 [см., например, Benoist and Chambon (1981) *Nature* 290:304-310], промотор, содержащийся в длинном 3' конечном повторе вируса саркомы Рауса [см., например, Yamamoto et al. (1980) *Cell* 22:787-797], тимидинкиназный промотор вируса герпеса [см., например, Wagner et al. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1441-1445] и регуляторными последовательностями гена металлотioneина [см., например, Brinster, et al. (1982) *Nature* 296:39-42].

В некоторых воплощениях полинуклеотидные антагонисты представляют собой интерферирующие молекулы РНК (RNAi), мишенями которых является экспрессия одного или более из следующего: GDF11, GDF8, активина (активина А, активина В, активина С и активина Е), BMP6, ActRIIB, GDF3, ALK4, ALK5, ALK7 и BMP10. РНК-интерференция относится к экспрессии РНК, интерферирующей с экспрессией РНК-мишени. В частности, интерферирующая молекула РНК производит сайленсинг гена-мишени, взаимодействуя с определенной мРНК опосредовано через siRNA (малую интерферирующую РНК). Затем двуцепочечный комплекс РНК направляется в клетке на деградацию. Молекула siRNA представляет собой двуцепочечный РНК-дуплекс длиной от 10 до 50 нуклеотидов, который интерферирует с экспрессией гена-мишени, который является достаточно комплементарным (например, по меньшей мере на 80% идентичен гену). В некоторых воплощениях молекула siRNA содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична нуклеотидной последовательности гена-мишени.

Дополнительные интерферирующие молекулы РНК включают короткую шпилечную РНК (shRNA); а также короткую интерферирующую шпилечную РНК и микроРНК (miRNA). Молекула shRNA содержит смысловую и антисмысловую последовательности гена-мишени, соединенные петлей. ShRNA транспортируется из ядра в цитоплазму и подвергается деградации наряду с мРНК. Для экспрессии РНК в интерферирующие молекулы РНК можно использовать промоторы Pol III или U6. Paddison et al. [*Genes & Dev.* (2002) 16:948-958, 2002] использовали молекулы малых РНК, свернутые в шпильки, как средство воздействия на RNAi. Соответственно, такие молекулы коротких шпилечных РНК (shRNA) также эффективно применяют в способах, описанных в данном документе. Длина ствола и петли функциональных shRNA варьирует; длина ствола варьирует в диапазоне от приблизительно 25 до приблизительно 30

нуклеотидов, а размер петли может варьировать от 4 до приблизительно 25 нуклеотидов, не влияя на активность сайленсинга. Не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, полагают, что такие shRNA похожи на двуцепочечные РНК продукты (dsRNA) РНКазы DICER и, в любом случае, обладают такой же способностью ингибировать экспрессию определенного гена. Экспрессия shRNA может обеспечиваться лентивирусным вектором. МикроРНК представляют собой одноцепочечные РНК длиной от приблизительно 10 до 70 нуклеотидов, которые изначально транскрибируются в виде пре-микроРНК, характеризующихся структурой "стебель-петля", затем подвергаются процессингу в зрелую микроРНК с последующей сборкой RISC.

Молекулы, опосредующие РНК-интерференцию, включая siRNA, но не ограничиваясь ей, можно получать *in vitro* путем химического синтеза (Hohjo, FhEBS Lett 521:195-199, 2002), гидролиза dsRNA (Yang et al, Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947, 2002), посредством транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7 (Donzeet et al, Nucleic Acids Res 30:e46, 2002; Yu et al, Proc Natl Acad Sci USA 99:6047-6052, 2002) и гидролиза двуцепочечной РНК с применением нуклеазы, такой как РНКаза III *E. coli* (Yang et al., Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947, 2002).

Согласно другому аспекту изобретения предложен полинуклеотидный антагонист, включая, без ограничения, ДНК ловушки, двуцепочечные ДНК, одноцепочечные ДНК, связанные в комплекс ДНК, инкапсулированные ДНК, вирусные ДНК, плазмидные ДНК, голые РНК, инкапсулированные РНК, вирусные РНК, двуцепочечные РНК, молекулы, способные вызывать РНК-интерференцию или их комбинации.

В некоторых воплощениях полинуклеотидные антагонисты по изобретению представляют собой аптамеры. Аптамеры представляют собой молекулы нуклеиновых кислот, включая молекулы двуцепочечной ДНК и одноцепочечной РНК, которые связываются и образуют третичные структуры, специфически связывающиеся с молекулой-мишенью. Создание и применение аптамеров в терапевтических целях хорошо известно в области техники (см., например, патент US 5475096). Дополнительную информацию об аптамерах можно найти в опубликованной заявке на патент US 20060148748. Аптамеры нуклеиновых кислот отбирают способами, известными в области техники, например, с помощью процесса систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (SELEX). SELEX представляет собой способ эволюции молекул нуклеиновых кислот *in vitro* посредством высокоспецифичного связывания с молекулами-мишенями, как описано, например, в патентах US 5475096; 5580737; 5567588; 5707796; 5763177; 6011577 и 6699843. Другой способ скрининга для обнаружения аптамеров описан в патенте US 5270163. Способ SELEX основан на способности нуклеиновых кислот образовывать разнообразные двух- и трехмерные структуры, а также химическом разнообразии мономеров нуклеотидов, действующих в качестве лигандов (образующих специфические связывающиеся пары) практически с любым химическим соединением, как мономерным, так и полимерным, включая другие молекулы нуклеиновых кислот и полипептиды. Мишенями могут служить молекулы любого размера или состава. Способ SELEX включает отбор из смеси кандидатных олигонуклеотидов и пошаговые итерации связывания, разделения и амплификации с использованием одинаковой общей схемы отбора для достижения необходимой аффинности связывания и селективности. Взяв в качестве стартовой точки смесь нуклеиновых кислот, которые могут содержать сегмент рандомизированной последовательности, способ SELEX включает стадии приведения в контакт смеси и мишени в условиях, способствующих связыванию; разделение несвязанных нуклеиновых кислот и нуклеиновых кислот, специфически связавшихся с молекулами-мишенями; диссоциацию комплексов нуклеиновая кислота-мишень; амплификацию нуклеиновых кислот, диссоциировавших из комплексов нуклеиновая кислота-мишень с получением смеси нуклеиновых кислот, обогащенных лигандами. Стадии связывания, разделения, диссоциации и амплификации повторяют столько раундов, сколько необходимо для получения лигандов нуклеиновых кислот, которые связываются с высокой аффинностью и специфичностью с молекулой-мишенью.

Как правило, такие связывающиеся молекулы вводят животному отдельно [см., например, O'Connor (1991) J. Neurochem. 56:560], однако такие связывающиеся молекулы также могут экспрессироваться *in vivo* с полинуклеотидов, захваченных клеткой-хозяином и экспрессироваться *in vivo* [см., например, Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1988)].

Е. Фоллистатин и антагонисты FLRG.

В других аспектах антагонист ActRIIB представляет собой фоллистатин или полипептид FLRG. Как описано в данном документе, фоллистатин и/или полипептиды FLRG можно применять в отдельности или в комбинации с одной или более чем одной поддерживающей терапией или одним или более чем одним активным агентом для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза, в частности, лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести одного или более чем одного осложнения миелофиброза (например, спленомегалии, экстрамедуллярного гемопоэза, анемии и фиброза) и/или лечения пациента, получавшего лечение ингибитором Янус-киназы.

Термин "полипептид фоллистатин" охватывает полипептиды, содержащие любой полипептид фоллистатина естественного происхождения, а также любые его варианты (включая мутанты, фрагменты, слитые белки и пептидомиметики), которые сохраняют полезную активность, и также охватывает любые

функциональные мономеры или мультимеры фоллистатина. В некоторых предпочтительных воплощениях полипептиды фоллистатина по изобретению связываются и/или ингибируют активность активина, в частности, активина А. Варианты полипептидов фоллистатина, которые сохраняют свойство связывать активин, можно выявить на основании предыдущих исследований взаимодействий фоллистатина и активина. Например, WO2008/030367 описывает специфические домены фоллистатина ("FSD"), которые имеют важное значение для связывания активина. Как показано ниже в SEQ ID NO: 65-67, N-концевой домен фоллистатина ("FSND" SEQ ID NO: 65), FSD2 (SEQ ID NO: 67) и в меньшей степени FSD1 (SEQ ID NO: 66) представляют собой приведенные в качестве примера домены фоллистатина, которые важны для связывания активина. Кроме того, выше описаны способы создания и тестирования библиотек полипептидов применительно к полипептидам ActRII, и такие способы также относятся к созданию и тестированию вариантов фоллистатина. Полипептиды фоллистатина включают полипептиды, являющиеся производными последовательности любого известного фоллистатина, имеющие последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности фоллистатина, и возможно идентична по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более. Примеры полипептидов фоллистатина включают зрелые полипептиды фоллистатина или более короткие изоформы или другие варианты предшественника полипептида фоллистатина человека (SEQ ID NO: 63) как описано, например, в WO2005/025601.

Изоформа предшественника полипептида фоллистатина человека FST344 приведена ниже:

```

1 MVRARHQPGG LCLLLLLLCO FMEDRSAQAG NCWLRQAKNG RCQVLYKTEL
51 SKEECCSTGR LSTSWTEEDV NDNTLFWMI FNGGAPNCIP CKETCENVDC
101 GPGKKCRMNK KNKPRVCAP DCSNITWKG P VCGLDGKTYR NECALLKARC
151 KEQPELEVQY QGRCKKTCRD VFCPGSSSTCV VDQTNNAVCV TCNRIPEPA
201 SSEQYLCGND GVTYSSACHL RKATCLLGRS IGLAYEGKCI KAKSCEDIQC
251 TGGKKCLWDF KVGRGRCSLC DELCPDSKSD EPVCASDNAT YASECAMKEA
301 ACSSGVLLEV KHSGSCNSIS EDTEEEEEE DQDYSPFISS ILEW

```

(SEQ ID NO: 63; NCBI Reference No. NP_037541.1)

Сигнальный пептид подчеркнут, также подчеркнуты последние 27 остатков, представляющие C-концевое удлинение, отличающее данную изоформу фоллистатина от более короткой изоформы фоллистатина FST317, приведенной ниже.

Изоформа предшественника полипептида фоллистатина человека FST317 приведена ниже:

```

1 MVRARHQPGG LCLLLLLLCO FMEDRSAQAG NCWLRQAKNG RCQVLYKTEL
51 SKEECCSTGR LSTSWTEEDV NDNTLFWMI FNGGAPNCIP CKETCENVDC
101 GPGKKCRMNK KNKPRVCAP DCSNITWKG P VCGLDGKTYR NECALLKARC
151 KEQPELEVQY QGRCKKTCRD VFCPGSSSTCV VDQTNNAVCV TCNRIPEPA
201 SSEQYLCGND GVTYSSACHL RKATCLLGRS IGLAYEGKCI KAKSCEDIQC
251 TGGKKCLWDF KVGRGRCSLC DELCPDSKSD EPVCASDNAT YASECAMKEA
301 ACSSGVLLEV KHSGSCN (SEQ ID NO: 64; NCBI Reference No. NP_006341.1)

```

Сигнальный пептид подчеркнут.

Последовательность N-концевого домена фоллистатина (FSND) приведена ниже:

```

GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGR LSTSWTEEDVNDNTLFWMI
FNGGAPNCIPCK (SEQ ID NO: 65; FSND)

```

Последовательности FSD1 и FSD2 приведены ниже:

```

ETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCV (SEQ ID NO: 66; FSD1)
KTCRDVFCPGSSSTCVVDQTNNAVCVT (SEQ ID NO: 67; FSD2)

```

В другом аспекте агент для применения согласно способам, изложенным в данном документе, представляет собой фоллистатин-подобный ген (FLRG), также известный как фоллистатин-подобный белок 3 (FSTL3). Термин "полипептид FLRG" охватывает полипептиды, содержащие любой полипептид FLRG естественного происхождения, а также любые его варианты (включая мутанты, фрагменты, слитые белки и пептидомиметики), которые сохраняют полезную активность. В некоторых предпочтительных воплощениях полипептиды FLRG по изобретению связываются и/или ингибируют активность активина, в частности, активина А. Варианты полипептидов FLRG, которые сохраняют свойство связывать активин, можно выявить рутинными способами исследования взаимодействий FLRG и активина (см., например, US 6,537,966). Кроме того, выше описаны способы создания и тестирования библиотек полипептидов применительно к полипептидам ActRII, и такие способы также относятся к созданию и тестированию вариантов FLRG. Полипептиды FLRG включают полипептиды, являющиеся производными последовательности любого известного FLRG, имеющие последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности FLRG, и возможно идентична по меньшей мере на 85%, 90%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или более.

Предшественник полипептида FLRG человека (предшественник фоллистатин-подобного белка 3) приведен ниже:

```

1  MRPGAGPLW PLPWGALAWA VGFVSSMSGSG NPAPGGVCWL QQGQEATCSL
51  VLQTDVTRAE CCASGNIDTA WSNLTHPGNK INLLGFLGLV HCLPCKDSCD
101 GVECGPGKAC RMLGGRPRCE CAPDCSGLPA RLQVCGSDGA TYRDECELRA
151  ARCRGHPDLS VMYRGRCRKS CEHVVCPRPQ SCVVDQTGSA HCVVCRAAPC
201  PVPSSPGQEL CGNNNVTYIS SCHMRQATCF LGRSIGVRHA GSCAGTPEEP
251  PGGESAEEEE NFV (SEQ ID NO: 68; NCBI Reference No. NP_005851.1)

```

Сигнальный пептид подчеркнут.

В некоторых воплощениях функциональные варианты или модифицированные формы полипептидов фоллистатина и полипептидов FLRG включают слитые белки, имеющие по меньшей мере часть полипептида фоллистатина или полипептида FLRG и один или более слитых доменов, таких как, например, домены, облегчающие выделение, выявление, стабилизацию или мультимеризацию полипептида. Подходящие слитые домены подробно обсуждаются выше применительно к полипептидам ActRIIB. В некоторых воплощениях агент, являющийся антагонистом по изобретению, представляет собой слитый белок, содержащий активин-связывающую часть полипептида фоллистатина, слитого с Fc доменом. В другом воплощении агент, являющийся антагонистом по изобретению, представляет собой слитый белок, содержащий активин-связывающую часть полипептида FLRG, слитого с Fc доменом.

3. Скрининговые исследования.

В некоторых аспектах данное описание относится к применению обсуждаемых полипептидов ActRIIB и их вариантов (например, ловушек GDF8) для обнаружения соединений (агентов), которые являются агонистами или антагонистами полипептидов ActRIIB. Соединения, обнаруженные посредством такого скрининга, можно тестировать для оценки их способности лечить миелофиброз, например, на моделях на животных.

Существует множество подходов для скрининга терапевтических агентов для лечения миелофиброза путем направленного действия на сигнальный путь ActRIIB (например, передачу сигнала Smad). В некоторых воплощениях можно осуществлять высокопроизводительный скрининг соединений для обнаружения агентов, нарушающих ActRIIB-опосредованное влияние на выбранную клеточную линию. В некоторых воплощениях исследование проводят для скрининга и обнаружения соединений, которые специфически ингибируют или уменьшают связывание полипептида ActRIIB с его партнером по связыванию, таким как лиганд ActRIIB (например, активин А, активин В, активин АВ, активин С, GDF8, GDF3, GDF11 или BMP10). В альтернативном варианте исследование можно применять для обнаружения соединений, которые усиливают связывание полипептида ActRIIB с его партнером по связыванию, таким как лиганд ActRIIB. В следующем воплощении соединения можно обнаруживать по их способности взаимодействовать с полипептидом ActRIIB.

Существует достаточное количество исследований различных форматов и в свете данного изобретения даже те из них, которые специально не описаны в данном документе, тем не менее понятны специалисту в области техники. Как описано в данном документе, исследуемые соединения (агенты) по изобретению могут быть созданы любым комбинаторным химическим способом. В альтернативном варианте обсуждаемые соединения могут представлять собой биомолекулы естественного происхождения, синтезированные *in vivo* или *in vitro*. Соединения (агенты), у которых будут исследовать их способность действовать в качестве модуляторов роста ткани, могут продуцировать, например, бактерии, дрожжи, растения или другие организмы (например, продукты естественного происхождения), могут быть получены химическими способами (например, низкомолекулярные соединения, включая пептидомиметики) или получены рекомбинантными способами. Исследуемые соединения, рассматриваемые в данном изобретении, включают непептидные органические молекулы, пептиды, полипептиды, пептидомиметики, сахара, гормоны и молекулы нуклеиновых кислот. В некоторых воплощениях исследуемый агент представляет собой низкомолекулярное органическое соединение, имеющее молекулярную массу менее чем приблизительно 2000 Да.

Исследуемые соединения по изобретению могут быть представлены в виде отдельных единичных объектов или представлены в виде библиотек большей сложности, таких как полученные методами комбинаторной химии. Такие библиотеки могут содержать, например, спирты, алкилгаллиды, амины, амиды, сложные эфиры, альдегиды, простые эфиры и другие классы органических соединений. Исследуемые соединения могут поступать в тест-систему либо в выделенном виде, либо в виде смесей соединений, в частности, на начальных этапах скрининга. Возможно, соединения могут быть дериватизированы другими соединениями и иметь дериватирующие группы, облегчающие выделение соединений. Не являющиеся исчерпывающими примеры дериватирующих групп включают биотин, флуоресцеин, дигоксигенин, зеленый флуоресцентный белок, изотопы, полигистидин, магнитные частицы, глутатион-S-трансферазу (GST), фотоактивируемые перекрестно-сшивающие агенты или любые их комбинации.

Во многих программах скрининга лекарственных средств, в которых исследуют библиотеки соединений и экстракты естественного происхождения, желательны высокопроизводительные исследования

для максимизации числа соединений, за которыми наблюдают в течение определенного периода времени. Исследования, которые проводят в бесклеточных системах, такие которые могут выполняться с очищенными или получищенными белками, зачастую предпочтительны в качестве "первичного" скрининга, поскольку они могут быть разработаны таким образом, чтобы обеспечивать быстрое и относительно простое обнаружение изменения молекулы-мишени, опосредуемое исследуемым соединением. Кроме того, в системе *in vitro* в целом можно пренебречь эффектами клеточной токсичности или биодоступности исследуемого соединения, вместо этого сфокусировав исследование в первую очередь на эффектах лекарственного средства на молекулу-мишень, что может проявляться в изменении аффинности связывания между полипептидом ActRIIB и его партнером по связыванию (например, лигандом ActRIIB).

Исключительно в целях иллюстрации, в приведенном в качестве примера скрининговом исследовании по данному описанию, соединение, представляющее интерес, приводят в контакт с выделенным и очищенным полипептидом ActRIIB, который обычно способен связываться с лигандом ActRIIB, соответствующим целям исследования. К смеси соединения и полипептида ActRIIB затем добавляют к композиции, содержащей лиганд ActRIIB (например, GDF11). Выявление и количественное определение комплексов ActRIIB/лиганд ActRIIB обеспечивает средства для определения эффективности соединения в ингибировании (или потенцировании) образования комплекса между полипептидом ActRIIB и связывающимся с ним белком. Эффективность соединения можно оценивать путем построения кривых зависимости ответа от концентрации на основании данных, полученных при различных концентрациях исследуемого соединения. Кроме того, также можно проводить контрольное исследование, обеспечивающее исходные параметры, с которыми проводят сравнение. Например, в контрольном исследовании выделенный и очищенный лиганд ActRIIB добавляют к композиции, содержащей полипептид ActRIIB, и проводят количественно определение образования комплекса ActRIIB/лиганд ActRIIB в отсутствие исследуемого соединения. Следует понимать, что порядок добавления компонентов реакционной смеси может варьировать, и их можно добавлять одновременно. Кроме того, вместо очищенных белков можно применять клеточные экстракты и лизаты для получения подходящей бесклеточной тест-системы.

