

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490259 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.05.17

(51) Int. Cl. A61P 27/02 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.07.18

(54) БЕЛКИ ActRII и ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

(31) 63/223,265

(72) Изобретатель:
Де Оливейра Пена Джанет (US)

(32) 2021.07.19

(33) US

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

(86) PCT/US2022/037479

(87) WO 2023/003815 2023.01.26

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

(57) В некоторых аспектах описание относится к композициям и способам снижения риска телеангиэктазии у пациента, получающего терапевтически эффективное количество полипептида ActRII, в частности к схеме дозирования, которая снижает риск телеангиэктазии у пациента, получающего терапевтически эффективное количество полипептида ActRII.

ActRIIa ILGRSETQEC LFFVAVWEKD RTNQGVPC YSDKDKRRIC FATHKNISGS
ActRIIb GRGEAETREC IYNNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASMRNSSGT

IELVKGQWL DDINGYDRID CVELKDSPEV YFCCCEGNMC NEKFSYPPEM
IELVKGQWL DDFNCDYDRE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA

EVTQPTSNPV TPKPP (SEQ ID NO: 2)
GGPEVTEYPP PTAPT (SEQ ID NO: 31)

202490259

A1

A1

202490259

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580463EA/032

БЕЛКИ АСТРП И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 63/223,265, поданной 19 июля 2021 г., содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

В настоящей заявке описан способ снижения риска телеангиэктазии у пациента, получающего терапевтически эффективное количество полипептида ActRII. Заявка также относится к способу снижения риска телеангиэктазии у пациента, получающего терапевтически эффективное количество полипептида ActRII, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, соответствующей остаткам 30-110 SEQ ID NO: 1.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Телеангиэктазия относится к состоянию, при котором расширенные вены (мельчайшие кровеносные сосуды) вызывают появление нитевидных красных линий или узоров на коже. Считается, что эти паттерны, или телеангиэктазии, вызваны высвобождением или активацией вазоактивных веществ при различных условиях. Хотя телеангиэктазии часто бывают доброкачественными, они могут быть вызваны серьезным заболеванием, например наследственной геморрагической телеангиэктазией (ННТ). У пациентов с ННТ, телеангиэктазии могут появляться в жизненно важных органах, таких как печень. Разрыв этих телеангиэктазий может привести к опасному для жизни кровотечению.

Телеангиэктазия может проявляться как побочный эффект при введении некоторых лекарственных средств, таких как белок, слитый с рецептором ALK-1 (далантерцепт), эндоглин-нейтрализующее антитело (TRC105) и некоторые полипептиды ActRII (Garber K. Nat Biotechnol. 2016; 34(5):458-461).

Существует высокая неудовлетворенная потребность в эффективных терапиях для снижения риска телеангиэктазии у пациентов, получающих один или несколько полипептидов ActRII для лечения основного заболевания. Соответственно, объектом настоящего изобретения является создание способов снижения риска телеангиэктазии у пациентов, получающих полипептид ActRII.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В некоторых аспектах, изобретение предлагает способ снижения риска телеангиэктазии у пациента, получающего терапевтически эффективное количество полипептида ActRII, где способ включает введение полипептида ActRII по схеме дозирования, включающей: (i) введение пациенту первой дозы полипептида ActRII в количестве 0,3 мг/кг; и (ii) введение пациенту второй дозы полипептида ActRII в количестве 0,7 мг/кг; где третью дозу начинают, если у пациента проявляются симптомы