Образование комплекса между полипептидом ActRIIB и связывающимся с ним белком можно выявить различными способами. Например, количественное определение изменения образования комплексов можно проводить, например, с использованием белков, несущих выявляемую метку, таких как радиоактивно меченный (например, ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C или ^3H), флуоресцентно меченный (например, FITC), ферментативно меченный полипептид ActRIIB и/или связывающийся с ним белок, с иммунологическим или хроматографическим определением.

В некоторых воплощениях данного описания предусмотрено применение метода поляризации флуоресценции и метода резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) при измерении, напрямую или опосредовано, степени взаимодействия между полипептидом ActRIIB и связывающимся с ним белком. Кроме того, способы выявления, такие как основанные на использовании оптических волноводов (см., например, публикацию PCT WO 96/26432 и патент US 5677196), поверхностного плазмонного резонанса (SPR), детекторов поверхностного заряда и детекторов поверхностных сил совместимы со многими воплощениями изобретения.

Кроме того, в данном изобретении предусмотрено применение метода обнаружения белок-белковых взаимодействий, также известного под названием "двугибридного анализа" для обнаружения агентов, которые нарушают или потенцируют взаимодействие между полипептидом ActRIIB и его партнером по связыванию; см., например, патент US 5283317; Zervos et al. (1993) *Cell* 72:223-232; Madura et al. (1993) *J Biol Chem* 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) *Biotechniques* 14:920-924; and Iwabuchi et al. (1993) *Oncogene* 8:1693-1696). В конкретном воплощении данного изобретения предусматривается применение обратной двугибридной системы для обнаружения соединений (например, низкомолекулярных соединений или пептидов), которая разобщает взаимодействие между полипептидом ActRIIB или ловушкой GDF и связывающимся с ним белком [см., например, Vidal and Legrain, (1999) *Nucleic Acids Res* 27:919-29; Vidal and Legrain, (1999) *Trends Biotechnol* 17:374-81 и патенты US 5525490; 5955280 и 5965368].

В некоторых воплощениях обсуждаемые соединения обнаруживают по их способности взаимодействовать с полипептидом ActRIIB. Взаимодействие между соединением и полипептидом ActRIIB может быть ковалентным или нековалентным. Например, такое взаимодействие может быть обнаружено на уровне белка с применением биохимических методов *in vitro*, включая образование поперечных связей под действием света, связывание радиоактивно меченного лиганда и аффинную хроматографию [см., например, Jakoby WB et al. (1974) *Methods in Enzymology* 46:1]. В некоторых случаях скрининг соединений можно проводить в исследованиях, в основе которых лежит механизм, таких как исследования для обнаружения соединений, связывающихся с полипептидом ActRIIB. Они могут включать связывание, происходящее на твердой фазе или в жидкой фазе. В альтернативном варианте, можно трансфицировать клетку геном, кодирующим полипептид ActRIIB, вместе с репортерной системой (например, β -галактозидазой, люциферазой или зеленым флуоресцентным белком) и проводить скрининг против библиотеки, предпочтительно, высокопроизводительный скрининг, или с отдельными членами библиотеки. Можно использовать другие исследования, в основе которых лежит механизм, например, исследования,

в которых обнаруживают изменения свободной энергии. Исследования связывания можно выполнять с мишенью, фиксированной на лунке, частице или чипе, или захваченной иммобилизированным антителом или осуществлять разделение посредством капиллярного электрофореза. Связанные соединения можно выявить при помощи колориметрических измерений по конечной точке или измерений флуоресценции или методом поверхностного плазмонного резонанса.

4. Примеры применения в терапии.

Как описано в примерах, приведенных в данном документе, обнаружили, что антагонист ActRIIB (ингибитор) можно применять для лечения пациентов с миелофиброзом, в частности, улучшения различных осложнений заболевания, включая, например, спленомегалию, экстремедуллярный гемопоэз и фиброз. В частности, представленные данные свидетельствуют, что полипептид ловушка GDF уменьшает спленомегалию, экстремедуллярный гемопоэз и фиброз на модели миелофиброза JAK2V617F. Соответственно, в некоторых аспектах описание относится к композициям и способам лечения миелофиброза, в частности, лечения или предупреждения одного или более чем одного осложнения миелофиброза (например, спленомегалии, экстремедуллярного гемопоэза, анемии и фиброза), путем введения пациента, которому это необходимо, эффективного количества одного или более чем одного антагониста ActRIIB, возможно в комбинации с одним или более чем одним способом поддерживающей терапии или другим активным агентом для лечения миелофиброза.

В данном описании термин "терапевтический", который предупреждает расстройство или состояние, относится к соединению, которое снижает частоту возникновения расстройства или состояния в статистической выборке по сравнению с нелеченой контрольной выборкой или отсрочивает наступление или снижает тяжесть одного или более чем одного симптома расстройства или состояния по сравнению с нелеченой контрольной выборкой. Термин "лечение" в данном описании охватывает улучшение или устранение состояния, после того как оно развилось. В любом случае, предупреждение или лечение можно разграничивать в диагнозе, установленном врачом или другим медицинским специалистом, и предполагаемом результате введения терапевтического агента.

В целом, лечение или предупреждение заболевания или состояния, описанного в данном документе, достигается посредством введения антагониста ActRIIB в эффективном количестве. "Эффективное количество" агента обозначает количество, эффективное для достижения желаемого терапевтического или профилактического результата при необходимых дозировках и в течение необходимого периода времени. Терапевтически эффективное количество агента по данному описанию может варьировать в зависимости от таких факторов, как течение заболевания, возраст, пол и масса тела индивидуума, а также от способности агента вызывать у индивидуума желаемый ответ. Профилактически эффективное количество обозначает количество, эффективное для достижения желаемого профилактического результата при необходимых дозировках и в течение необходимого периода времени.

Термины "субъект", "индивидуум" или "пациент" являются взаимозаменяемыми в данном документе и обычно относятся к млекопитающим. Млекопитающие включают одомашненных животных (например, коров, овец, кошек, собак и лошадей), приматов (например, людей и не являющихся человеком приматов, таких как обезьяны), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс), но не ограничиваются ими.

Миелофиброз представляет собой клональное неопластическое расстройство гемопоэза, обычно характеризующее прогрессирующим фиброзом костного мозга, приводящее к все более неэффективному гемопоэзу, экстремедуллярному гемопоэзу, различным воспалительным осложнениям и уменьшению выживаемости [Mascarenhas et al. (2012) *Curr Med Chem* 19:4399-4413; and Vannucchi et al. (2011) *Hematol Am Soc Hematol Educ Prog* 2011:222-230]. Он представляет собой одно из миелопролиферативных нарушений костного мозга с избыточным образованием клеток. Продукция цитокинов, таких как фактор роста фибробластов, аномальными клеточными клонами приводит к замещению гемопоэтической ткани костного мозга соединительной тканью через коллагеновый фиброз. Уменьшение гемопоэтической ткани нарушает способность пациента образовывать новые клетки крови, в результате чего прогрессирует панцитопения, недостаточность всех типов клеток крови. Однако, пролиферация фибробластов и отложение коллагена является вторичным феноменом, а сами фибробласты не являются частью аномального клона клеток. В результате прогрессирующего рубцевания, или фиброза, костного мозга у пациента развивается экстремедуллярный гемопоэз, поскольку гемопоэтические клетки вынуждены мигрировать в другие зоны, в частности в печень и селезенку. Это вызывает увеличение этих органов. Если затрагивается печень, состояние называют гепатомегалией. Увеличение селезенки называют спленомегалией, которая также вносит вклад в панцитопению, особенно в тромбоцитопению и анемию. Кроме того, сообщалось об экстремедуллярном гемопоэзе, происходящем в легких и лимфатических узлах. Другим осложнением экстремедуллярного гемопоэза является пойкилоцитоз, присутствие эритроцитов аномальной формы. Типичные клинические проявления миелофиброза включают прогрессирующую гепатоспленомегалию, аномальное число форменных элементов крови и симптомы истощения, такие как утомляемость, потеря массы тела, ночная потливость, лихорадка, зуд, боль в костях, чувство быстрого насыщения, боль или дискомфорт в области живота, артралгии, миалгии, парестезии, кахексия, инфаркт селезенки и кровотечение. До недавнего времени единственным лечением с четко продемонстрированным

влиянием на прогрессирование заболевания была аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток alloHSCT, однако лечение связано с высокой смертностью, и лишь небольшая часть пациентов является подходящими кандидатами для такой интенсивной терапии [Gupta et al. (2012) *Blood* 120: 1367-1379].

В некоторых аспектах антагонист ActRIIB может применяться в отдельности или в комбинации с одной или более чем одной поддерживающей терапией или действующим веществом для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза (например, первичного миелофиброза, миелофиброза, которому предшествовала истинная полицитемия, или миелофиброза, которому предшествовала эссенциальная тромбоцитемия). В частности, антагонисты ActRIIB можно применять в отдельности или в комбинации с одной или более чем одной поддерживающей терапией или действующим веществом для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести одного или более чем одного осложнения миелофиброза, включая, например, неэффективный гемопоэз, анемию, воспаление, фиброз (например, фиброз костного мозга, фиброз селезенки и фиброз печени), панцитопению, тромбоцитопению, экстрамедуллярный гемопоэз (например, селезеночный экстрамедуллярный гемопоэз, печеночный экстрамедуллярный гемопоэз, легочный экстрамедуллярный гемопоэз и лимфатический экстрамедуллярный гемопоэз), гепатомегалию, спленомегалию, остеосклероз, остеомиелофиброз, пойкилоцитоз, утомляемость, потерю массы тела, ночную потливость, лихорадку, зуд, боль в костях, чувство быстрого насыщения, боль или дискомфорт в области живота, артралгии, миалгии, парестезии, кахексию, инфаркт селезенки и кровотечения.

В настоящее время диагностика первичного миелофиброза (PMF) базируется на критериях Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) и включает комплексную оценку клинических и лабораторных показателей [Tefferi A et al. (2007) *Blood*. 110:1092-1097]. Существуют три основных критерия диагностики согласно ВОЗ: 1) пролиферация мегакариоцитов с признаками атипичности (мегакариоциты от мелких до крупных с аномальным ядерно-цитоплазматическим соотношением и гиперхромными ядрами, плотным хроматином и дискариозом) в сочетании с ретикулиновым и/или коллагеновым фиброзом или при отсутствии ретикулинового фиброза изменения мегакариоцитов сопровождаются повышенной клеточностью, пролиферацией гранулоцитов, часто снижением эритропоэза (т.е. пре-фибротический первичный миелофиброз), 2) не соответствует критериям ВОЗ для диагностики хронического миелолейкоза, истинной полицитемии, миелодиспластического синдрома или других миелопролиферативных новообразований, и 3) обнаружение JAK2V617F или другого клонального маркера или отсутствие признаков реактивного фиброза костного мозга. Кроме того, существует четыре дополнительных диагностических критерия ВОЗ: 1) лейкоэритробластоз, 2) повышение уровня лактатдегидрогеназы сыворотки, 3) анемия и 4) пальпируемая спленомегалия. Лейкоэритробластоз периферической крови (т.е. наличие ядерных эритроцитов, незрелых гранулоцитов и каплевидных эритроцитов) является типичным, но не постоянным признаком ПМФ, префибротический ПМФ может не сопровождаться выраженным лейкоэритробластозом [Kvasnicka et al. (2010) *Am J Hematol*. 85:62-69]. Фиброз костного мозга при ПМФ обычно ассоциирован с JAK2V617F или мутантными CALR или MPL, трисомией 9 хромосомы или del(13q) [Hussein et al. (2009) *Eur J Haematol*. 82:329-338]. Наличие этих генетических маркеров свидетельствует в пользу диагноза ПМФ, при наличии миелоидных новообразований, ассоциированных с фиброзом костного мозга. В некоторых аспектах описание относится к способам и применениям антагонистов ActRIIB для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести первичного миелофиброза, в частности, лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести одного или более чем одного осложнения первичного миелофиброза.

В настоящее время диагностика миелофиброза, развившегося на фоне предшествующей истинной полицитемии (постполицитемический МФ), и миелофиброза, развившегося на фоне предшествующей эссенциальной тромбоцитемии (посттромбоцитемический МФ), базируется на критериях, опубликованных Международной рабочей группой по изучению и лечению миелопролиферативных заболеваний (IWG-MRT) [Barosi G. et al. (2008) *Leukemia*. 22:437-438]. Существует два основных критерия постполицитемического МФ согласно IWG-MRT: 1) документальное подтверждение предшествующего диагноза истинной полицитемии согласно критериям ВОЗ и 2) фиброз костного мозга 2-3 степени (по шкале 0-3) или 3-4 степени (по шкале 0-4). 2-3 степень согласно европейской классификации: диффузная, часто грубая волокнистая сеть без признаков коллагенизации (отрицательный результат окрашивания на трихром) или диффузная грубая волокнистая сеть с участками коллагенизации (положительное окрашивание на трихром) [Thiele et al. (2005) *Haematologica*. 90:1128-1132]. 3-4 степень согласно европейской классификации: диффузное или плотное увеличение количества ретикулина с множественными пересечениями; иногда только очаговые пучки коллагена и/или очаги остеосклероза, или диффузное и плотное увеличение ретикулина, характеризующееся множественными пересечениями, с грубыми пучками коллагена, часто сопровождающееся значительным остеосклерозом [Manoharan et al. (1979) *Br J Haematol* 43:185-190]. Кроме того, существует четыре дополнительных диагностических критерия согласно IWG-MRT, для постановки диагноза постполицитемического МФ у пациента требуется наличие основных критериев IWG-MRT и двух дополнительных критериев: 1) анемия или длительное отсутствие потребности в флеботомии при отсутствии циторедуктивной терапии, 2) лейкоэритробластическая картина периферической

крови, 3) увеличение размеров селезенки, определяемое либо как пальпируемая спленомегалия > 5 см, либо появление пальпируемой спленомегалии; 4) появление 1 и более из 3 конституциональных симптомов: потеря более 10% массы тела за 6 мес, ночная потливость, необъяснимая лихорадка. Существует два основных критерия посттромбоцитемического МФ согласно IWG-MRT: 1) документальное подтверждение предшествующего диагноза эссенциальной тромбоцитемии согласно критериям ВОЗ, 2) фиброз костного мозга 2-3 степени (по шкале 0-3) или 3-4 степени (по шкале 0-4). Кроме того, существует пять дополнительных диагностических критерия согласно IWG-MRT, для постановки диагноза посттромбоцитемического МФ у пациента требуется наличие основных критериев IWG-MRT и двух дополнительных критериев: 1) анемия и снижение гемоглобина на 20 г/л ниже исходного значения, 2) лейкоэритробластическая картина периферической крови, 3) увеличение размеров селезенки, определяемое либо как пальпируемая спленомегалия > 5 см, либо появление пальпируемой спленомегалии; 4) увеличение уровня сывороточной лактатдегидрогеназы и 5) появление 1 и более из 3 конституциональных симптомов: потеря более 10% массы тела за 6 мес, ночная потливость, необъяснимая лихорадка. В некоторых аспектах описание относится к способам и применениям антагонистов ActRIIB для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести постполицитемического миелофиброза, в частности, лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести одного или более чем одного осложнения постполицитемического миелофиброза. В некоторых аспектах описание относится к способам и применениям антагонистов ActRIIB для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести посттромбоцитемического миелофиброза, в частности, лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести одного или более чем одного осложнения посттромбоцитемического миелофиброза.

Активное моделирование прогноза миелофиброза началось с разработкой Международной шкалы оценки прогноза (IPSS) в 2009 [Cervantes F et al. (2009) *Blood* 113:2895-2901]. IPSS миелофиброза служит для определения прогноза у пациентов на момент постановки диагноза и в ней используются пять независимых предикторов уменьшения выживаемости: возраст >65 лет, гемоглобин <100 г/л, количество лейкоцитов $>25 \times 10^9$ /л, бласты в периферической крови $\geq 1\%$ и присутствие конституциональных симптомов. Наличие 0, 1, 2 и ≥ 3 нежелательных факторов определяет заболевание с низким, промежуточным-1, промежуточным-2 или высоким риском, соответственно. Соответствующие медианные значения выживаемости составляют 11,3, 7,9, 4 и 2,3 лет соответственно. В некоторых аспектах описание относится к способам и применениям антагонистов ActRIIB для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза у пациента, имеющего миелофиброз с низким, промежуточным-1, промежуточным-2 или высоким риском согласно IPSS. В некоторых воплощениях описание относится к способам и применениям антагонистов ActRIIB для предупреждения или отсрочивания прогрессирования риска при миелофиброзе согласно IPSS (например, предупреждения или отсрочивания прогрессирования риска от низкого до промежуточного-1, от промежуточного-1 до промежуточного-2 и от промежуточного-2 до высокого риска согласно IPSS). В некоторых воплощениях описание относится к способам и применениям антагонистов ActRIIB, чтобы способствовать понижению или усиливать понижение риска при миелофиброзе согласно IPSS (например, способствовать понижению или усиливать понижение риска от высокого до промежуточного-2, от промежуточного-2 до промежуточного-1 и от промежуточного-1 до низкого риска согласно IPSS).

Впоследствии IWG-MRT разработала динамическую прогностическую модель (Динамическую международную шкалу оценки прогноза [DIPSS]), в которой используются те же самые прогностические переменные, что и в IPSS, но ее можно применять в любое время в ходе заболевания [Passamonti F et al. (2010) *Blood*. 115:1703-1708]. Согласно DIPSS, уровню гемоглобина <100 г/л присваивается два балла вместо одного, и классификация по группам риска изменяется соответствующим образом: низкий (0 баллов), промежуточный-1 (1 или 2 балла), промежуточный-2 (3 или 4 балла) и высокий (5 или 6 баллов). Соответствующие медианные значения выживаемости 14,2, 4 и 1,5 лет, не были достигнуты. В некоторых аспектах описание относится к способам и применениям антагонистов ActRIIB для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза у пациента, имеющего миелофиброз с низким, промежуточным-1, промежуточным-2 или высоким риском согласно DIPSS. В некоторых воплощениях описание относится к способам и применениям антагонистов ActRIIB для предупреждения или отсрочивания прогрессирования риска при миелофиброзе согласно DIPSS (например, предупреждения или отсрочивания прогрессирования риска от низкого риска до промежуточного-1, от промежуточного-1 до промежуточного-2 и от промежуточного-2 до высокого риска согласно DIPSS). В некоторых воплощениях описание относится к способам и применениям антагонистов ActRIIB, чтобы способствовать понижению или усиливать понижение риска при миелофиброзе согласно DIPSS (например, способствовать понижению или усиливать понижение риска от высокого риска до промежуточного-2, от промежуточного-2 до промежуточного-1 и от промежуточного-1 до низкого риска согласно DIPSS).

Впоследствии были обнаружены IPSS- и DIPSS-независимые факторы риска для выживаемости при миелофиброзе, включавшие неблагоприятный кариотип (т.е. сочетанный кариотип или изолированная

аномалия или две аномалии, включающие +8, -7/7q-, i(17q), inv(3), -5/5q-, 12p- или перестройку 11q23) [Hussein et al. (2010) *Blood*. 115:496-499], потребность в трансфузии эритроцитов [Tefferi et al. (2009) *Am J Hematol*. 85:14-17] и количество тромбоцитов $<100 \times 10^9/\text{л}$ [Patnaik et al. (2010) *Eur J Haematol*. 84:105-108]. Соответственно, DIPSS модифицировали в DIPSS-плюс, включив следующие три дополнительных DIPSS-независимых фактора риска: количество тромбоцитов $<100 \times 10^9/\text{л}$, потребность в трансфузии эритроцитов и неблагоприятный кариотип. На основе вышеупомянутых восьми факторов риска выделяют четыре категории риска DIPSS-плюс: низкий (отсутствие факторов риска), промежуточный-1 (один фактор риска), промежуточный-2 (два или три фактора риска) и высокий (четыре или более факторов риска) с соответствующими медианными значениями выживаемости 15,4, 6,5, 2,9 и 1,3 лет. В некоторых аспектах описание относится к способам и применениям антагонистов ActRIIB для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза у пациента, имеющего миелофиброз с низким, промежуточным-1, промежуточным-2 или высоким риском согласно DIPSS-плюс. В некоторых воплощениях описание относится к способам и применениям антагонистов ActRIIB для предупреждения или отсрочивания прогрессирования риска при миелофиброзе согласно DIPSS-плюс (например, предупреждения или отсрочивания прогрессирования риска от низкого риска до промежуточного-1, от промежуточного-1 до промежуточного-2 и от промежуточного-2 до высокого риска согласно DIPSS-плюс). В некоторых воплощениях описание относится к способам и применениям антагонистов ActRIIB, чтобы способствовать понижению или усиливать понижение риска при миелофиброзе согласно DIPSS-плюс (например, способствовать понижению или усиливать понижение риска от высокого риска до промежуточного-2, от промежуточного-2 до промежуточного-1 и от промежуточного-1 до низкого риска согласно DIPSS-плюс).

С момента публикации DIPSS-плюс было опубликовано несколько исследований, представивших дополнительную прогностическую информацию. Например, моносомальный кариотип, аномалии inv(3)/i(17q) и любые два из следующего: циркулирующие бласты $>9\%$, лейкоциты $\geq 40 \times 10^9/\text{л}$ или другой неблагоприятный кариотип были предикторами смертности от миелофиброза в течение 2 лет $>80\%$ [Tefferi et al. (2011) *Blood*. 118:4595-4598.]. Аналогично, меньшая выживаемость при миелофиброзе была ассоциирована с нуль-зиготностью по гаплотипу JAK2 46/1, низкой аллельной нагрузкой JAK2V617F или присутствием мутаций IDH, EZH2, SRSF2 или ASXL1 [Tefferi, Ayalew (2014) *Am. J. Hematol*. 89:916-925]. Напротив, присутствие или отсутствие мутаций JAK2V617F, MPL или TET2 не влияло на выживаемость. На выживаемость при миелофиброзе также влияли повышенные уровни IL-8 и IL-2R в сыворотке, а также уровни свободных легких цепей в сыворотке, и то и другое независимо от DIPSS-плюс. Недавно Tefferi et al. исследовали 254 пациента с миелофиброзом и описали частоту мутаций 58% для JAK2, 25% CALR, 8% MPL и 9% дикий тип для всех трех мутаций (т.е. трижды негативный) [Tefferi et al. (2014) *Leukemia*, предварительная публикация DOI 10.1038/leu.2014.3]. Частота мутаций CALR в случаях отсутствия мутаций JAK2/MPL составляла 74%. Мутации CALR были ассоциированы с более молодым возрастом, меньшим количеством тромбоцитов и меньшим количеством баллов DIPSS-плюс. У пациентов с мутацией CALR также была меньше вероятность анемии, потребности в трансфузии или лейкоцитоза. Мутации сплайсосомы у пациентов с мутацией CALR были редки. В последующем международном исследовании 570 пациентов авторы обнаружили наибольшую выживаемость у пациентов CALR+ASXL1-(медиана 10,4 лет) и наименьшую у пациентов CALR-ASXL1+ (медиана 2,3 лет) [Tefferi et al. (2014) *Leukemia*, предварительная публикация DOI 10.1038/leu.2014.57]. Пациенты CALR+ASXL1+ и CALR-ASXL1 имели одинаковую выживаемость и были сгруппированы вместе в категорию промежуточного риска (медианное значение выживаемости 5,8 лет). Как становится очевидным для общей выживаемости, выживаемость без признаков лейкоза также существенно снижена у пациентов, несущих некоторые мутации, включая IDH и SRSF2 [Tefferi et al. (2012) *Leukemia*. 26:475-480; Lasho et al. (2012) *Blood*. 120:4168-4171]. Кроме того, мутации LNK Ни TPO также были ассоциированы с миелофиброзом.

Обнаружение мутации Янус-киназы 2 (JAK2) с приобретением функции, JAK2V617F, существенно улучшило понимание биологических основ миелофиброза, а также позволило разработать руксолитиниб, ингибитор JAK2, который является первым лекарственным средством, одобренным FDA для лечения миелофиброза [Baxter et al. (2005) *Lancet* 365:1054-1061; James C. et al. (2005) *Nature* 434:1144-1148; Kralovics et al. (2005) *N Engl J Med*. 352:1779-1790; and Levine et al. (2005) *Cancer Cell* 7:387-397]. Семейство Янус-киназ тирозинкиназных рецепторов включает четыре различных белка (JAK1, JAK2, JAK3 и TYK2), и как известно, данное семейство белков играет ключевую роль в росте и развитии миелоидных и лимфоидных клеток. В частности, они опосредуют межклеточные взаимодействия цитокиновых рецепторов, в результате чего происходит активация представителей семейства передатчиков сигнала и активаторов транскрипции (STAT) и последующая активация генов, регулирующих пролиферацию и дифференциацию клеток [Quintas-Cardama et al. (2011) *Nat Rev Drug Discov* 10:127-140]. Мутация JAK2V617F приводит к конститутивной активации JAK2 и таким образом, способствует пролиферации и дифференциации миелоидных клеток. Другие ингибиторы Янус-киназ, проходящие клинические исследования, включают, например: федратиниб (SAR302503), моноэлотиниб (CYT387), пакритиниб, лестауртиниб, AZD-1480, BMS-911543, NS-018, LY2784544, SEP-701, XL019 и AT-9283.

В некоторых аспектах изобретение относится к способам и применениям антагонистов ActRIIB для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза у пациента, имеющего одно или более из следующего: моносомальный кариотип, аномалии inv(3)/i(17q), циркулирующие бласты >9% и/или лейкоциты $\geq 40 \times 10^9/\text{л}$, нуль-зиготность по гаплотипу JAK2 46/1, мутация JAK2V617F, мутация IDH1, мутация IDH2, мутация EZH2, мутация SRSF2, мутация ASXL1, повышение уровней IL-8 в сыворотке, повышение уровней IL-2R в сыворотке, повышение уровней свободных легких цепей, мутация JAK1, мутация JAK2, мутация JAK3, мутация TYK2, мутация MPL, мутация CALR, CALR+ASXL1-, CALR-ASKL1+, CALR+ASKL1+, CALR-ASKL1-, мутация TET2, мутация THPO и мутация LNK.

Сдерживание развития анемии может быть одним из наиболее трудных аспектов лечения пациентов с миелофиброзом [Tefferi A. (2011) *Blood* 117(13):3949-3504; Barosi et al. (2011) *Expert Opin Pharmacother* 12(10): 1597-1611]. Трансфузия крови (трансфузия цельной крови или эритроцитов) является стандартной терапией для пациентов с миелофиброзом с симптомами анемии. Помимо трансфузии для лечения анемии у этих пациентов применяют различные стандартные агенты. Например, стимуляторы эритропоэза [например, такие стимуляторы эритропоэза, как эритропоэтин (ЕРО) и его производные], андрогены (например, тестостерона энантат и флуоксиместерон), преднизон, даназол, талидомид, преднизон и леналидомид стандартно применяют для лечения анемии у пациентов с миелофиброзом. В целом, стимуляторы эритропоэза применяют у пациентов с умеренной анемией, не зависящей от трансфузии, и низкими уровнями эритропоэтина в сыворотке. Процент пациентов с объективным ответом варьирует от 20 до 60%, при этом нет четких данных, свидетельствующих в пользу дарбэпоэтина-альфа по сравнению со стандартным рекомбинантным эритропоэтином. Ответы на стимуляторы эритропоэза обычно являются краткосрочными (приблизительно 1 год). Если стимуляторы эритропоэза не работают или имеют низкую эффективность, обычно применяют препараты даназола или андрогенов для лечения пациентов с анемией, процент пациентов с объективным ответом составляет приблизительно 20%. Низкие дозы талидомида в сочетании с постепенно снижающимися дозами преднизона обеспечивали объективный ответ приблизительно у 20-40% пациентов с анемией [Thapaliya et al. (2011) *Am J Hematol* 86(1):86-98]. Однако, лечение талидомидом часто плохо переносится пациентами, вызывая периферические нейропатии, запор и сонливость, что вынуждает прекратить прием препарата. У пациентов с миелофиброзом, имеющих анемию, ассоциированную с del(5q31), в качестве терапии первой линии рекомендуется леналидомид, поскольку он вызывает существенное улучшение с устранением анемии и в некоторых случаях с достижением молекулярной ремиссии [Tefferi et al. (2007) *Leukemia* 21(8): 1827-1828]. В некоторых аспектах описание относится к способам и применениям антагонистов ActRIIB для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза у пациента, имеющего анемию. В некоторых воплощениях описание относится к способам и применениям антагонистов ActRIIB для лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести анемии у пациента, имеющего миелофиброз. В некоторых воплощениях описание относится к способу лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза у пациента, которому это необходимо, включающему введение одного или более чем одного антагониста ActRIIB совместно с одним или более чем одним действующим веществом, выбранным из группы, состоящей из: стимулятора эритропоэза [например, такого как эритропоэтин (ЕРО) и его производные], андрогена (например, тестостерона энантата и флуоксиместерона), преднизона, даназола, талидомида, преднизона и леналидомида. В некоторых воплощениях описание относится к способу лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести анемии у пациента с миелофиброзом, которому это необходимо, включающему введение одного или более чем одного антагониста ActRIIB совместно с одним или более чем одним действующим веществом, выбранным из группы, состоящей из: стимулятора эритропоэза [например, такого как эритропоэтин (ЕРО) и его производные], андрогена (например, тестостерона энантата и флуоксиместерона), преднизона, даназола, талидомида, преднизона и леналидомида. В некоторых воплощениях описание относится к способу лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести анемии у пациента с миелофиброзом, которому это необходимо, включающему введение одного или более чем одного антагониста ActRIIB совместно с трансфузией крови (трансфузией цельной крови или эритроцитов).

При наблюдении за уровнем гемоглобина и/или гематокрита у человека уровень ниже нормального для соответствующей возрастной и половой категории может указывать на наличие анемии, хотя следует учитывать индивидуальные вариации. Например, уровень гемоглобина от 10 до 12,5 г/дл и обычно приблизительно 11,0 г/дл считают нормальным диапазоном для здоровых взрослых людей, хотя с терапевтической точки зрения, более низкий целевой уровень может вызывать меньше побочных эффектов со стороны сердечно-сосудистой системы; см., например, Jacobs et al. (2000) *Nephrol Dial Transplant* 15, 15-19. В альтернативном варианте в качестве показателя анемии можно использовать уровень гематокрита (процентное отношение объема образца крови, занимаемое клетками). Уровни гематокрита у здоровых индивидуумов варьируют от приблизительно 41 до 51% у здоровых мужчин и от 35% до 45% у здоровых женщин. В некоторых воплощениях пациент может получать лечение с введением по схеме, предназначенной восстановить у пациента целевой уровень эритроцитов, гемоглобина и/или гематокрита или по-

зволить уменьшить или устранить трансфузии эритроцитов (снизить трансфузионную нагрузку), при этом поддерживая приемлемый уровень эритроцитов, гемоглобина и/или гематокрита. Поскольку уровни гемоглобина и гематокрита могут варьировать от индивидуума к индивидууму, оптимально, чтобы целевой уровень гемоглобина и/или гематокрита мог быть индивидуализирован для каждого пациента.

У пациентов, часто получающих трансфузии цельной крови или эритроцитов, нормальный механизм гомеостаза железа может быть подавлен, в конечном итоге приводя к токсическим и возможно фатальному накоплению железа в жизненно важных тканях, таких как сердце, печень и эндокринные железы. Регулярные трансфузии эритроцитов требуют применения доз крови от различных доноров и, следовательно, сопряжены с повышенным риском аллоиммунизации. Затрудненный сосудистый доступ, доступность хелаторов железа и комплаентность к ним и высокая стоимость - вот некоторые причины, делающие желательным ограничение количества трансфузий эритроцитов.

В некоторых аспектах один или более чем один антагонист ActRIIB, возможно в комбинации с активатором рецептора EPO могут применяться с молекулами одного или более чем одного хелатора железа, чтобы способствовать экскреции железа в мочу и/или кал и таким образом предупреждать или инвертировать перенасыщение ткани железом у пациентов с миелофиброзом. Эффективные хелаторы железа должны быть способны селективно связывать и нейтрализовать ионы железа, окисленную форму не связанного с трансферрином железа, что возможно в большинстве случаев является причиной токсичности железа вследствие каталитического образования гидроксильных радикалов и продуктов окисления [см., например, Esposito et al. (2003) *Blood* 102:2670-2677]. Такие агенты являются структурно разнообразными, но все имеют атомы доноры кислород или азот, способные образовывать нейтрализующие октаэдрические координационные комплексы с отдельными атомами железа в стехиометрическом соотношении 1:1 (гексадентатные агенты), 2:1 (тридентатные) или 3:1 (бидентатные) [Kalinowski et al. (2005) *Pharmacol Rev* 57:547-583]. В целом, эффективные хелаторы железа также имеют относительно низкий молекулярный вес (например, менее 700 дальтон), с растворимостью как в воде, так и в липидах для обеспечения доступа к пораженным тканям. Конкретные примеры молекул-хелаторов железа включают дефероксамин, гексадентатный агент бактериального происхождения, требующий ежедневного парентерального введения и активные при пероральном приеме синтетические агенты деферипрон (бидентатный) и деферасифокс (тридентатный). Комбинированная терапия, включающая введение в тот же день двух хелаторов железа, является многообещающей у пациентов, без объективного ответа на монотерапию хелатором, а также для преодоления проблем с низкой комплаентностью к монотерапии дефероксамином [Cao et al. (2011) *Pediatr Rep* 3(2):e17; and Galanello et al. (2010) *Ann NY Acad Sci* 1202:79-86].

Один или более чем один антагонист ActRIIB по изобретению можно применять в комбинации с активатором рецептора EPO, чтобы достичь увеличения количества эритроцитов, в частности, при низких дозах. Это может быть эффективным для уменьшения известных побочных действий и снижения рисков, ассоциированных с высокими дозами активаторов рецептора EPO. Основные побочные эффекты стимуляторов эритропоэза включают, например, избыточное повышение уровней гематокрита или гемоглобина и полицитемии. Повышенные уровни гематокрита могут привести к гипертензии (более конкретно, к обострению гипертензии). Описаны и другие побочные эффекты стимуляторов эритропоэза, некоторые из которых относятся к гипертензии, и представляют собой головные боли, гриппоподобный синдром, окклюзию шунтов, инфаркт миокарда и церебральные пароксизмы вследствие тромбоза, гипертензивную энцефалопатию и эритроцитарную аплазию; см., например, Singibarti (1994) *J. Clin Investig* 72(suppl 6), S36-S43; Horl et al. (2000) *Nephrol Dial Transplant* 15(suppl 4), 51-56; Delanty et al. (1997) *Neurology* 49, 686-689; and Bunn (2002) *N Engl J Med* 346(7), 522-523). В некоторых воплощениях данного описания предложены способы лечения или предупреждения анемии у пациента с миелофиброзом путем введения пациенту терапевтически эффективного количества одного или более чем одного антагониста ActRIIB и активатора рецептора EPO. В некоторых воплощениях антагонисты ActRIIB по описанию можно применять в комбинации с активаторами рецептора EPO для уменьшения требуемой дозы этих активаторов у пациентов, предрасположенных к побочным действиям этих стимуляторов эритропоэза. Указанные способы можно применять для терапевтического и профилактического воздействия на пациента.

При условии, что антагонисты ActRIIB по данному описанию действуют по иному механизму, нежели ESA (агенты, стимулирующие эритропоэз), эти антагонисты могут найти применение для увеличения количества эритроцитов и уровней гемоглобина у пациента, у которого не достигается объективный ответ на ESA или другие активаторы рецептора EPO. Например, антагонист ActRIIB по данному описанию может быть полезен для пациента, у которого введение нормальной или повышенной дозы ESA (> 300 МЕ/кг/неделю) не приводит к увеличению уровня гемоглобина до целевого уровня. Неудовлетворительный ответ на ESA может быть либо конститутивным (наблюдаться при первом лечении ESA) или приобретенным) наблюдаться при повторном лечении ESA.

Циторедуктивные агенты были препаратами выбора для большинства пациентов с симптоматической спленомегалией. Гидроксикарбамид (гидроксимочевина, HS) является наиболее часто применяемым циторедуктивным агентом, который в высоких дозах обычно вызывает умеренный ответ. Однако HS часто может обострять цитопению и поэтому часто плохо переносится. Согласно опубликованным

данным, до 35% пациентов, получавших лечение НС, демонстрировали уменьшение размеров селезенки от 25% до 50% [Martinez-Trillos et al. (2010) *Ann Hematol.* 89(12): 1233-1237]. У пациентов, у которых не достигается объективный ответ на НС, можно применять бусульфан или мелфалан, особенно у пожилых пациентов, поскольку есть данные, что указанные агенты могут увеличивать частоту лейкомиической трансформации. Процент пациентов, у которых достигается объективное улучшение состояния селезенки при приеме талидомида в низких дозах, является низким (<20%). Однако, в исследовании, включавшем некоторых пациентов, у которых предшествующая терапия леналидомидом была безуспешной, процент пациентов, у которых достигался объективный ответ, составлял 33%. В случаях массивной рефрактерной спленомегалии, процент пациентов, у которых достигался объективный ответ на внутривенное введение кладрибина на протяжении месяца, доходил до 50%, при этом тяжелые, но обратимые цитопении были основным проявлением токсичности [Faoro et al. (2005) *Eur J Haematol* 74(2): 117-120]. В недавних исследованиях руксолитиниб превосходил НС и поэтому становится препаратом первой линии для контроля симптоматической или прогрессирующей спленомегалии. К сожалению, частым побочным эффектом руксолитиниба является возникновение или ухудшение анемии у пациентов с миелофиброзом. Таким образом, хотя ингибиторы JAK могут применяться для лечения спленомегалии, они могут ухудшать другие осложнения миелофиброза, в частности, анемию и связанные с анемией нарушения.

Помимо ингибирования JAK2 проводят исследование других стратегий лечения для лечения миелолипролиферативных расстройств, включая иммуномодулирующие препараты (например, помалидомид), ингибиторы мишеней пути mTOR млекопитающих (например, рапамицин, сиролимус, дефоролимус, эверолимус, темсиролимус, NVP-BEZ235, BGT226, SF1126, PK1-587, INK128, AZD8055 и AZD2014) и модуляторы эпигенетических факторов (например, ингибиторы деацетилазы гистонов, такие как гивино-стат (ITF2357), панобино-стат (LBH589) и працино-стат) [Mascarenhas et al. (2013) *Haematologica* 98(10): 1499-1509].