или имеются факторы риска развития телеангиэктазии, тем самым снижая риск телеангиэктазии. В некоторых аспектах, изобретение предлагает способ снижения риска телеангиэктазии у пациента, получающего терапевтически эффективное количество полипептида ActRII, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, соответствующей остаткам 30-110 SEQ ID NO: 1, где способ включает введение полипептида ActRII по схеме дозирования, включающей: (i) введение пациенту первой дозы полипептида ActRII в количестве 0,3 мг/кг; и (ii) введение пациенту второй дозы полипептида ActRII в количестве 0,7 мг/кг; где третью дозу начинают, если у пациента проявляются симптомы или имеются факторы риска развития телеангиэктазии, тем самым снижая риск телеангиэктазии. В некоторых вариантах осуществления, третья доза включает введение пациенту дозы полипептида ActRII в количестве 0,3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, третья доза включает приостановку лечения полипептидом ActRII на период по меньшей мере 2-6 недель. В некоторых вариантах осуществления, третья доза включает приостановку лечения полипептидом ActRII на период по меньшей мере 3 недели. В некоторых вариантах осуществления, первую дозу вводят пациенту в течение по меньшей мере 3 недель. В некоторых вариантах осуществления, вторую дозу вводят в течение по меньшей мере 21 недели. В некоторых вариантах осуществления, вторую дозу вводят в течение по меньшей мере 45 недель.

В некоторых аспектах, изобретение предлагает способ снижения риска телеангиэктазии при лечении пациента полипептидом ActRII, где способ включает введение полипептида ActRII по схеме дозирования, включающей: (i) введение пациенту одной или нескольких первых доз полипептида ActRII в количестве 0,3 мг/кг один раз в 3 недели в течение 24 недель; при этом, если у пациента наблюдаются один или несколько симптомов или факторов риска развития телеангиэктазии, пациенту вводят одну или несколько вторых доз полипептида ActRII в количестве, уменьшенном по меньшей мере на половину количества первой дозы.

В некоторых аспектах, изобретение предлагает способ снижения риска телеангиэктазии у пациента, получающего терапевтически эффективное количество полипептида ActRII, где способ включает введение полипептида ActRII по схеме дозирования, включающей: (i) введение пациенту полипептида ActRII в количестве 0,3 мг/кг каждые 3 недели; при этом, если у пациента проявляются симптомы или имеются факторы риска развития телеангиэктазии, пациенту вводят полипептид ActRII в количестве 0,3 мг/кг каждые 6 недель, тем самым снижая риск телеангиэктазии. В некоторых аспектах, изобретение предлагает способ снижения риска телеангиэктазии у пациента, получающего терапевтически эффективное количество полипептида ActRII, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, соответствующей остаткам 30-110 SEQ ID NO: 1, где способ включает введение полипептида ActRII по схеме дозирования, включающей: (i) введение пациенту полипептида ActRII в количестве 0,3 мг/кг каждые 3

недели; при этом, если у пациента проявляются симптомы или имеются факторы риска развития телеангиэктазии, пациенту вводят полипептид ActRII в количестве 0,3 мг/кг каждые 6 недель, тем самым снижая риск телеангиэктазии. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество полипептида ActRII составляет 0,7 мг/кг каждые 3 недели.

В некоторых аспектах, изобретение предлагает способ лечения легочной артериальной гипертензии, где способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, полипептида ActRII по схеме дозирования, включающей: (i) введение пациенту первой дозы полипептида ActRII в количестве 0,3 мг/кг; и (ii) введение пациенту второй дозы полипептида ActRII в количестве 0,7 мг/кг один раз каждые 3 недели в течение всего времени, пока пациент нуждается в лечении; где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, соответствующей остаткам 30-110 SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления, симптомы телеангиэктазии выбраны из группы, состоящей из боли, зуда, нитевидных красных пятен на коже, слизисто-кожных телеангиэктазий, желудочно-кишечных кровотечений, поражений кожи, носового кровотечения, кровоточивости десен, артериовенозных мальформаций, внутренних телеангиэктазий и красных пятен на коже. В некоторых вариантах осуществления, симптомы телеангиэктазии включают поражения кожи. В некоторых вариантах осуществления, симптомы телеангиэктазии включают кровоточивость десен. В некоторых вариантах осуществления, симптомы телеангиэктазии включают носовое кровотечение. В некоторых вариантах осуществления, симптомы телеангиэктазии включают артериовенозные мальформации. В некоторых вариантах осуществления, симптомы телеангиэктазии включают внутренние телеангиэктазии. В некоторых вариантах осуществления, артериовенозные мальформации или внутренние телеангиэктазии возникают во внутренних органах (*например*, головном мозге, печени, легких, селезенке, мочевыводящих путях и позвоночнике). В некоторых вариантах осуществления, факторы риска развития телеангиэктазии выбраны из группы, состоящей из: низких уровней BMP9; низких уровней BMP10; низких уровней VEGF; наследственной геморрагической телеангиэктазии (ННТ); и заболевания соединительной ткани (СТД).