В данном описании дополнительно предусмотрено применение антагониста ActRIIB в комбинации с одним или более чем одним терапевтическим воздействием для лечения пациентов, согласно данному описанию. Например, антагонисты ActRIIB можно вводить в комбинации с цитотоксинами, иммуносупрессивными агентами, радиотоксичными агентами и/или антителами терапевтического назначения. Конкретные совместно применяемые терапевтические средства, предусмотренные в данном изобретении, включают стероиды (например, кортикостероиды, такие как преднизон), иммуносупрессивные и/или противовоспалительные агенты (например, гамма-интерферон, циклофосамид, азатиоприн, метотрексат, пеницилламин, циклоспорин, колхицин, антитимоцитарный глобулин, микофенолата мофетил и гидроксихлорокин), цитотоксические препараты, блокаторы кальциевых каналов (например, нифедипин), ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АПФ), пара-аминобензойная кислота (ПАВА), диметилсульфоксид, ингибиторы трансформирующего фактора роста бета (TGFP), ингибиторы интерлейкина-5 (IL-5) и пан-каспазные ингибиторы, но не ограничиваются ими. Дополнительные агенты, которые могут применяться в комбинации с антагонистом ActRIIB, включают лектины (как описано, например, в патенте US 7026283, содержание которого включено в данное описание во всей полноте путем ссылки), а также антифибротические агенты, описанные Wynn et al. (2007, *J Clin Invest* 117:524-529), но не ограничиваются ими. Например, дополнительные антитромботические агенты и терапии включают противовоспалительные/иммуносупрессивные/цитотоксические лекарственные средства (включая колхицин, азатиоприн, циклофосамид, преднизон, талидомид, пентоксифиллин и теофиллин), модуляторы сигнального пути TGFP (включая релаксин, SMAD7, HGF и BMP7, а также ингибиторы TGFβ1, TβRI, TβRII, EGR-I и CTGF), антагонисты цитокинов и цитокиновых рецепторов (ингибиторы LL-1β, LL-5, IL-6, IL-13, IL-21, IL-4R, IL-13Rα1, GM-CSF, TNF-α, онкостатина M, WISP-I и PDGF), цитокины и хемокины (LFN-γ, LFN-α/β, LL-12, IL-10, HGF, CXCL10 и CXCL11), антагонисты хемокинов (ингибиторы CXCL1, CXCL2, CXCL12, CCL2, CCL3, CCL6, CCL17 и CCL18), антагонисты хемокиновых рецепторов (ингибиторы CCR2, CCR3, CCR5, CCR7, CXCR2 и CXCR4), антагонисты TLR (ингибиторы TLR3, TLR4 и TLR9), антагонисты ангиогенеза (VEGF-специфические антитела и заместительная терапия при дефиците аденозиндезаминазы), антигипертензивные лекарственные средства (бета-блокаторы и ингибиторы ANG 11, АПФ и альдостерона), вазоактивные субстанции (антагонисты рецептора ET-1 и бозентан), ингибиторы ферментов, осуществляющих синтез и процессинг коллагена (ингибиторы пролилгидроксилазы), антагонисты В клеток (ритуксимаб), антагонисты интегринов/молекул адгезии (молекул, блокирующих интегрины α1β1 и αvβ6, а также ингибиторы интегрин-связанной киназы и антитела, специфические в отношении ICAM-I и VCAM-I), проапоптотические лекарственные средства, мишенью которых являются миофибробласты, ингибиторы MMP (ингибиторы MMP2, MMP9 и MMP12) и ингибиторы TLR (антитела, специфические в отношении TIMP-1), но не ограничиваются ими.

В некоторых воплощениях антагонисты ActRIIB по описанию могут применяться в виде монотерапии для лечения пациента, которому это необходимо. В альтернативном варианте антагонисты ActRIIB могут применяться в комбинации со стандартными терапевтическими подходами, направленными на лечение или предупреждение пролиферативных расстройств, описанных в данном документе, включая, например, хирургическое вмешательство (например, спленэктомия), цитотоксические агенты, радиоте-

рапию, включая облучение или введение радиоактивных веществ, химиотерапевтические агенты, антигормональные агенты, задерживающие рост агенты, антинеопластические композиции, а также лечение противоопухолевыми агентами, перечисленными в данном описании и известными в области техники, или их комбинациями.

В целом, цитотоксический агент относится к веществу, подавляющему или предупреждающему функцию клеток и/или вызывающему разрушение клеток. Термин включает радиоактивные изотопы (например, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² и радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтические агенты (например, метотрексат, адриамицин, алкалоиды барвинка (винкристин, винбластин, этопозид), доксорубин, мелфалан, митомицин С, хлорамбуцил, даунорубин или другие интеркалирующие агенты, ферменты и их фрагменты, такие как нуклеолитические ферменты, антибиотики и токсины, такие как низкомолекулярные токсины или обладающие ферментативной активностью токсины бактерий, грибов, растений или животных, включая их фрагменты и/или варианты, и различные противоопухолевые или противораковые агенты, описанные ниже. Другие цитотоксические агенты описаны ниже. Туморцидный агент вызывает разрушение опухолевых клеток.

В целом, химиотерапевтический агент представляет собой химическое соединение, которое может найти применение в лечении рака. Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и цитоксан® циклофосамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфат, импросульфат и пипосульфат; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилендиофосфорамид и триметилмеламин; ацетогенины (в частности, буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, MARINOL®); бета-лапахон, лапахол; колхицины; бетулиновая кислота; камфотецин (включая синтетический аналог топотекан (HYCAMTIN®), CPT-11 (иринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамфотецин, скополектин и 9-аминокампотецин); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); подофиллотоксин; подофиллиновая кислота; тенипозид; криптофицины (особенно криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CBI-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, циклофосамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид оксида мехлорэтамина, мелфалан, новембицин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урацил-иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики такие как эндиинозные антибиотики (например, калихеамицин, особенно калихеамицин гамма 11 и калихеамицин омега 11 (см., например, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); динемистин, включая динемистин А; эсперамицин; а также неокарзиностагин хромофор и родственные хромопротеиновые хромофоры эндиинозных антибиотиков), аклациномизины, актиномицин, антрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубин, деторубин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, адриамицин® доксорубин (включая морфолино-доксорубин, цианоморфолино-доксорубин, 2-пирролино-доксорубин и дезоксидоксорубин), эпирубин, эзорубин, идарубин, марселломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пурамицин, квеламицин, родорубин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидеоксиуридин, доксифлуридин, энцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калуостерон, пропионат дромостанолона, эпнитостанол, мепитиостан, тестостерон; ингибиторы коры надпочечников, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; производные фолиевой кислоты, такие как фолиновая кислота; ацеглатон, альдофосфамид гликозид; аминолевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрон; эдатраксат; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; мейтансиноиды, такие как мейтансин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраерин; пентостатин; фенамет; пирарубин; лосоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенауазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндесин (элдизин®, филдесин®); дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); тиотепа; таксоиды, например, таксол® (паклитаксел; Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ.), абраксан™ (не содержащий Кремофор), альбуминовые нанокомпозиции паклитаксела (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), и таксотере® доксетаксел (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); хлорамбуцил; гемцитабин (гемзар®); 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин, винбластин (велбан®), платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин (онковин®); оксалиплатин; лейковорин; винорелбин (навелбин®); новантрон; эдатраксат; дауномицин; аминоптерин; ибандронат; ингибитор топоизомеразы

RFS 2000; диформетилорнитин (ДФАО); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин (кселода®); фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любых веществ из вышеперечисленных, а также комбинации двух или более веществ из вышеперечисленных, такие как СНОР, аббревиатура, обозначающая комбинированную терапию циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном, и FOLFOX, аббревиатура, обозначающая режим лечения оксалиплатином (элоксатин™) в комбинации с 5-фторурацилом и лейковорином.

Также включают антигормональные агенты, которые действуют, регулируя, снижая, блокируя или ингибируя влияние гормонов, которое может способствовать росту злокачественного новообразования, их часто применяют в виде системного воздействия или воздействия на весь организм. Они сами могут быть гормонами. Примеры включают в себя антиэстрогены и селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов (SERM), включая, например, тамоксифен (включая тамоксифен нолвадекс®), ралоксифен эвиста®, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен фарестон®; антипрогестероновые средства; негативные регуляторы эстрогеновых рецепторов (ERD); средства, функционирующие для супрессии или выключения яичников, например, агонисты релизинг-фактора лютеинизирующего гормона (LHRH), такие как лейпролида ацетат люпрон® и элигард®, гозерелина ацетат, бусерелина ацетат и триптерелин; другие антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид и бикалутамид и ингибиторы ароматазы, ингибирующие фермент ароматазу, регулирующую образование эстрогенов в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, мегестрола ацетат (мегаза®, экземестан аромазин®, форместан, фадрозол, ворозол ривизор®, летрозол фемара® и анастрозол аримидекс®. Кроме того, такое определение химиотерапевтических средств включает в себя бифосфонаты, такие как клодронат (например, бонепос® или остак®, этидронат дидрокал®, NE-58095, золедроновая кислота/золедронат зомета®, алендронат фосамакс®, памидронат аредиа®, тилудронат скелид® или ризедронат актонел®; а также троксацитабин (1,3-диоксолановый аналог нуклеозида цитозина); антисмысловые олигонуклеотиды, особенно те, которые ингибируют экспрессию генов в сигнальных путях, задействованных в нарушенной клеточной пролиферации, такие как, например, PKC-альфа, Raf, H-Ras и рецептор эпидермального фактора роста (EGF-R); вакцины, такие как вакцина тера-топ® и вакцины для генной терапии, например, вакцина алловектин®, вакцина леувектин и вакцина ваксид®; ингибитор топоизомеразы I луртотекан®; gmRN абареликс®; лапатиниба дитозилат (низкомолекулярный ингибитор двойной тирозинкиназы ErbB-2 и EGFR, также известный как GW572016) и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанного выше.

Агент, подавляющий рост, обычно относится к соединению или композиции, которая подавляет рост клетки *in vitro* или *in vivo*. Так, подавляющий рост агент может быть агентом, который существенно уменьшает процентное содержание клеток в S фазе. Примеры агентов, подавляющих рост, включают агенты, которые блокируют прохождение клеточного цикла (в состоянии, отличном от S фазы), такие агенты, как агенты, индуцирующие остановку в фазе G1 и фазе M). Классические блокаторы фазы M включают алкалоиды барвинка (винкристин и винбластин), таксаны и ингибиторы топоизомеразы II, такие как доксорубин, эпирубин, даунорубин, этопозид и блеомицин. Агенты, которые вызывают остановку в фазе G1, также вызывают остановку в фазе S, например, ДНК-алкилирующие агенты, такие как тамоксифен, преднизон, дакарбазин, мехлорэтамин, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил и ara-C. Дополнительную информацию можно найти в документе The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), в частности, с. 13. Таксаны (паклитаксел и доцетаксел) представляют собой противоопухолевые средства, оба из которых получены из тисового дерева. Доцетаксел (Таксотере®, Rhone -Poulenc Roger), полученный из европейского тиса, представляет собой полусинтетический аналог паклитаксела (таксол®, Bristol-Myers Squibb). Паклитаксел и доцетаксел способствуют сборке микротрубочек из димеров тубулина и стабилизируют микротрубочки, предотвращая деполимеризацию, что в результате приводит к подавлению митоза клеток.

Антагонист ActRIIB и дополнительное действующее вещество (например, совместно применяемый терапевтический агент) можно вводить в составе одной композиции или раздельно. В случае раздельного введения антагонист ActRIIB можно вводить перед, после или одновременно с дополнительным действующим веществом. Введение одного вещества может предшествовать введению или следовать за введением другого вещества с интервалами от нескольких минут до нескольких недель. В воплощениях, где субъекту раздельно вводят два или более терапевтических агентов разного типа, обычно следят за тем, чтобы между каждым введением не проходило значительное время, так чтобы эти агенты разных типов могли оказывать эффективное комбинированное влияние на ткани-мишени или клетки-мишени.

В некоторых воплощениях данного изобретения предложены способы ведения пациента, который получал лечение или который является кандидатом на лечение одним или более чем одним агентом антагонистом ActRIIB по изобретению с определением у пациента одного или более чем одного гематологического показателя. Гематологические показатели можно применять для оценки соответствующей дозировки для пациента, являющегося кандидатом на лечение антагонистом по данному изобретению, для наблюдения за гематологическими показателями в процессе лечения, для оценки необходимости подбора

дозы в ходе лечения одним или более чем одним антагонистом по изобретению и/или для оценки надлежащей поддерживающей дозы одного или более чем одного антагониста по изобретению. Если один или более чем один гематологический показатель находится за пределами нормального уровня, можно уменьшить дозу одного или более чем одного антагониста ActRIIB, отсрочить или прекратить введение.

Гематологические показатели, которые можно определять в соответствии с предложенными способами, включают, например, количество эритроцитов, артериальное давление, запасы железа и другие агенты, обнаруживаемые в жидкостях организма, коррелирующие с повышенным количеством эритроцитов, используя способы, признанные на уровне техники. Такие показатели можно определять, используя образец крови пациента. Увеличение количества эритроцитов, уровней гемоглобина и/или уровней гематокрита может вызывать нежелательное увеличение артериального давления.

В одном воплощении, если один или более чем один гематологический показатель находится за пределами нормального диапазона или на верхней границе нормы у пациента, являющегося кандидатом на лечение одним или более чем одним антагонистом ActRIIB, начало введения одного или более чем одного антагониста по описанию может быть отложено до тех пор, пока гематологические показатели не вернуться к нормальному или приемлемому уровню либо естественным образом, либо под воздействием терапевтического вмешательства. Например, если пациент-кандидат имеет гипертензию или прегипертензию, пациента можно лечить агентом, понижающим артериальное давление для снижения артериального давления пациента. Можно применять любой снижающий артериальное давление агент, подходящий для индивидуального состояния пациента, включая, например, диуретики, ингибиторы адренергических рецепторов (включая альфа-блокаторы и бета-блокаторы), вазодилататоры, блокаторы кальциевых каналов, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) или блокаторы рецепторов ангиотензина II. В альтернативном варианте артериальное давление можно контролировать с помощью диеты и физических упражнений. Аналогично, если у пациента-кандидата запасы железа ниже нормы или на нижней границе нормы, пациента можно лечить соответствующим режимом питания и/или железосодержащими добавками до тех пор, пока запасы железа в организме пациента не вернуться к нормальному или приемлемому уровню. Для пациентов, у которых количество эритроцитов и уровень гемоглобина выше нормы, введение одного или более чем одного антагониста по изобретению может быть отложено до тех пор, пока эти показатели не вернуться к нормальному или приемлемому уровню.

В некоторых воплощениях, если один или более чем один гематологический показатель находится за пределами нормального диапазона или на верхней границе нормы у пациента, являющегося кандидатом на лечение одним или более чем одним антагонистом ActRIIB, начало введения одного или более чем одного антагониста по описанию можно не откладывать. Однако величина дозы или частота введения одного или более чем одного антагониста по изобретению может быть установлена таким образом, чтобы снижать риск неприемлемого повышения гематологических показателей, возникающий при введении одного или более чем одного антагониста по изобретению. В альтернативном варианте для пациента можно разработать схему терапии, в которой один или более чем один антагонист ActRIIB комбинируют с терапевтическим агентом, направленным на нормализацию нежелательных значений гематологических показателей. Например, если у пациента повышенное артериальное давление, можно разработать схему терапии, включающую введение одного или более чем одного агента антагониста ActRIIB и агента, снижающего артериальное давление. Для пациента, имеющего запасы железа в организме ниже желательных, можно разработать схему терапии, включающую один или более чем один антагонист ActRIIB по изобретению и железосодержащую добавку.

В одном воплощении у пациента, являющегося кандидатом на лечение одним или более чем одним антагонистом ActRIIB по изобретению, устанавливают исходные значения одного или более чем одного гематологического показателя и на основании исходных значений разрабатывают подходящую пациенту схему введения. В альтернативном варианте исходные показатели, установленные на основании анамнеза пациента, можно использовать для информирования о подходящей пациенту схеме введения антагониста. Например, если установлено, что у здорового пациента исходные показатели артериального давления выше установленного нормального диапазона, может быть необязательным приводить артериальное давление пациента в диапазон, считающийся нормальным для общей популяции, перед лечением одним или более чем одним антагонистом по изобретению. Исходные значения одного или более чем одного гематологического показателя пациента до лечения одним или более чем одним антагонистом ActRIIB по изобретению можно использовать в качестве соответствующих значений для сравнения при отслеживании каких-либо изменений в гематологических показателях в ходе лечения одним или более чем одним антагонистом по изобретению.

В некоторых воплощениях один или более чем один гематологический показатель определяют у пациентов, которые получают лечение одним или более чем одним антагонистом ActRIIB. Гематологические показатели могут использоваться для наблюдения за пациентом в ходе лечения и позволяют корректировать или прекращать введение одного или более чем одного антагониста по изобретению или дополнительно вводить другой терапевтический агент. Например, если введение одного или более чем одного антагониста ActRIIB приводит к повышению артериального давления, количества эритроцитов или уровня гемоглобина или снижению запасов железа в организме, введение одного или более чем од-

ного антагониста по изобретению можно уменьшить по количеству или по частоте для уменьшения влияния одного или более чем одного антагониста по изобретению на один или более чем один гематологический показатель. Если введение одного или более чем одного антагонистов ActRIIB приводит к изменению одного или более чем одного гематологического показателя, которое является нежелательным для пациента, введение одного или более чем одного антагониста по изобретению может быть прекращено либо временно, до возврата гематологических показателей к приемлемому уровню, либо навсегда. Аналогично, если один или более чем один гематологический показатель не приходит в приемлемый диапазон при уменьшении дозы или частоты введения одного или более чем одного антагониста по изобретению, введение может быть прекращено. В альтернативном варианте или в качестве дополнения к уменьшению или прекращению введения одного или более чем одного антагониста по изобретению пациенту можно вводить дополнительный терапевтический агент, который направлен на нормализацию нежелательных значений гематологических показателей, например, такой как агент, снижающий артериальное давление, или железосодержащую добавку. Например, если пациент, получающий лечение одним или более чем одним антагонистом ActRIIB, имеет повышенное артериальное давление, введение одного или более чем одного антагониста по изобретению можно продолжить на том же уровне и в схему лечения добавлять агент, снижающий артериальное давление, введение одного или более чем одного антагониста по изобретению можно уменьшать (например, по количеству и/или по частоте) и в схему лечения добавлять агент, снижающий артериальное давление, или введение одного или более чем одного антагониста по изобретению можно прекращать и лечить пациента агентом, снижающим артериальное давление.

В данном документе термины "в комбинации с", "комбинации" или "совместное" введение относятся к любой форме введения, так что дополнительные терапевтические средства (например, второе, третье, четвертое и т.д.) по-прежнему оказываются эффективными в организме (например, множественные соединения одновременно эффективны у пациента, включая синергетическое влияние этих соединений). Эффективность может не коррелировать с измеряемой концентрацией агента в крови, сыворотке или плазме. Например, различные терапевтические соединения можно вводить либо в составе той же композиции, либо в составе разных композиций, одновременно или последовательно и согласно разным схемам. Таким образом, индивидуум, получающий такое лечение будет получать пользу от комбинированного влияния различных терапевтических средств. Один или более чем один антагонист ActRIIB или комбинации таких полипептидов по изобретению можно вводить одновременно, до или после введения одного или более чем одного дополнительного агента или проведения поддерживающих терапий. В целом, каждый терапевтический агент будет вводиться в дозе и/или по времени, установленным для этого конкретного агента. Конкретная комбинация, используемая в схеме, будет учитывать совместимость антагониста по данному изобретению с терапией и/или желаемым.

5. Фармацевтические композиции.

Терапевтические агенты, описанные в данном документе (например, антагонист ActRIIB), могут быть составлены в виде фармацевтических композиций. Фармацевтические композиции для применения по данному описанию могут быть составлены стандартным образом с применением одного или более физиологически приемлемых носителей или эксципиентов. Такие композиции будут по существу апирогенны, в соответствии с большинством нормативных требований.

В некоторых воплощениях терапевтический способ по описанию включает введение композиции системно или местно в виде импланта или устройства. При введении терапевтическая композиция для применения по данному описанию является апирогенной и находится в физиологически приемлемой форме. Терапевтически эффективные агенты, отличные от антагонистов сигнального пути ActRIIB, которые могут входить в состав композиции, как описано выше, можно вводить одновременно или последовательно с обсуждаемыми соединениями (например, полипептидами ActRIIB) в способах, описанных в данном документе.

Как правило, белковые терапевтические агенты по данному описанию будут вводиться парентерально и, в частности, внутривенно или подкожно. Фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, могут содержать один или более чем один антагонист ActRIIB в комбинации с одним или более чем одним фармацевтически приемлемым стерильным изотоническим водным или неводным раствором, дисперсией, суспензией или эмульсией либо стерильным порошком, из которых можно готовить стерильные растворы для инъекций или дисперсии непосредственно перед применением, которые могут содержать антиокислители, буферы, бактериостатические агенты, растворенные соединения, обеспечивающие изотоничность композиции с кровью предполагаемого реципиента, или суспендирующие агенты или загустители. Примеры подходящих водных или неводных носителей, которые можно применять в фармацевтических композициях по данному описанию, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Для поддержания надлежащей текучести можно, например, использовать покрытия, такие как лецитин, поддерживать необходимый размер частиц в случае дисперсий, а также применять поверхностно-активные вещества.

При необходимости композиции и составы можно помещать в упаковку или диспенсер, которые могут содержать одну или более однократных дозировок, содержащих активный ингредиент. Например,

упаковка может содержать металлическую фольгу или пластиковую пленку, например, как блистерная упаковка. Упаковка или диспенсер могут иметь сопроводительные инструкции по применению.

Кроме того, композиция может быть в инкапсулированной или инъекционной форме для доставки в целевой участок ткани. В некоторых воплощениях композиции по данному изобретению могут включать матрикс, способный доставлять одно или более чем одно терапевтически активное соединение (например, полипептидов ActRIIB) в целевой участок ткани, придавать структуру развивающейся ткани и, возможно, способный ресорбироваться организмом. Например, матрикс может обеспечивать медленное высвобождение антагониста ActRIIB. Такие матрицы могут быть образованы материалами, применяемыми в настоящее время для других имплантируемых медицинских средств.

Выбор материала матрикса базируется на биосовместимости, биodeградируемости, механических свойствах, внешнем виде и свойствах контактирующей поверхности. Конкретное применение обсуждаемых композиций будет определять необходимый состав. Возможными матрицами для композиций могут быть биodeградируемые и химически охарактеризованные сульфат кальция, трикальций фосфат, гидроксиапатит, полимолочная кислота и полиангидриды. Другие возможные материалы являются биodeградируемыми и биологически хорошо охарактеризованными, как кость или коллаген кожи. Другие матрицы состоят из чистых белков или компонентов внеклеточного матрикса. Другие возможные матрицы являются не-биodeградируемыми и химически охарактеризованными, как спеченный гидроксиапатит, биокерамика, алюминаты или другие виды керамики. Матрицы могут состоять из комбинаций любого из вышеупомянутых типов материала, таких как полимолочная кислота и гидроксиапатит или коллаген и трикальций фосфат. Биокерамики могут иметь модифицированный состав, например, как кальций-алюминат-фосфат и подвергаться обработке для изменения размера пор, размера частиц, формы частиц и биodeградируемости.

В некоторых воплощениях способы по изобретению предусматривают пероральное введение, например, в форме капсул, саше, пилюль, таблеток, леденцов (с применением ароматизированной основы, обычно сахарозы, камеди или трагаканта), порошков, гранул или в форме растворов или суспензий в водной или неводной жидкости, или в форме эмульсий масло-в-воде или вода-в-масле, или в форме эликсира или сиропа, или в форме пастилок (с применением инертной основы, такой как желатин или глицерин, или сахарозы и камеди) и/или в форме ополаскивателей для рта и т.п., каждое из которых содержит заданное количество агента в качестве активного ингредиента. Агент также можно вводить в виде боллуса, электуария или пасты.

В твердых лекарственных формах для перорального приема (капсул, таблеток, пилюль, драже, порошков, гранул и т.п.) одно или более чем одно терапевтически активное соединение по данному изобретению может быть смешано с одним или более чем одним фармацевтически приемлемым носителем, таким как натрия цитрат или дикальция фосфат и/или любым из следующего: (1) наполнителей или увеличителей объема, таких как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; (2) связывающих веществ, например, таких как карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или камедь; (3) увлажняющих веществ, таких как глицерин; (4) разрыхлителей, таких как агар-агар, карбонат кальция, картофельный крахмал или крахмал тапиоки, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия; (5) замедляющих растворение веществ, таких как парафин; (6) ускоряющих абсорбцию веществ, таких как четвертичные аммониевые соединения; (7) смачивающих веществ, например, таких как цетиловый спирт и глицеролмоноостеарат; (8) абсорбентов, таких как каолин и бентонитовая глина; (9) смазывающих веществ, таких как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси и (10) красителей. В случае капсул, таблеток и пилюль фармацевтические композиции могут также содержать буферные агенты. Твердые композиции схожего типа можно также использовать в качестве наполнителей в мягких и твердых желатиновых капсулах с применением таких эксципиентов как лактоза или молочные сахара, а также высокомолекулярных полиэтиленгликолей и т.п.

Жидкие лекарственные формы для перорального приема включают фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. Помимо активного ингредиента жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно используемые в области техники, такие как вода или другие растворители, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, семян хлопка, земляного ореха, кукурузы, проростков, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и эфиры жирных кислот и сорбитана и их смеси. Кроме инертных разбавителей, композиции для перорального приема могут также содержать такие адьюванты, как смачивающие вещества, эмульгирующие вещества и суспендирующие вещества, подсластители, корригенты, красители, ароматизаторы и консерванты.

Суспензии, помимо активных соединений, могут содержать суспендирующие агенты, такие как этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтилен сорбит и эфиры сорбитана, микрокристаллическую целлюлозу, алюминия метагидроксид, бентонит, агар-агар и трагакант и их смеси.

Композиции по изобретению могут также содержать адьюванты, такие как консерванты, смачивающие вещества, эмульгирующие вещества и диспергирующие вещества. Действие микроорганизмов

предупреждают путем включения различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и т.п. Также может быть желательным включение в композиции изотонических агентов, таких как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, пролонгированная абсорбция инъекционных фармацевтических форм может достигаться благодаря включению агентов, которые замедляют абсорбцию, таких как алюминия моностеарат и желатин.

Понятно, что схема введения будет определяться лечащим врачом, с учетом различных факторов, которые модифицируют действие обсуждаемых соединений по изобретению (например, полипептидов TrPII). Различные факторы включают возраст пациента, пол и диету, тяжесть заболевания, время введения и другие клинические факторы, не ограничиваясь перечисленным. Возможно, дозировка будет варьировать в зависимости от матрицы, используемой для растворения, и типов соединений в композиции. Добавление в конечную композицию других известных факторов роста также может влиять на дозировку. За состоянием можно наблюдать, периодически оценивая рост и/или восстановление кости, например, при помощи рентгенологического исследования (включая двухэнергетическую рентгеновскую абсорбциометрию), гистоморфометрические исследования и мечение тетрациклином.

В некоторых воплощениях данного изобретения также предложена генная терапия для продукции антагониста ActRIIB *in vivo*. Лечебный эффект такой терапии будет достигаться благодаря введению полинуклеотидных последовательностей ActRIIB в клетки или ткани, имеющие нарушения, согласно описанию выше. Доставка полинуклеотидных последовательностей ActRIIB может осуществляться с помощью рекомбинантного экспрессирующего вектора, такого как химерный вирус, или коллоидной дисперсионной системы. Предпочтительным для терапевтической доставки полинуклеотидных последовательностей ActRIIB является применение специфических липосом.

Различные векторы на основе вируса, которые могут применяться для генной терапии по данному описанию, включают аденовирус, вирус герпеса, вирус осповакцины или, предпочтительно, РНК-вирус, такой как ретровирус. Предпочтительно, ретровирусный вектор является производным ретровируса грызуна или птицы. Примеры ретровирусных векторов, в которые можно встраивать единственный чужеродный ген, включают, без ограничения: Вирус мышинного лейкоза Молони (MoMuLV), вирус саркомы мышей Харви (HaMuSV), вирус опухоли молочной железы мыши (MuMTV) и вирус саркомы Рауса (RSV). Ряд дополнительных ретровирусных векторов может включать множество генов. Все эти векторы могут переносить или включать в себя ген для селективируемого маркера, так что трансдуцированные клетки можно обнаруживать и производить. Ретровирусные векторы могут быть специфичными к мишени благодаря присоединению, например, сахара, гликолипида или белка. Предпочтительное нацеливание на мишень достигается с помощью антитела. Специалистам в области техники понятно, что специфические полинуклеотидные последовательности могут быть встроены в геном ретровируса или присоединены к оболочке вируса, обеспечивая специфическую доставку ретровирусного вектора, содержащего полинуклеотид ActRIIB. В предпочтительном воплощении вектор нацелен на кость или хрящ.

В альтернативном варианте клетки культуры тканей можно непосредственно трансфицировать плазмидами, кодирующими структурные гены ретровируса *gag*, *pol* и *env*, при помощи стандартной кальций-фосфатной трансфекции. Затем эти клетки трансфицируют плазмидным вектором, содержащим гены, представляющие интерес. Полученные клетки высвобождают ретровирусный вектор в культуральную среду.

Другой системой направленной доставки полинуклеотидов антагониста ActRIIB является коллоидная дисперсная система. Коллоидные дисперсные системы включают комплекс макромолекул, нанокapsулы, микросферы, частицы и системы на основе липидов, включая эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Предпочтительной коллоидной системой по данному изобретению является липосома. Липосомы представляют собой мембранные везикулы искусственного происхождения, которые можно применять в качестве носителей для доставки *in vitro* и *in vivo*. РНК, ДНК и интактные вирионы можно инкапсулировать в водную внутреннюю среду и доставлять к клеткам в биологически активной форме (см., например, Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). В области техники известны способы для эффективного переноса генов с применением липосом в качестве носителей, см., например, Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988. Состав липосом обычно представляет собой комбинацию фосфолипидов, обычно в комбинации со стероидами, в частности, с холестерином. Также можно использовать и другие фосфолипиды или другие липиды. Физические характеристики липосом зависят от pH, ионной силы и присутствия двухвалентных катионов.

Примеры липидов, которые могут применяться в производстве липосом, включают фосфатидильные соединения, такие как фосфатидилглицерин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтанолламин, сфинголипиды, цереброзиды и ганглиозиды. Иллюстративные примеры фосфолипидов включают фосфатидилхолин яйца, дипальмитоилфосфатидилхолин и дистеароилфосфатидилхолин. Направленная доставка липосом также возможна, например, по принципу органоспецифичности, клеточной специфичности и специфичности к органеллам, и известна в области техники.

В описании приведены композиции, которые могут варьировать вследствие включения кислот и оснований для доведения pH, а также буферные агенты для поддержания pH в узком диапазоне.

Примеры осуществления изобретения

Лучше понять изобретение, описанное выше в общих чертах, позволят примеры, приведенные ниже, которые включены исключительно с целью иллюстрации некоторых воплощений данного изобретения и не предназначены для ограничения изобретения.

Пример 1. Создание слитых белков ActRIIB-Fc.

Заявители сконструировали слитый белок ActRIIB, имеющий внеклеточный домен человеческого ActRIIB, слитый с человеческим или мышинным доменом Fc с минимальным линкером (три аминокислоты глицин) между ними. Конструкции обозначили ActRIIB-hFc и ActRIIB-Fc, соответственно.

ActRIIB-hFc, приведенный ниже, выделяли из клеток линии CHO (SEQ ID NO: 24)

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGC
WLDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGG
GTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVIPIETISK
AKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
LDSIDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Белки ActRIIB-hFc и ActRIIB-Fc экспрессировали в клеточной линии CHO. Рассматривались три различные лидерные последовательности: меллитина медоносной пчелы (HBML): MKFLVN-VALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 21), ii) тканевого активатора плазминогена (TPA): MDAMKRG-LCCVLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 22) и (iii) нативная: MGAAAKLAFVFLISCSGA (SEQ ID NO: 23).

Выбранная форма имеет лидерную последовательность TPA и имеет следующую непрочищенную аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 25)

MDAMKRG-LCCVLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGE
QDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFC
NERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVIINAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKEYKCKVSNKALPVIPIETISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

Указанный полипептид кодируется следующей нуклеиновокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 26)

A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA
 GTCTTCGTTT CGCCCGGCGC CTCTGGGCGT GGGGAGGCTG AGACACGGGA
 GTGCATCTAC TACAACGCCA ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACCAGAGCG
 GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA AGCGGCTGCA CTGCTACGCC
 TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA AGGGCTGCTG
 GCTAGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG
 AGAACCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG
 CGCTTCACTC ATTTGCCAGA GGCTGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC
 ACCCCCGACA GCCCCACCG GTGGTGAAC TCACACATGC CCACCGTGC
 CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCAAAA
 CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT
 GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTCAAC TGGTACGTGG
 ACGGCGTGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC
 AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG
 GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG
 TCCCATCGA GAAAACATC TCCAAAGCCA AAGGCAGCC CCGAGAACA
 CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGAG GAGATGACCA AGAACAGGT
 CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG
 AGTGGGAGAG CAATGGGAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC
 GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTCTCTCCTC TATAGCAAGC TCACCGTGG
 CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCT CTCATGCTCC GTGATGCATG
 AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT
 AAATGA

N-концевое секвенирование произведенного клетками CHO материала выявило главную последовательность -GRGEAE (SEQ ID NO: 27). Следует отметить, что конструкции, описанные в литературе, начинаются последовательностью -SGR...

Очистку можно осуществлять в серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующего, в любой последовательности: хроматографию с белком А, хроматографию на Q-сефарозе, хроматографию на фенолсефарозе, эксклюзионную хроматографию и катионообменную хроматографию. Очистка может завершаться фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Слитые белки ActRIIB-Fc также экспрессировали в клетках HEK293 и клетках COS. Хотя материал из всех клеточных линий и подходящие условия культивирования позволяли получить белок, обладающий *in vivo* активностью, обеспечивающей наращивание мышечной массы, его действенность варьировала, возможно в связи с выбором клеточной линии и/или условий культивирования.

Заявители создали серию мутаций во внеклеточном домене ActRIIB и получили эти мутантные белки в виде растворимых белков, слитых между внеклеточным доменом ActRIIB и Fc доменом. Слитый белок ActRIIB-Fc имеет последовательность SEQ ID NO: 24.

Белок ActRIIB-Fc подвергали различным мутациям, включая усечение по N- и C-концу. На основании представленных данных предполагают, что у этих конструкций при экспрессии с лидерной последовательностью TPA, будет отсутствовать N-концевой серии. Мутации во внеклеточном домене ActRIIB были получены в результате мутагенеза посредством PCR. После PCR фрагменты очищали на колонках Qiagen, расщепляли SfoI и AgeI и очищали посредством электрофореза в геле. Указанные фрагменты лигировали в экспрессирующий вектор pAID4 (см. WO2006/012627) так чтобы после лигирования они образовывали слитый химерный белок с человеческим IgG1. После трансформации E. coli DH5 альфа выбирали отдельные колонии и выделяли ДНК. У мышиных конструкций (mFc), человеческий IgG1 заменяли мышинным IgG2a. Последовательности всех мутантов верифицировали.

Все мутанты получали в результате транзиторной трансфекции клеток HEK293T. Вкратце, клетки HEK293T в концентрации 6×10^5 клеток/мл в среде Freestyle (Invitrogen) в объеме 250 мл выращивали в течение ночи в 500 мл флаконах с постоянным перемешиванием. На следующий день к клеткам добавляли комплекс ДНК:ПЭИ (1:1) до конечной концентрации ДНК 0,5 мкг/мл. Через 4 ч добавляли 250 мл среды и культивировали клетки в течение 7 суток. Кондиционированную среду собирали центрифугированием клеток и концентрировали.

Мутанты выделяли различными способами, включая, например, хроматографию на колонке с белком А и элюировали глициновым буфером с низким рН (3,0). После нейтрализации их диализовали против PBS.

Мутанты также продуцировали в клетках CHO аналогичным способом. Проводили исследования мутантов в анализах связывания и/или биоанализах, описанных в WO 2008/097541 и WO 2006/012627, включенных путем ссылки. В некоторых случаях проводили анализ с кондиционированной средой, а не с очищенными белками. Дополнительные варианты ActRIIB описаны в патент US 7842663.

Заявитель получил слитый белок ActRIIB(25-131)-hFc, который содержит внеклеточный домен человеческого ActRIIB, усеченный по N-концу и C-концу (остатки 25-131 нативного белка SEQ ID NO: 1), слитый N-концом с лидерной последовательностью TPA, замещающей нативную лидерную последовательность ActRIIB и C-концом с человеческим Fc доменом посредством минимального линкера (три остатка глицина) (фиг. 12). Нуклеотидная последовательность, кодирующая указанный слитый белок, приведена на фиг. 13. Заявитель модифицировал кодоны и обнаружил вариант нуклеиновой кислоты, кодирующей белок ActRIIB (25-131)-hFc, который обеспечивал существенное улучшение уровней экспрессии первоначальных трансформантов (фиг. 14).

Зрелый белок имеет следующую аминокислотную последовательность (N-конец верифицирован посредством N-концевого секвенирования) (SEQ ID NO: 28)

ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
KGCWLDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
TYEPPPTGGG THTCPCPCAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
WLNKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV
DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTEQKLSLSPGK

Аминокислоты 1-107 происходят из ActRIIB.

Экспрессированную молекулу очищали в серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующего, в любой последовательности: хроматографию с белком А, хроматографию на Q-сефарозе, хроматографию на фенолсефарозе, эксклюзионную хроматографию и катионообменную хроматографию. Очистка могла завершаться фильтрацией вирусов и заменой буфера.

Аффинность нескольких лигандов ActRIIB(25-131)-hFc и его полноразмерного аналога ActRIIB(20-134)-hFc оценивали при помощи биосенсора Biacore™, результаты обобщены в таблице, приведенной ниже. Рассчитывали значения равновесной константы Kd, поскольку очень быстрая ассоциация и диссоциация комплекса не позволяла точно определить k_{on} и k_{off} . ActRIIB(25-131)-hFc связывал активин А, активин В и GDF11 с высокой аффинностью.

Аффинность форм ActRIIB-hFc к лигандам

Слитая конструкция	Активин А (e-11)	Активин В (e-11)	GDF11 (e-11)
ActRIIB(20-134)-hFc	1,6	1,2	3,6
ActRIIB(25-131)-hFc	1,8	1,2	3,1

Пример 2. Создание ловушки GDF.

Заявитель сконструировал ловушку GDF следующим образом. Полипептид, имеющий модифицированный внеклеточный домен ActRIIB (аминокислоты 20-134 SEQ ID NO: 1 с заменой L79D), обладающий существенно меньшим связыванием с активином А по сравнению с GDF11 и/или миостатином (вследствие замены лейцина на аспарат в положении 79 SEQ ID NO:1) был слит с человеческим или мышинным Fc доменом с минимальным линкером (три аминокислоты глицин) между ними. Конструкции

обозначили ActRIIB(L79D 20-134)-hFc и ActRIIB(L79D 20-134)-Fc, соответственно. Альтернативные формы с глутаматом вместо аспартата в положении 79 (L79E) демонстрировали схожие характеристики. Также были созданы альтернативные формы с аланином вместо валина в положении 226 относительно SEQ ID NO: 44, приведенные ниже, которые оказались эквивалентными во всех отношениях. Аспартат в положении 79 (относительно SEQ ID NO: 1, или в положении 60 относительно SEQ ID NO: 29) указан двойным подчеркиванием снизу. Валин в положении 226 относительно SEQ ID NO: 29 также указан двойным подчеркиванием снизу.

Ловушка GDF ActRIIB(L79D 20-134)-hFc, которую выделяли из клеток линии CHO, показана ниже (SEQ ID NO: 29).

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGC
 WDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTG
 GGTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPPIEKTIS
 KAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
 VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Часть ловушки GDF, происходящая от ActRIIB, имеет аминокислотную последовательность, показанную ниже (SEQ ID NO: 30), и эта часть могла быть использована в виде мономера или в виде белка, не слитого с Fc, в виде мономера, димера или комплекса более высокого порядка.