В некоторых вариантах осуществления, снижение риска включает облегчение или улучшение тяжести телеангиэктазии. В некоторых вариантах осуществления, снижение риска включает профилактику прогрессирования телеангиэктазии. В некоторых вариантах осуществления, третья доза включает приостановку лечения полипептидом ActRII до тех пор, пока телеангиэктазия не улучшится до ≤ 1 степени. В некоторых вариантах осуществления, способ улучшает тяжесть телеангиэктазии с 2 степени до 1 степени. В некоторых вариантах осуществления, способ улучшает тяжесть телеангиэктазии с 3 степени до 2 степени. В некоторых вариантах осуществления, способ улучшает тяжесть телеангиэктазии с 3 степени до 1 степени. В некоторых вариантах осуществления, способ предотвращает прогрессирование телеангиэктазии с 1 степени до 2 степени. В некоторых

вариантах осуществления, способ предотвращает прогрессирование телеангиэктазии с 2 степени до 3 степени. В некоторых вариантах осуществления, пациент получает полипептид ActRII для лечения РН. В некоторых вариантах осуществления, пациент получает полипептид ActRII для лечения РАН.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности, соответствующей остаткам 30-110 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, соответствующей остаткам 21-135 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности, соответствующей остаткам 21-135 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, полипептид ActRII содержит аминокислотную последовательность, 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 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления, полипептид ActRII содержит аминокислотную последовательность, 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 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления, полипептид ActRII представляет собой слитый белок, дополнительно содержащий домен Fc иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления, домен Fc иммуноглобулина представляет собой домен Fc иммуноглобулина IgG1. В некоторых вариантах осуществления, слитый белок Fc дополнительно содержит линкерный домен, расположенный между доменом полипептида ActRII и доменом Fc иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления, линкерный домен выбран из группы, состоящей из: TGGG (SEQ ID NO: 20), TGGGG (SEQ ID NO: 18), SGGGG (SEQ ID NO: 19), GGGGS (SEQ ID NO: 22), GGG (SEQ ID NO: 16), GGGG (SEQ ID NO: 17) и SGGG (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах осуществления, полипептид ActRII содержит аминокислотную последовательность, 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 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления, полипептид ActRII содержит аминокислотную последовательность, 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 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления, полипептид является лиофилизированным. В некоторых вариантах осуществления, полипептид является растворимым. В некоторых вариантах осуществления, полипептид вводят пациенту с помощью подкожной инъекции. В некоторых вариантах осуществления, полипептид вводят пациенту по схеме, выбранной

из группы, состоящей из: каждую неделю, каждые 2 недели, каждые 3 недели и каждые 4 недели. В некоторых вариантах осуществления, полипептид вводят пациенту каждые 3 недели. В некоторых вариантах осуществления, полипептид вводят пациенту каждые 4 недели. В некоторых вариантах осуществления, полипептид является частью гомодимерного белкового комплекса. В некоторых вариантах осуществления, полипептид является гликозилированным. В некоторых вариантах осуществления, полипептид имеет паттерн гликозилирования, который можно получить экспрессией в клетках яичника китайского хомячка. В некоторых вариантах осуществления, полипептид ActRII связывается с одним или несколькими лигандами, выбранными из группы, состоящей из: активина А, активина В и GDF11. В некоторых вариантах осуществления, полипептид ActRII связывается с активинном и/или GDF11. В некоторых вариантах осуществления, полипептид ActRII дополнительно связывается с одним или несколькими лигандами, выбранными из группы, состоящей из: BMP10, GDF8 и BMP6.