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELV
 KKGCVDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPT
 APT (SEQ ID NO: 30)

Белок-ловушка GDF экспрессировался в клетках линии CHO. Рассматривались три различные лидерные последовательности:

(i) меллитина медоносной пчелы (HBML), (ii) тканевого активатора плазминогена (TPA) и (iii) нативная.

Выбранная форма имеет лидерную последовательность TPA и имеет следующую непроцессионную аминокислотную последовательность:

MDAMKRGLCCVLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGE
 QDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFC
 NERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTGGGHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDLMISR
 TPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNKEYKCKVSNKALPPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFCFSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 31)

Указанный полипептид кодируется следующей нуклеиновокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 32)

A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA
 GTCTTCGTTT CGCCCGGCGC CTCTGGGCGT GGGGAGGCTG AGACACGGGA
 GTGCATCTAC TACAACGCCA ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACACAGAGCG
 GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA AGCGGCTGCA CTGCTACGCC
 TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA AGGGCTGCTG
 GGACGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG
 AGAACCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG
 CGCTTCACTC ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC
 ACCCCGACA GCCCCACCG GTGGTGAAC TCACACATGC CCACCGTGC
 CAGCACCTGA ACTCTGGGG GGACCGTCAG TCTTCTCTT CCCCCAAAA
 CCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT
 GGTGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG
 ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC
 AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG
 GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG
 TCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA
 CAGGTGTACA CCCTGCCCC ATCCCGGAG GAGATGACCA AGAACCAGGT
 CAGCCTGACC TGCTGGTCA AAGGCTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG
 AGTGGGAGAG CAATGGGAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCTCC
 GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTCTTCTCTC TATAGCAAGC TCACCGTGG
 CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG
 AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT
 AAATGA

Очистку можно осуществлять в серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующего, в любой последовательности: хроматографию с белком А, хроматографию на Q-сефарозе, хроматографию на фенолсефарозе, эксклюзионную хроматографию и катионообменную хроматографию. Очистка могла завершаться фильтрацией вирусов и заменой буфера. В приведенной в качестве примера схеме очистки культуральную среду пропускали через колонку с белком А, промывали 150 mM Tris/NaCl (pH 8,0), затем промывали 50 mM Tris/NaCl (pH 8,0) и элюировали 0,1 M глицином,

pH 3,0. Элюат с низким значением pH оставляли при комнатной температуре на 30 минут в качестве стадии очищения от вируса. Затем элюат нейтрализовали и пропускали через ионообменную колонку с Q-сефарозой и промывали 50 mM Tris pH 8,0, 50 mM NaCl и элюировали 50 mM Tris pH 8,0 с концентрацией NaCl от 150 mM до 300 mM. Затем буфер элюата заменяли на 50 mM Tris pH 8,0, 1,1 M сульфат аммония и пропускали через колонку с фенил-сефарозой, и элюировали 50 mM Tris pH 8,0 с сульфатом аммония от 150 до 300 mM. Элюат диализировали и фильтровали для применения.

Дополнительные ловушки GDF (слитые белки ActRIIB-Fc, модифицированные с целью снижения связывания активина А по отношению к связыванию миостатина или GDF11) описаны в WO 2008/097541 и WO 2006/012627, включенных путем ссылки.

Пример 3. Биологическое исследование передачи сигнала, опосредованного GDF-11 и активинном.

Для оценки влияния белков ActRIIB-Fc и ловушек GDF на передачу сигнала GDF-11 и активина А проводили исследование на клетках А-204 с использованием гена-репортера. Клеточная линия: клетки рабдомиосаркомы человека (из мышцы). Вектор репортер: pGL3(CAGA)12 (описанный Drenth et al, 1998, EMBO 17: 3091-3100). Мотив CAGA12 присутствует в TGF-бета-зависимых генах (например, в гене PAI-1), поэтому указанный вектор обычно применяют для факторов, у которых в сигнальном пути задействованы SMAD2 и 3.

1 сутки: высаживают клетки А-204 в 48-луночный планшет.

2 сутки: трансфицируют клетки А-204 10 мкг pGL3(CAGA)12 или pGL3(CAGA)12(10 мкг) + pRLCMV (1 мкг) с помощью Fugene.

3 сутки: добавляют факторы (разведенные в среде + 0,1% БСА). Ингибиторы необходимо предварительно инкубировать с факторами в течение 1 ч перед добавлением к клеткам. Через шесть часов клетки промывают PBS и лизируют.

Затем проводят анализ люциферазы. В отсутствие каких-либо ингибиторов активин А демонстрировал 10-кратную активацию экспрессии гена-репортера и ED50 ~ 2 нг/мл. GDF-11: 16-кратная активация, ED50 ~ 1,5 нг/мл.

В данном анализе ActRIIB(20-134) является мощным ингибитором активина А, GDF-8 и GDF-11. Как описано ниже, в данном анализе также исследовали варианты ActRIIB.

Пример 4. Варианты ActRIIB-Fc, активность в исследовании на клетках.

Активность белков ActRIIB-Fc и ловушек GDF исследовали на клетках, как описано ниже. Результаты представлены в таблице ниже. Некоторые варианты исследовали в различных конструкциях с усеченным С-концом. Как обсуждается выше, отсечение пяти или пятнадцати аминокислот приводило к снижению активности. Ловушки GDF (варианты L79D и L79E) демонстрировали существенное снижение ингибирования активина А при сохранении ингибирования GDF-11 по существу на уровне дикого типа.

Связывание растворимого ActRIIB-Fc с GDF11 и активинном А.

Варианты ActRIIB-Fc	Части ActRIIB (соответствуют аминокислотам SEQ ID NO:1)	Активность ингибирования GDF11	Активность ингибирования активина
R64	20-134	+++ (прибл. 10^{-8} M K _i)	+++ (прибл. 10^{-8} M K _i)
A64	20-134	+ (прибл. 10^{-6} M K _i)	+ (прибл. 10^{-6} M K _i)
R64	20-129	+++	+++
R64 K74A	20-134	++++	++++
R64 A24N	20-134	+++	+++
R64 A24N	20-119	++	++
R64 A24N K74A	20-119	+	+
R64 L79P	20-134	+	+
R64 L79P K74A	20-134	+	+
R64 L79D	20-134	+++	+
R64 L79E	20-134	+++	+
R64K	20-134	+++	+++
R64K	20-129	+++	+++
R64 P129S P130A	20-134	+++	+++
R64N	20-134	+	+

+ Низкая активность (приблизительно 1×10^{-6} K_i),

++ умеренная активность (приблизительно 1×10^{-7} K_i),

+++ хорошая активность (дикого типа) (приблизительно 1×10^{-8} K_i),

++++ активность, превосходящая таковую дикого типа.

У нескольких вариантов исследовали время полужизни в сыворотке крыс. Время полужизни ActRIIB(20-134)-Fc в сыворотке составляет приблизительно 70 ч. Время полужизни ActRIIB(A24N 20-134)-Fc в сыворотке составляет приблизительно 100-150 ч. Любой из вариантов, исследованных выше, можно комбинировать с молекулами ловушками GDF.

Пример 5. Связывание GDF-11 и активина А.

Связывание некоторых белков ActRIIB-Fc и ловушек GDF с лигандами исследовали на биосенсоре Biacore™.

Иммобилизацию вариантов ActRIIB-Fc или белка дикого типа в системе осуществляли с помощью антитела к hFc. Лиганды инжесктировали и пропускали по поверхности иммобилизованных белков рецепторов. Результаты представлены в таблицах ниже.

Специфичность связывания лигандов вариантов ИВ.

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

Эти данные, полученные в бесклеточном исследовании, подтвердили результаты исследования на клетках, демонстрирующие, что вариант A24N сохраняет лиганд-связывающую активность, аналогичную таковой молекулы ActRIIB(20-134)-hFc и что молекула L79D или L79E сохраняет связывание с мио-статином и GDF11, однако демонстрирует существенное снижение связывания (неопределяемое связывание) с активинном А.

Создавали и исследовали другие варианты, как описано в WO2006/012627 (включенном во всей полноте путем ссылки); см., например, с. 59-60, используя лиганды, иммобилизованные на устройстве, и пропуская рецептор по поверхности иммобилизованных лигандов. Следует отметить, что K74Y, K74F, K74I (и предположительно другие гидрофобные замещения в положении K74, такие как K74L) и D80I, приводят к снижению отношения связывания активина А (ActA) к связыванию GDF11 по сравнению с молекулой дикого типа K74. Таблица с данными, относящимися к указанным вариантам, приведена ниже.

Связывание растворимых вариантов ActRIIB-Fc с GDF11 и активинном А (исследование на биосенсоре Biacore™).

ActRIIB	ActA	GDF11
WT (64A)	KD=1,8e-7M (+)	KD= 2,6e-7M (+)
WT (64R)	нд	KD= 8,6e-8M (+++)
+15хвост	KD ~2,6 e-8M (+++)	KD= 1,9e-8M (++++)
E37A	*	*
R40A	-	-

D54A	-	*
K55A	++	*
R56A	*	*
K74A	KD=4,35e-9 M +++++	KD=5,3e-9M +++++
K74Y	*	--
K74F	*	--
K74I	*	--
W78A	*	*
L79A	+	*
D80K	*	*
D80R	*	*
D80A	*	*
D80F	*	*
D80G	*	*
D80M	*	*
D80N	*	*
D80I	*	--
F82A	++	-

* Связывание не наблюдалось,
 -- связывание <1/5 дикого типа,
 - связывание ~1/2 дикого типа,
 + дикий тип,
 ++ усиление связывания < 2х,
 +++ усиление связывания ~5х,
 ++++ усиление связывания ~10х,
 +++++ усиление связывания ~40х.

Пример 6. Создание ловушки GDF с усеченным внеклеточным доменом ActRIIB.

Ловушка GDF, обозначенная ActRIIB(L79D 20-134)-hFc, была создана путем слияния внеклеточного домена ActRIIB (остатки 20-134 в SEQ ID NO:1), содержащего замену лейцина на аспарагин (по остатку 79 в SEQ ID NO:1), N-концом с лидерной последовательностью TPA и C-концом с человеческим Fc доменом опосредовано через минимальный линкер (три остатка глицина) (фиг. 3). Нуклеотидная последовательность, соответствующая указанному слитому белку, приведена на фиг. 4.

Ловушка GDF с усеченным внеклеточным доменом ActRIIB, обозначенная ActRIIB(L79D 25-131)-hFc, была создана посредством слияния усеченного внеклеточного домена (остатки 25-131 в SEQ ID NO:1), содержащего замену лейцина на аспарат (по остатку 79 в SEQ ID NO:1), N-концом с лидерной последовательностью TPA и C-концом с человеческим Fc доменом опосредовано через минимальный линкер (три остатка глицина) (фиг. 5, SEQ ID NO: 50). Одна нуклеотидная последовательность, кодирующая указанный слитый белок приведена на фиг. 6 SEQ ID NO: 51, а альтернативная нуклеотидная последовательность, кодирующая тот же самый слитый белок, приведена на фиг. 9 (SEQ ID NO: 55).

Пример 7. Селективное связывание лиганда ловушкой GDF с дважды усеченным внеклеточным доменом ActRIIB.

Аффинность ловушек GDF и других белков ActRIIB-hFc к нескольким лигандам оценивали *in vitro* с применением биосенсора Biacore™. Результаты представлены в таблице ниже. Рассчитывали значения равновесной константы Kd, поскольку очень быстрая ассоциация и диссоциация комплекса не позволяла точно определить k_{on} и k_{off} .

Селективность вариантов ActRIIB-hFc в отношении лиганда

Слитая конструкция	Активин А (Kd e-11)	Активин В (Kd e-11)	GDF11 (Kd e-11)
ActRIIB(L79 20-134)-hFc	1,6	1,2	3,6
ActRIIB(L79D 20-134)-hFc	1350,0	78,8	12,3
ActRIIB(L79 25-131)-hFc	1,8	1,2	3,1
ActRIIB(L79D 25-131)-hFc	2290,0	62,1	7,4

Ловушка GDF с усеченным внеклеточным доменом ActRIIB(L79D 25-131)-hFc имела равную или превосходящую селективность к лиганду по сравнению с той, что демонстрировал более длинный вариант ActRIIB(L79D 20-134)-hFc, с выраженным уменьшением связывания активина А, частичной потерей связывания активина В и почти полным сохранением связывания GDF11 по сравнению с ActRIIB-hFc, не имеющими замены L79D. Следует отметить, что само по себе усечение (без замещения L79D) существенным образом не влияло на селективность перечисленных лигандов [при сравнении ActRIIB(L79 25-131)-hFc и ActRIIB(L79 20-134)-hFc]. ActRIIB(L79D 25-131)-hFc также сохранял связывание от выраженного до промежуточного с GDF8, лигандом сигнального пути Smad 2/3 и лигандами BMP6 и BMP10 сигнального пути Smad 1/5/8.

Пример 8. Ловушка GDF производная ActRIIB 5.

Другие исследователи описали альтернативную растворимую форму ActRIIB (обозначенную ActRIIB5), в которой экзон 4, включая трансмембранный домен ActRIIB, был замещен другой C-концевой последовательностью (см., например, WO 2007/053775).

Ниже приведена последовательность нативного ActRIIB5 без его лидерной последовательности

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWLDLDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGGSGALWLCLEGPAHE (SEQ ID NO 33)

Замена лейцина на аспаратат или другие замены на отрицательно заряженную аминокислоту могут быть осуществлены в нативном положении 79 (подчеркнута), согласно описанию, для конструирования варианта ActRIIB5(L79D), имеющего следующую последовательность

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWLDLDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGGSGALWLCLEGPAHE (SEQ ID NO 34)

Указанный вариант может быть соединен с человеческим Fc (двойное подчеркивание) посредством линкера TGGG (одинарное подчеркивание) с получением слитого белка человеческого ActRIIB5(L79D)-hFc, имеющего следующую последовательность

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK
KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEGPWAST
TIPSGGPEATAAAGDQGGSGALWLCLEGPAHETGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
EPKPKDTLMISRTPETVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYITLP
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTKSLSLSPGK (SEQ ID NO 35)

Данная конструкция может экспрессироваться в клетках CHO.

Пример 9. Влияние ловушки GDF на модели на животных JAK2V617F.

Для понимания влияния ActRIIB(L79D 25-131)-Fc на миелофиброз использовали трансгенную мышшь с мутацией JAK2V617F [линия А, описанная Xing et al. (2008) Blood 111: 5109-5117].

Чтобы понять начало и прогрессирование заболевания миелофиброзом сравнивали показатели развернутого анализа крови и степень фиброза у мышшей JAK2V617F разного возраста с данными, полученными у контрольных животных (мышь дикого типа сопоставимого возраста). Количество эритроцитов (RBC) и тромбоцитов у мышшей JAK2V617F всех возрастов были повышены по сравнению с диким типом, с тенденцией к повышению у мутантных животных между 2 и 5 месяцев с последующим снижением между 8 и 12 месяцев. Фиброз костного мозга обнаруживали у мышшей JAK2V617F, начиная приблизительно с 5 месяцев, с возрастом он ухудшался. У мышшей JAK2V617F также наблюдалась спленомегалия приблизительно с 3-4 месяца, которая также ухудшалась с возрастом.

Для исследования ловушки GDF лечение начинали в возрасте 12 месяцев, что соответствовало поздней стадии миелофиброза. Мышей делили на две группы: i) лечение мышшей JAK2V617F с использованием ActRIIB(L79D 25-131)-Fc по схеме введения 10 мг/кг дважды в неделю и ii) лечение мышшей JAK2V617F носителем (TBS) дважды в неделю (т.е. контрольные животные). Спустя 10 недель у животных, получавших ActRIIB(L79D 25-131)-Fc, наблюдалось уменьшение размеров селезенки (-12,5%) по сравнению с контрольными животными. С данным наблюдением согласовывались данные гистопатологических исследований, выявивших снижение экстрамедуллярного гемопоэза в селезенках мышшей, получавших ActRIIB(L79D 25-131)-Fc, по сравнению с контрольными животными. Гистопатологические исследования также демонстрировало снижение фиброза костного мозга у мышшей, получавших ActRIIB(L79D 25-131)-Fc, по сравнению с контрольными животными.

Соответственно, лечение ловушкой GDF является эффективным для улучшения различных осложнений миелофиброза на указанной модели JAK2V617F, в частности уменьшения спленомегалии, экстрамедуллярного гемопоэза и фиброза. Так, приведенные данные указывают, что антагонисты ActRIIB можно применять для лечения миелофиброза. Например, антагонисты ActRIIB особенно эффективны в лечении различных осложнений миелофиброза, включая, например, уменьшение спленомегалии, уменьшение экстрамедуллярного гемопоэза, увеличение количества эритроцитов и/или уменьшение фиброза (например, фиброза костного мозга).

Пример 10. Влияние ловушки GDF на животных, получавших руксолитиниб.

Руксолитиниб представляет собой ингибитор Янус-киназы, одобренный для лечения миелофиброза у пациентов группы промежуточного или высокого риска. В частности, руксолитиниб обладает выраженным эффектом в виде снижения размеров селезенки и улучшения симптомов, ассоциированных со спленомегалией у пациентов, страдающих миелофиброзом. Однако, у пациентов, получавших лечение руксолитинибом, наблюдались различные побочные эффекты со стороны крови, например, анемия. Для понимания эффектов лечения ActRIIB(L79D 25-131)-Fc на различные гематологические показатели у мышшей, получавших руксолитиниб, использовали мышшь C57BL/6 в возрасте девяти месяцев.

В данном исследовании лечение начинали в возрасте 6-7 месяцев. Мышей делили на четыре группы: i) лечение мышшей ActRIIB(L79D 25-131)-Fc по схеме введения 10 мг/кг дважды в неделю; ii) лечение руксолитинибом по схеме введения 60 мг/кг дважды в сутки; iii) лечение ActRIIB(L79D 25-131)-Fc по схеме введения 10 мг/кг дважды в неделю и руксолитинибом по схеме введения 60 мг/кг дважды в сутки; и iv) носителем (TBS) дважды в неделю (т.е. контрольные животные). Спустя четыре недели лечения у мышшей, получавших ActRIIB(L79D 25-131)-Fc, отмечали увеличение количества эритроцитов (~15%) и гемоглобина (~13%) по сравнению с контрольными мышями (полу-

чавшими TBS), что свидетельствовало, что ActRIIB(L79D 25-131)-Fc повышает эритропоэтическую активность у мышей C57BL/6. Напротив, лечение руксолитинибом приводило к снижению количества эритроцитов (~4%) и гемоглобина (~4%) по сравнению с контрольными животными. У мышей, получавших совместно ActRIIB(L79D 25-131)-Fc и руксолитиниб, наблюдалось увеличение количества эритроцитов (~8%) и гемоглобина (~5%) по сравнению с контрольными животными.

Эти данные свидетельствуют, что ActRIIB(L79D 25-131)-Fc может инвертировать анемию, индуцированную руксолитинибом, у нормальных здоровых животных. Таким образом, эти данные позволяют предположить, что антагонисты ActRIIB могут применяться для облегчения анемии, индуцированной ингибитором Янус-киназы, в различных популяциях пациентов, включая, например, пациентов с миелофиброзом, которые получали или получают лечение одним или более чем одним ингибитором Янус-киназы. Соответственно, антагонисты ActRIIB могут применяться совместно с терапией ингибиторами Янус-киназы для лечения различных популяций пациентов, включая, например, пациентов с миелофиброзом, которые получали или получают лечение одним или более чем одним ингибитором Янус-киназы, в частности тех из них, у которых присутствует анемия.

Включение путем ссылки

Все цитируемые в данном описании публикации и патенты включены путем ссылки во всей полноте, как если бы для каждой отдельной публикации или патента было непосредственно указано, что они включены путем ссылки.

Приведенное описание конкретных воплощений объектов изобретения является иллюстративным, но не ограничивает объем изобретения. Специалистам в области техники, ознакомившимся с данным описанием и формулой изобретения, приведенной ниже, будут очевидны многочисленные вариации. Объем изобретения определяется формулой изобретения, включающей эквиваленты в полном объеме, в свете описания с учетом таких вариаций.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ увеличения уровней эритроцитов и/или гемоглобина у пациента, получавшего лечение ингибитором Янус-киназы, включающий введение пациенту эффективного количества полипептида ActRIIB, где полипептид ActRIIB содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности, начинающейся остатком, соответствующим любой из аминокислот 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29 последовательности SEQ ID NO: 1 и заканчивающейся остатком, соответствующим любой из аминокислот 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 последовательности SEQ ID NO: 1; и где полипептид ActRIIB содержит отрицательно заряженную аминокислоту в аминокислотном положении, соответствующем положению 79 в SEQ ID NO: 1.

2. Способ лечения, предупреждения или уменьшения скорости прогрессирования и/или тяжести миелофиброза или одного или более чем одного осложнения миелофиброза у пациента, включающий введение указанному пациенту, которому это необходимо: а) ингибитора Янус-киназы и б) полипептида ActRIIB, где ингибитор Янус-киназы и полипептид ActRIIB вводят в эффективном количестве и полипептид ActRIIB содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности, начинающейся остатком, соответствующим любой из аминокислот 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29 последовательности SEQ ID NO: 1 и заканчивающейся остатком, соответствующим любой из аминокислот 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 последовательности SEQ ID NO: 1; и где полипептид ActRIIB содержит отрицательно заряженную аминокислоту в аминокислотном положении, соответствующем положению 79 в SEQ ID NO: 1.

3. Способ по п.2, где одно или более чем одно осложнение миелофиброза выбрано из группы, состоящей из неэффективного гемопоэза, анемии, воспаления, фиброза, панцитопении, тромбоцитопении, экстрамедуллярного гемопоэза, гепатомегалии, спленомегалии, пойкилоцитоза, утомляемости, потери массы тела, ночной потливости, лихорадки, зуда, боли в костях, чувства быстрого насыщения, боли или дискомфорта в области живота, артралгий, миалгий, парестезий, кахексии, инфаркта селезенки, остеосклероза, остеомиелофиброза и кровотечения.

4. Способ по п.3, где одно или более чем одно осложнение миелофиброза выбрано из группы, состоящей из фиброза костного мозга, фиброза селезенки, фиброза печени, селезеночного экстрамедуллярного гемопоэза, печеночного экстрамедуллярного гемопоэза, легочного экстрамедуллярного гемопоэза и лимфатического экстрамедуллярного гемопоэза.

5. Способ по любому из пп.1-4, где способ уменьшает одно или более чем одно из следующего: фиброз костного мозга, фиброз селезенки, фиброз печени, фиброз легких и фиброз лимфоузлов.

6. Способ по любому из пп.1-5, где способ уменьшает спленомегалию.

7. Способ по любому из пп.1-6, где способ уменьшает гепатомегалию.

8. Способ по любому из пп.1-7, где способ уменьшает воспаление в органе/ткани, выбранных из группы, состоящей из селезенки, печени, легкого, лимфатического узла и костного мозга.

9. Способ по любому из пп.1-8, где способ уменьшает размер и/или массу органа/ткани, выбранных из группы, состоящей из селезенки, печени, легкого и лимфатического узла.

10. Способ по любому из пп.1-7, где способ уменьшает экстрамедуллярный гемопоэз.
11. Способ по п.10, где способ уменьшает экстрамедуллярный гемопоэз в органе или ткани, выбранных из группы, состоящей из селезенки (селезеночный экстрамедуллярный гемопоэз), печени (печеночный экстрамедуллярный гемопоэз), легкого (легочный экстрамедуллярный гемопоэз) и лимфатического узла (лимфатический экстрамедуллярный гемопоэз).
12. Способ по любому из пп.1-11, где способ увеличивает уровни эритроцитов у пациента.
13. Способ по любому из пп.1-12, где способ увеличивает уровни гемоглобина у пациента.
14. Способ по любому из пп.1-13, где пациент имеет анемию.
15. Способ по п.14, где способ лечит анемию.
16. Способ по любому из пп.1-15, где до начала лечения полипептидом ActRIIB пациенту проводили одну или более чем одну трансфузию клеток крови.
17. Способ по любому из пп.1-16, где пациент является зависимым от трансфузии клеток крови.
18. Способ по п.17, где способ уменьшает частоту трансфузий клеток крови.
19. Способ по п.18, где способ уменьшает трансфузию клеток крови более чем приблизительно на 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% в течение от 4 до 8 недель по сравнению с равным периодом времени до начала лечения полипептидом ActRIIB.
20. Способ по п.19, где способ уменьшает трансфузию клеток крови более чем приблизительно на 50% в течение от 4 до 8 недель по сравнению с равным периодом времени до начала лечения полипептидом ActRIIB.
21. Способ по любому из пп.1-20, где способ уменьшает перенасыщение железом.
22. Способ по п.21, где способ уменьшает содержание железа в одном или более чем одном органе/ткани, выбранных из группы, состоящей из печени, селезенки и сердца.
23. Способ по любому из пп.1-22, где пациент имеет первичный миелофиброз.
24. Способ по любому из пп.1-22, где пациент имеет миелофиброз, которому предшествовала истинная полицитемия.
25. Способ по любому из пп.1-22, где пациент имеет миелофиброз, которому предшествовала эссенциальная тромбоцитемия.
26. Способ по любому из пп.1-25, где пациент имеет миелофиброз с низким риском, промежуточным риском-1, промежуточным риском-2 или высоким риском согласно международной шкале оценки прогноза (IPSS).
27. Способ по любому из пп.1-25, где пациент имеет миелофиброз с низким риском, промежуточным риском-1, промежуточным риском-2 или высоким риском согласно динамической IPSS (DIPSS).
28. Способ по любому из пп.1-25, где пациент имеет миелофиброз с низким риском, промежуточным риском-1, промежуточным риском-2 или высоким риском согласно DIPSS-плюс.
29. Способ по любому из пп.26-28, где способ предупреждает или отсрочивает прогрессирование риска при миелофиброзе от низкого риска до промежуточного риска-1, от промежуточного риска-1 до промежуточного риска-2 или от промежуточного риска-2 до высокого риска.
30. Способ по любому из пп.26-28, где способ способствует или ускоряет понижение риска при миелофиброзе от высокого риска до промежуточного риска-2, от промежуточного риска-2 до промежуточного риска-1 или от промежуточного риска-1 до низкого риска.
31. Способ по любому из пп.2-4, где миелофиброз ассоциирован с одной или более чем одной мутацией в одном или более чем одном гене, выбранном из группы, состоящей из нуль-зиготности по гаплотипу JAK2 46/1, JAK2V617F, IDH1, IDH2, EZH2, SRSF2, ASXL1, JAK1, JAK2, JAK3, TYK2, MPL, CALR, CALR+ASXL1-, CALR-ASKL1+, CALR+ASKL1+, CALR-ASKL1-, TET2, THPO и LNK.
32. Способ по п.31, где миелофиброз ассоциирован с одной или более чем одной мутацией в JAK2.
33. Способ по п.32, где мутация JAK2 представляет собой JAK2V617F.
34. Способ по любому из пп.2-4, где миелофиброз ассоциирован с повышением одного или более чем одного сывороточного маркера, выбранного из группы, состоящей из повышенных уровней IL-8 в сыворотке, повышенных уровней IL-2R в сыворотке и повышенных уровней свободных легких цепей.
35. Способ по любому из пп.2-34, где пациент получал лечение ингибитором Янус-киназы.
36. Способ по любому из пп.1-35, где пациент имеет непереносимость ингибитора Янус-киназы.
37. Способ по любому из пп.1-36, где пациент имеет неудовлетворительный ответ на ингибитор Янус-киназы.
38. Способ по любому из пп.2 или 35-37, где полипептид ActRIIB вводят перед лечением ингибитором Янус-киназы.
39. Способ по любому из пп.2 или 35-37, где полипептид ActRIIB вводят после лечения ингибитором Янус-киназы.
40. Способ по любому из пп.2 или 35-37, где полипептид ActRIIB вводят одновременно с ингибитором Янус-киназы.
41. Способ по любому из пп.1-3 или 35-40, где ингибитор Янус-киназы ингибирует одну или более чем одну Янус-киназу, выбранную из группы, состоящей из JAK1, JAK2 и JAK3.
42. Способ по п.41, где ингибитор Янус-киназы ингибирует передачу сигнала одной или более чем одной из JAK1, JAK2 и JAK3 в исследовании на клетках.

43. Способ по любому из пп.1-42, где ингибитор Янус-киназы выбран из группы, состоящей из руксолитиниба, федратиниба (SAR302503), моноэлотиниба (CYT387), пакритиниба, лестауртиниба, AZD-1480, BMS-911543, NS-018, LY2784544, SEP-701, XL019 и AT-9283.

44. Способ по п.43, где ингибитор Янус-киназы представляет собой руксолитиниб.

45. Способ по любому из пп.1-44, где пациенту дополнительно вводят одну или более чем одну поддерживающую терапию или один или более чем один активный агент, выбранный из группы, состоящей из трансфузии крови (трансфузии цельной крови или эритроцитов), хелаторов железа (например, дефероксамина, деферипрона и деферасирокса), кортикостероидов, преднизона, ESA (агентов, стимулирующих эритропоэз) (например, эритропоэтина, эпоэтина альфа, эпоэтина бета, дарбепоэтина альфа и метоксиполиэтиленгликоль-эпоэтина бета), андрогенов, даназола, талидомида, леналидомида, циторедуктивного агента, гидроксимочевины, бусульфана, мелфалма, кладрибина, спленэктомии, лучевой терапии, аспирина, помалидонмида, ингибиторов mTOR (например, рапамицина, сиролимуса, дефоролимуса, эверолимуса, темсиролимуса, NVP-BEZ235, BGT226, SF1126, PK1-587, INK128, AZD8055 и AZD2014) и ингибиторов деацетилазы гистонов (например, гивиностата, панобиностата и прациностата).

46. Способ по п.45, где пациенту дополнительно вводят гидроксимочевину или ранее проводили лечение гидроксимочевинной.

47. Способ по любому из пп.1-46, где пациент имеет непереносимость гидроксимочевины или имеет неудовлетворительный ответ на гидроксимочевину.

48. Способ по любому из пп.1-47, где полипептид ActRIIB выбран из группы, состоящей из:

а) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотам 29-109 последовательности SEQ ID NO: 1;

б) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотам 25-131 последовательности SEQ ID NO: 1;

в) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2;

г) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3;

д) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4;

е) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5;

ж) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6;

з) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30;

и) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54.

49. Способ по п.48, где полипептид ActRIIB содержит D в аминокислотном положении, соответствующем положению 79 в SEQ ID NO: 1.

50. Способ по п.48, где полипептид ActRIIB содержит E в аминокислотном положении, соответствующем положению 79 в SEQ ID NO: 1.

51. Способ по любому из пп.48-50, где полипептид ActRIIB представляет собой слитый белок, содержащий Fc-домен иммуноглобулина.

52. Способ по п.51, где Fc-домен иммуноглобулина имеет происхождение из Fc-домена IgG1.

53. Способ по п.52, где Fc-домен иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична любой из SEQ ID NO: 9-13.

54. Способ по любому из пп.48-53, где слитый белок дополнительно содержит линкерный домен, расположенный между доменом ActRIIB и Fc-доменом иммуноглобулина.

55. Способ по п.54, где линкерный домен представляет собой аминокислотную последовательность, соответствующую любой из SEQ ID NO: 14-20.

56. Способ по п.51, где полипептид ActRIIB представляет собой слитый белок ActRIIB-Fc, содержащий полипептид, выбранный из:

а) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24;

б) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25;

в) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28;

г) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29;

д) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31;

- е) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45;
- ж) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 50;
- з) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53;
- и) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 58.
57. Способ по п.56, где полипептид ActRIIB содержит D в аминокислотном положении, соответствующем положению 79 в SEQ ID NO: 1.
58. Способ по п.56, где полипептид ActRIIB содержит E в аминокислотном положении, соответствующем положению 79 в SEQ ID NO: 1.
59. Способ по любому из пп.48-58, где полипептид ActRIIB содержит одну или более чем одну аминокислотную модификацию, выбранную из гликозилированной аминокислоты, ПЭГилированной аминокислоты, фарнезилированной аминокислоты, ацетилированной аминокислоты, биотинилированной аминокислоты и аминокислоты, конъюгированной с липидной группировкой.
60. Способ по п.59, где полипептид ActRIIB является гликозилированным и имеет паттерн гликозилирования млекопитающих.
61. Способ по п.60, где полипептид ActRIIB является гликозилированным и имеет паттерн гликозилирования, получаемый в линии клеток яичников китайского хомячка.
62. Способ по любому из пп.48-61, где полипептид ActRIIB связывается с одним или более чем одним лигандом, выбранным из группы, состоящей из активина, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6 и BMP10.
63. Способ по п.62, где полипептид ActRIIB связывается с активинном А.
64. Способ по п.62 или 63, где полипептид ActRIIB связывается с активинном В.
65. Способ по любому из пп.48-64, где полипептид ActRIIB ингибирует передачу сигнала от одного или более чем одного лиганда, выбранного из группы, состоящей из активина, GDF11, GDF8, GDF3, BMP6 и BMP10.
66. Способ по п.65, где полипептид ActRIIB ингибирует передачу сигнала от активина А.
67. Способ по п.65 или 66, где полипептид ActRIIB ингибирует передачу сигнала от активина В.
68. Способ по любому из пп.65-67, где полипептид ActRIIB ингибирует передачу сигнала от одного или более чем одного лиганда в исследовании на клетках.
69. Способ по любому из пп.1-68, где полипептид ActRIIB содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности, начинающейся остатком, соответствующим любой из аминокислот 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29 последовательности SEQ ID NO: 1, и заканчивающейся остатком, соответствующим любой из аминокислот 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 последовательности SEQ ID NO: 1.
70. Способ по любому из пп.1-69, где полипептид ActRIIB содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, начинающейся остатком, соответствующим любой из аминокислот 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29 последовательности SEQ ID NO: 1 и заканчивающейся остатком, соответствующим любой из аминокислот 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 последовательности SEQ ID NO: 1.
71. Способ по любому из пп.1-70, где полипептид ActRIIB содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 97% идентична последовательности, начинающейся остатком, соответствующим любой из аминокислот 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29 последовательности SEQ ID NO: 1, и заканчивающейся остатком, соответствующим любой из аминокислот 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 или 134 последовательности SEQ ID NO: 1.

```

ActRIIa  ILGRSETQEC LFFNANMERKDRINOTGVVPC YGDKDRNRRC PATWKNISGS
ActRIIb  GRGEAETREC IFFNANMERLE RTNOSGLERC EGEQDKRLHC YASHRNSSGT

IEIVKGGGWL DDINCYLPTD CVERRKDSPEV YFCCCEGNMC NEKFSYFPEM
IELVKKGGWL DDFNCTDDE CVADLEENPOV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA

EVTQPTSNPV TPKPP
GGPEVTYIEPP FTAPT

```

Фиг. 1

	10	20	30	40	50	
И крысы	MFAFMAA-LALLNGSLCAGSGRGEAETRECIYVYNNANWELERTNQSGLER-CEGEQDKE					
И свиньи	MFAFMAA-LALLNGSLCAGSGRGEAETRECIYVYNNANWELERTNQSGLER-CEGEQDKE					
И мыши	MFAFMAA-LALLNGSLCAGSGRGEAETRECIYVYNNANWELERTNQSGLER-CEGEQDKE					
И человека	MFAFMAA-LALLNGSLCAGSGRGEAETRECIYVYNNANWELERTNQSGLER-CEGEQDKE					
И коровы	MFAFMAA-LALLNGSLCAGSGRGEAETRECIYVYNNANWELERTNQSGLER-CEGEQDKE					
И <i>Xenopus</i>	MFAFMAA-LALLNGSLCAGSGRGEAETRECIYVYNNANWELERTNQSGLER-CEGEQDKE					
ИА человека	MFAFMAA-LALLNGSLCAGSGRGEAETRECIYVYNNANWELERTNQSGLER-CEGEQDKE					
консенсуция	MFAFMAA-LALLNGSLCAGSGRGEAETRECIYVYNNANWELERTNQSGLER-CEGEQDKE					
	60	70	80	90	100	110
И крысы	HLPCYASWPNSSGTEILVKKCCWLDLDFNCFYDRQECVATEENPQVVFCCCEGNFCNERFT					
И свиньи	HLPCYASWPNSSGTEILVKKCCWLDLDFNCFYDRQECVATEENPQVVFCCCEGNFCNERFT					
И мыши	HLPCYASWPNSSGTEILVKKCCWLDLDFNCFYDRQECVATEENPQVVFCCCEGNFCNERFT					
И человека	HLPCYASWPNSSGTEILVKKCCWLDLDFNCFYDRQECVATEENPQVVFCCCEGNFCNERFT					
И коровы	HLPCYASWPNSSGTEILVKKCCWLDLDFNCFYDRQECVATEENPQVVFCCCEGNFCNERFT					
И <i>Xenopus</i>	HLPCYASWPNSSGTEILVKKCCWLDLDFNCFYDRQECVATEENPQVVFCCCEGNFCNERFT					
ИА человека	HLPCYASWPNSSGTEILVKKCCWLDLDFNCFYDRQECVATEENPQVVFCCCEGNFCNERFT					
консенсуция	HLPCYASWPNSSGTEILVKKCCWLDLDFNCFYDRQECVATEENPQVVFCCCEGNFCNERFT					
	120	130	140	150		
И крысы	HLPEAGGPEVYEPPTAPTGGTHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV					
И свиньи	HLPEAGGPEVYEPPTAPTGGTHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV					
И мыши	HLPEAGGPEVYEPPTAPTGGTHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV					
И человека	HLPEAGGPEVYEPPTAPTGGTHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV					
И коровы	HLPEAGGPEVYEPPTAPTGGTHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV					
И <i>Xenopus</i>	HLPEAGGPEVYEPPTAPTGGTHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV					
ИА человека	HLPEAGGPEVYEPPTAPTGGTHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV					
консенсуция	HLPEAGGPEVYEPPTAPTGGTHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV					

Фиг. 2

1 MDAMKRGICC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYVNA NWELERTNQS
 51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWDDDFNC YDRQECVATE
 101 ENPQVVFCCC EGNFCNERFT HLPFAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPCP
 151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
 201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWMNGKEY KCKVSNKALP
 251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPSPREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
 301 EWESNGQPEN NYKTIPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
 351 EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 45)

Фиг. 3

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT CTGCTCTGCT TGTGTGGAGC
TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGAGC ACACACCTCG
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGGC CCTCTGGGGC TGGGGAGGCT GAGACACGGG
TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGAGACCCGC ACCCTCCGA CTCTGTGCCC
 101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACACAGGC
TCACGTAGAT GATGTTGCGG TTGACCCTCG ACCTCGCGTG GTTGGTCTCG
 151 GGCTGGAGC GCTCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC
CCGACCTCG CGACGCTTCC GCTCGTCTGT TTCGCCGAGC TGACGATGCG
 201 CTCTGGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA CTTCTGTAAG AAGGGCTGCT
GAGGACCGCG TTGTCGAGAC CGTGGTAGCT CGAGCACTTC TTCCCGACGA
 251 GGGATGATGA CTCAACTGCG TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCACATGAG
CCCTACTACT GAAGTTGACG ATGCTATCCG TCCTCACACA CCGGTGACTC
 301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCACTT TCTGCAACGA
CTCTGGGGG TCCACATGAA GACGACGACA CTTCGTTGA AGACGTTGCT
 351 GCGCTTCACT CATTGGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAGTTC ACGTACGAGC
CGCGAAGTGA GTAACCGGTC TCCGACCCCC GGGCCTTCAG TGCATGCTCG
 401 CACCCCGGAC AGCCCCACC GGTGGTGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
GTGGGGGCTG TCGGGGGTGG CCACCACCTT GAGTGTGTAC GGGTGGCAGC
 451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACGTC A GTCTTCCTCT TCCCCCAA
GGTCTGTGAC TTGAGGACCC CCCTGGCAGT CAGAAGGAGA AGGGGGGTTT
 501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
TGGGTTCCCTG TGGGAGTACT AGAGGGCCGT GGGACTCCAG TGTACGACCC
 551 TGGTGGACGT GAGCCACCAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
ACCACCTGCA CTCGGTCTTT CTGGGACTCC AGTTCAGTT GACCATGCAC
 601 GACCGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCCGGGG AGGAGCAGTA
CTGCCGACCC TCCACGTATT ACGGTTCTGT TTCGGCGCCC TCTCTGTCAI
 651 CAACAGCAGC TACCCTGTGG TCAGCGTCTT CACCCTCCTG CACCAGGACT
GTTGTCGTGC ATGGCACACC AGTCCGAGGA GTGGCAGGAC GTGGTCTTGA
 701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGC AAGG TCTCCAACA AGCCCTCCCA
CCGACTTACC GTTCTCATG TTCACGTTCC AGAGGTTGTT TCGGGAGGTT
 751 GGCCCATCG AGAAAACCAT CTCCTAAGCC AAGGGCAGC CCGGAGAACC
CGGGGTAGC TCTTTTGGTA GAGGTTCCG TTTCCCTCG GGGCTCTTGG

Фиг. 4А

801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCAGGA GGAGATGACC ANGAACCAGG
 TGTCACATG TGGGACGGGG GTAGGGCCCT CCTTACTGG TTCTGGTCC

851 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
 AGTCGGACTG GACGGACCAG TTTCGAAGA TAGGTCGCT GTAGCGGCAC

901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCGGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
 CTCAACCCTCT CGTTACCCGT CGGCCTCTTG TTGATGTTCT GGTGGGAGG

951 CGTGTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCTCT CTAFAGCAAG CTCACCGTGG
 GCACGACCTG AGGCTGCCGA GGAAGAAGGA GATATCGTTC GAGTGGCACC

1001 ACAGAGCAG GTGGCAGCAG GGAACCTCT TCTCATGTC CTGTATGCAT
 TGTTCTCGTC CACCGTCGTC CCCTTGACAGA AGAGTACGAG GCACACGTA

1051 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCCCGGG
 CTCCGAGACG TGTTGGTGTAT GTGCTCTTC TCGGAGAGG ACAGGGGCC

1051 TAAATGA (SEQ ID NO: 48)
 ATTTACT (SEQ ID NO: 49)

Фиг. 4B

1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPCAAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC

51 EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKKGWDDDFNCYDROE CVATEENPOV

101 YFCCCEGNFC NERFTHLPEA GGPEVTYEPPTGGGCTHTCP PCPAPELLGG

151 PSVFLFPKP KDTLMSRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA

201 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLRQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS

251 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTRKQVSLTC LVRKGFYPSDI AVEWESNGQP

301 ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGMVFSCSV MHEALHNHYT

351 QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 50)

Фиг. 5

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

E T R E C I Y Y

51 AGTCTTCGTT TCGCCCGCGG CCGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA
 TCAGAAAGCAA AGCGGGCCCG GCGACTCTG TGCCTCAGC TAGATGATGT

N A N W E L E R T N Q S G L E R C

101 ACGCCAAGTGGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC
 TCGGTTGAC CCTCGACCTC GCGTGGTGG TCTCGCCGA CCTCGCGACG

E G E Q D K R L H C Y A S W R N S

151 GAAGGCGAGC AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGCGCAACAG
 CTTCGCTCG TCCTGTTCCG CGACGTGACG ATGCGGAGGA CCGGTTGTC

S G T I E L V K K G C W D D D F

201 CTCTGGCACC ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGGAC GATGACTTCA
 GAGACCGTGG TAGCTCGAGC ACTTCTTCCC GACGACCCGT CTACTGAAGT

N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V

251 ACTGCTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCAGGTG
 TGACGATGCT ATCCGTCCTC ACACACCGGT GACTCCTCTT GGGGTCCAC

Y F C C C E G N F C N E R F T H L

301 TACTTCTGCT GCTGTGAAGG CACTTCTGCG AACGAGCGCT TCACTCATTT
 ATGAAGACGA CGACACTTCC GTTGAAGACG TTGCTCGCGA AGTGAATAAA

P E A G G P E V T Y E P P P T

351 CCCAGAGGCT GGGGCCCGG AACTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGGTG
 CGGTCTCGA CCCCAGGACC TTCAGTGCAT GCTCGGTGGG GGTGTCCAC

401 GTGGAECTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAACCT CCTGGGGGGA
 CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCTCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCAAAAACC AAGGACACCC TCATGATCTC
 GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGAACCCCT GAGGTACAT CCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
 GGCTGGGGA CTCCAGTATA CGCACCCACA CCTGCCTCG GTGCTTCTGG

551 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGAGC CCGTGGAGGT GCATAATGCC
 GACTCCAGTT CAAGTTGACC CTGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG

Фиг. 6A

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
TTCGTGTTTC GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

651 CGTCCCTACC GTCCTCGACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTCTA

701 GCAAGGTCTC CAACAAGGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
CCTTCCAGAG GTTCTTTCCG GAGGCTCGGG GGTAGCTCTT TTGATAGAGG

751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCATC
TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTG CACATGTGGG ACGGGGGTAG

801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGTCCAG CCTGACCTGC CTGTCAAAG
GGCCCTCCTC TACTGGTTCCT TGGTCCAGTC GGACTGAGAG GACCAGTTTC

851 GCTTCTATCC CAGCCACATC GCGCTGAGT GGGAGAGCAA TGGCAGCCG
CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CCGCACCTCA CCTCTCTGTT ACCCGTCGGC

901 GAGAACAAC ACAGACCAC GCCTCCCCTG CTGACTCCG ACGGCTCCTT
CTCTTGTTGA TGTCTGGGTG CGGAGGGCAC GACCTGAGG TGCCGAGGAA

951 CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTGTCACC CTGCTCCCT

1001 ACGTCTTCTC ATGCTCCCTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG
TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051 CAGAAGGCC TCTCCCTGTC CCCGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 51)
GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 52)

Фиг. 6B

1 ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK

51 KGCWDDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV

101 TYEPPPTGGG THTCPFPCAP ELGGPSVFL FPKPKDITM ISRTPRVTCV

151 VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR BEQYNSTYRV VSVLTVLHQD

201 WLNKKEYKCK VSNKALPARI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ

251 VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPVLDSDG FFFLYSKLTV

301 DKSRWQQGNV FSCVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 53)

Фиг. 7

1 ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK

51 KGCWDDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT

101 HLPEAGGPEV TYEPPPT (SEQ ID NO: 54)

Фиг. 8

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGAGC ACACACCTCG

51 AGTCTTCGTT TGGCCCGGGC CGGCCGAAC CCGCGATGTT ATTTATTTACA
TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GGCGCTTGG GCGCTTACA TAAATAATGT

101 NANWELERTNQSGLERC
ATGCTAATGG GGACTCGAA CGACCAACC AATCGGGCT CGAGCGTGT
TACGATTAAC CCTTGAGCTT GCCTGCTTGG TTAGGCCGA GCTTGCCACA

151 EGEQDKRLHCSYASWRNS
GAGGCGAAC AGGATAACG CTTCAATGC TATGCGTCTG GAGGCACTC
CTCCCTTGG TCCTATTGC GGAGTAACG ATACGACGA CTCTTGGAG

201 SGTIELVKKGCWDDDF
CTCCGGACG ATTGACTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGAC GACCAATCA
GAGGCCCTGC TACTTGACC AGTCTTTC CACGACCTG CTGCTAAGT

251 NCYDRQECVATEENPQV
ATGCTAATGA CCGCAAGGA TGTGTGCTA CCGAGAGAA TCCGAGGTG
TACAATACT GGCGTCTCT ACACAGCGCT GGCTTCTCT AGCGTCCAG

301 YFCSCCEGNFPCNERFTHL
TATTTCTGTT GTTCGAGCG GANTTCTGTT AATGAGCGTT TACCLACCT
ATAAAGACA CAACGCTCC CTAAAGACA TTACTTGCCA AATGGGTGA

351 PEAGGPEVTEPPPT
CCCGAACC GGCGGCGG AGCTACCTA TGAGCCCGG CCGACCGTG
GGGCTTCGG CCGCCGGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGC GGTGGCCAC

401 GTGGAATCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAAT CCTGGGGGA
CACCTTAGT GTGTACGGT GGCAGGGTC GTGACTTGA GGACCCCTT

451 CCGTCACTCT TCTTCTCC CCAAAACCC AAGGACACC TCATGATCTC
GGCAGTCAGA AGGAGAAGG GGGTTTGGG TTCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGACCCCT GAGTCAAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
GGCTGGGGG CTCCAGTGA CGCACCA CTGCACTCG GTGCTCTG

551 CTGAGGTCAA GTCAACTGG TACGTGGAGC GGTGGAGGT GCATAATGCC
GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCA CGTATTACGG

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
TTCGTGTTTC GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC

651 CGTCCCTACC GTCTGCAAC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTCTA

Фиг. 9A

701 GCAAGGTCTC CACCAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
CGTCCAGAG GTGTTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GGTACACACC TGCCCCATC
TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGTG CACATGTGGG ACGGGGGTAG

801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTGAG CCTGACCTCG CTGGTCAAAG
GGCCCTCCTC TACTGGTCTT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC

851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGCAGCCG
CGAAGATAGG GTCGCTGTAG CGGCACCTCA CCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901 GAGAACAAT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
CTCTCTTCA TCTTCTGGTG CCGAGGGCAC GACCTCAGGC TGCCAGGAA

951 CTTCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCGTCACAC GTCGTCCTCT

1001 ACGTCTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACAGC
TGCAGAAGAG TACGAGGCAC TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC

1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 55)
GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCATTT ACT (SEQ ID NO: 56)

Фиг. 9B

GAGAC CCGGAGTCT AATTATTTACA AATGCTAATG GGAATCTGAA CGGACCAACC
AATTCGGGCT CAGTCCCTCT GAGGGGCAAC AGGAATATCG CTTGCAATGC TATGCTCTCT
GGCGCAACTC CTCGGGACCG AATGAGTCTG TCAAGAAAGG CTGCTGGAC GATGATTTCA
AATGCTAATGA CCGGACAGAA TGTGTCCGGA CCGAGGAGAA TCCGAGGTCT TATTTCTCTT
CTTCCGAGCG AATTTCTCTT AATGAGCTT TTAACCACTT CCGGAGCC GCGGGCCCG
AGGTGACTTA TGAATCCCG CCGACC (SEQ ID NO: 57)

Фиг. 10

IgG1 -----THTCPPCPAPELGGPSVFLPPPKRDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF 53
IgG4 ---ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLPPPKRDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQF 57
IgG2 -----VECPPCPAPPVAG-PSVFLPPPKRDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF 51
IgG3 EPKSCDTPPPCPAPELGGPSVFLPPPKRDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF 60
* * * * * . * * * * * : * * * * *

IgG1 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 113
IgG4 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT 117
IgG2 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT 111
IgG3 XWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 120
: * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

IgG1 ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP 173
IgG4 ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP 177
IgG2 ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP 171
IgG3 ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYNTTP 180
* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

IgG1 PVLDSGSPFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 225
IgG4 PVLDSGSPFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGR 229
IgG2 PMLDSGSPFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 223
IgG3 PMLDSGSPFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 232
* : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * *

Фиг. 11

1 MDAMKRLGCC VLLLCGAVFV SPGAATREC IYNNANWELR RTNQSGLERC
51 EGEQDKRLHC YASWRNSSGT IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPOV
101 YFCCCEGNPC NERFTHLPEA GGPEVTYEPP FTGGGTHTCP PCPAPPELLGG
151 PSVFLFPPPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
201 KTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
251 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTCLLVKGFPYPSDIAVEWESNGQP
301 ENNYKTTTPPV LDSGSPFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYT
351 QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 58)

Фиг. 12

```

1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
   TACCTACGTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG
                                     A E F R E C I Y Y
51  AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA
   TCAGAAACAA AGCGGGCCCG GCGGACTCTG TGCCCTCACG TAGATGATGT
   N A N W E L E R T N Q S G L E R C
101  ACGCCAAC TG GAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC
   TCGGCTTGAC CCTCGACCTC GCTGCTTGG TCTCGCCGGA CCTCGCGAGC
                                     E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
151  GAAGGCGAGC AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCCTCT GCGCAACAG
   CTTCGCTCG TCCTGTTCCG CGACGTGACG ATGCGGAGGA CCGCTTGTCT
                                     S G T I E L V K K G C N L D D F
201  CTCTGGCACC ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA
   GAGCCCTGG TAGCTCGAGC ACTTCTTCCC GACGACCCAT CTACTGAAT
   N C Y D R Q E C V A T E E N P Q V
251  ACTGCTACGA TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG
   TGACGATGCT ATCCCTCCTC ACACACCGGT CACTCTCTTT GGGGTCCAC
                                     Y F C C C E G N F C N E R F T H L
301  TACTCTGCT GCTGTGAAGG CACTTCTGCG AACGAGCGCT TCACCTCATTT
   ATGAAGACGA CGACACTTCC GTTGAAGACG TTGCTCGCGA AGTGAGTAAA
                                     P E A G G P E V T Y E P P P T
351  GCCAGAGGCT GGGGCCCGCG AATCAGCTA CGAGCCACCC CCGCAGGTG
   CGCTCTCCA CCCCCGGCC TTAGTTCAT GCTCGGTGG GCTGTCCAC
401  GTGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCACAG CACCTGAAT CCTGGGGGA
   CACCTTGAGT GTGACGGGT GGCACGGGTC GTGACTTGA GGACCCCTCT
451  CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACC AAGGACACCC TCATGATCTC
   GGCAGTCAGA AGGAGAAGCG GGCTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG
501  CCGACCCCT GAGGTCAAT CCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
   GGCCTGGGGA CTCAGTGTG CGCACCCACA CCTGCACG GTGCTTCTGG
551  CTGAGGTCRA GTTCAACTGG TACGTGGAGC GCGTGGAGGT GCATAATGCC
   GACTCCAGTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCA CSTATTACGG
601  AAGACAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG
   TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT CGTCATGTTG TCGTGATGG CACACCAGTC
651  CCGCTCACC GTCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
   GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCCTGACCGA CTIACCGTTC CTCATGTTCA
701  GCAAGGTCTC CAACAAGCC CTCSCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC
   CGTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGTTGCGG GGTAGCTCTT TTGTAGAGG
751  AAAGCCAAAG GGCAGCCCG AGAACCCAG GTGTACACCC TGCCCCATC
   TTTCGGTTTC CCGTCGGGC TCTGTGTGTC CACATGTGG ACGGGGTAG

```

Фиг. 13А

```

801  CCGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGTTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
   GGCCCTCCTC TACTGTTCT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTTC
851  GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCGG
   CGAAGATAGG GTGCGTGTAG CCGCACCTCA CCTCTCCTTT ACCCGTCGCG
901  GAGAACAACT ACAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT
   CTCTTGTGA TGTCTGCTG CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TCGCGAGGAA
951  CTCTCTTAT AGCAACTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
   GAAGGAGATA TCSTTCGACT GGCACCTGTT CTCCTCACCC GTGCTCCCTT
1001  ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACAG
   TGCAGAAAG TACCAGCCAC TACGTACTCC GAGACCTGTT GGTGATGTGC
1051  CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 59)
   GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCCATTT ACT (SEQ ID NO: 60)

```

Фиг. 13В

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGACC
TACCTACCTT ACTTCTCTCC CGAGACGACA CACGACGACG ACACACCTCG

51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGGC CCGCGAAGAC CCGCGAATGT ATTTAATACA
TCAGAAGCAA AGCGGGCCGC GCGGGCTTGG GCGCTTACA TAAATAATGT

101 N A N W E L E R T N O S G L E R C
ATGCTAANTG GGAATCTGAA CCGACGACC AATCGGGCT CBAACGCTGT
TACGATTAAC CCTTGAGCTT GCCTGTCTGG TTAGGCCGGA GCTTGCCACA

151 E G E Q D K R L H C Y A S W R N S
GAGGGGACC ACGATAACG CCGCTAATCC TATCCCTCGT GAGCGAATCC
CTCCCCCTTG TCCTATTTCG GGAGGTAACG ATACCGAGCA CCTCCTTGAG

201 S G T I E L V K K G C W L D D F
CTCCGGGACG ATTTGACTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGCTG GACGATTTCA
GAGGCCCTGC TAACCTGACC AGTCTTTCC CACGACCCAC CTGCTAAAGT

251 N C Y D R Q E C V A T E E N P O V
ATTCGPAATCA CCGCCAGGAA TGTGTGCGCA CCGAGGAGAA TCCCGAGGTC
TAACAATACT GCGGGTCCTT ACACAGCGCT GCGTCTCTTT AGGCGTCCAG

301 Y F C C C E G N F C N E R F T H L
TATTTCTGTT GTTCCGAGGG GAAFTTCTGT AATGAACTGT TTAACCACCT
ATAAAGACAA CAACGCTCCC CTTAAAGACA TTACTTGCCA AATGGGTGGA

351 P E A G G P E V T Y E P P P T
TCCCGAATCC GCGCGGCTCG AGTTCACCTA TGAACCTCCG CCGCCGGGTG
GGGCTTCGG CCGCCCGGGC TCCACTGGAT ACTTGGGGGC GGTGGCCAC

401 GTGGAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAATC CCGGGGGGA
CACCTTGAGT GTGTACGGGT GGCACGGGTC GTGACTTGA GGACCCCTCT

451 CCGTCAGTCT TCCTCTCCG CCCAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC
GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG GGGTFTTGGG TTCTGTGGG AGTACTAGAG

501 CCGGACCCCT GAGTCAAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC
GGCTGGGGA CTCCAGTATA CGCACCAACA CCGTCACTCG GTGCTCTGCG

551 CTGAGTCAA FTTCAACTGG TACGTGGAGC GCGTGGAGGT GCATAATGCC
GACTCCACTT CAAGTTGACC ATGCACCTGC CGCACCTCCA CBTATTACGG

601 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCTG
TTCTGTTTCG CCGCCCTCCT CGTCAATGTT TCGTGCAATGG CACACCAGTC

651 CGTCCCTACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT
GCAGGAGTGG CAGGACGTGG TCTTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTCCA

701 CCAAGTCTC CAACAAGCC CTCCAGCCC CCATCGAGAA AACATCTCC
CGTCCAGAG GTTGTTCGG GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG

751 AAAGCCAAAG GGCAGCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCATC
TTTCGGTTTC CCGTCGGGGC TCTTGGTGT CACATGTGG ACAGGGGTAG

Фиг. 14А

801 CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG
GGCCCTCTCC TACTGGTCTT TGGTCCAGTC GGACTGGACG GACCAGTTC

851 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG
CGAAGATAGG CTCGCTGATG CCGCACCTCA CCTCTCGTT ACCCGTCGGC

901 GAGAACAATC ACAAAGCCAC GCCTCCCGTG CTGACTCCG ACGGCTCCTT
CTCTGTGTA TGTTCGGTG CCGAGGGCAC GACTGAGGC TGCCGAGGAA

951 CTCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA
GAAGGAGATA TCGTTCGAGT GGCACCTGTT CTCCTCCAGG CTCCTCCCT

1001 ACCTCTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAG CTCTGCACAA CCACTACAG
TCCGAGAGG TCCGAGGCAC TACTACTCC GAGACGTGT GGTGATGTC

1051 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC CCGGGTAAA TGA (SEQ ID NO: 61)
GTCTTCTCGG AGAGGGACAG GGGCCATTT ACT (SEQ ID NO: 62)

Фиг. 14В