В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает введение пациенту дополнительного активного агента и/или поддерживающей терапии. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный активный агент и/или поддерживающая терапия выбрана из группы, состоящей из: бета-блокаторов, ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (ингибиторов ACE), блокаторов рецептора ангиотензина (ARB), диуретиков, гиполипидемических препаратов, блокаторов эндотелина, ингибиторов PDE5, простациклинов, или левожелудочкового устройства вспомогательного кровообращения (LVAD). В некоторых вариантах осуществления, дополнительный активный агент и/или поддерживающая терапия выбраны из группы, состоящей из: простациклина и его производных (*например*, эпопростенола, трепростинила и илопроста); агонистов рецептора простациклина (*например*, селексипага); антагонистов рецептора эндотелина (*например*, телина, амбризентана, мацитентана и бозентана); блокаторов кальциевых каналов (*например*, амлодипина, дилтиазема и нифедипина); антикоагулянтов (*например*, варфарина); диуретиков; кислородной терапии; предсердной септостомии; легочной тромбоэндартерэктомии; ингибиторов фосфодиэстеразы 5 типа (*например*, силденафила и тадалафила); активаторов растворимой гуанилатциклазы (*например*, цинацигуата и риоцигуата); ингибиторов ASK-1 (*например*, СПА; SCH79797; GS-4997; MSC2032964A; 3Н-нафто[1,2,3-de]хинилин-2,7-дионов, NQDI-1; 2-тиоксо-тиазолидинов, 5-бром-3-(4-оксо-2-тиоксотиазолидин-5-илиден)-1,3-дигидроиндол-2-она); антагонистов NF-κB (*например*, dh404, CDDO-эпоксида; 2,2-дифторпропионамида; C28 имидазола (CDDO-Im); 2-циано-3,12-диоксоолеан-1,9-диен-28-овой кислоты (CDDO); 3-ацетилолеаноловой кислоты; 3-трифторацетилолеаноловой кислоты; 28-метил-3-ацетилолеанана; 28-метил-3-трифторацетилолеанана; 28-метилоксиолеаноловой кислоты; SZC014; SCZ015; SZC017; ПЭГилированных производных олеаноловой кислоты; 3-О-(бета-D-глюкопиранозил)олеаноловой кислоты; 3-О-[бета-D-глюкопиранозил-(1-->3)-бета-D-глюкопиранозил]олеаноловой кислоты; 3-О-[бета-D-глюкопиранозил-(1-->2)-бета-D-

глюкопиранозил]олеаноловой кислоты; 28-О-бета-D-глюкопиранозилового эфира 3-О-[бета-D-глюкопиранозил-(1-->3)-бета-D-глюкопиранозил]олеаноловой кислоты; 28-О-бета-D-глюкопиранозилового эфира 3-О-[бета-D-глюкопиранозил-(1-->2)-бета-D-глюкопиранозил]олеаноловой кислоты; 3-О-[а-L-рамнопиранозил-(1-->3)-бета-D-глюкуронопиранозил]олеаноловой кислоты; 28-О-бета-D-глюкопиранозилового эфира 3-О-[альфа-L-рамнопиранозил-(1-->3)-бета-D-глюкуронопиранозил]олеаноловой кислоты; 28-О-β-D-глюкопиранозил-олеаноловой кислоты; 3-О-β-D-глюкопиранозил (1→3)-β-D-глюкопиранозидурановой кислоты (CS1); олеаноловая кислота 3-О-β-D-глюкопиранозил (1→3)-β-D-глюкопиранозидурановой кислоты (CS2); метил 3,11-диоксоолеан-12-ен-28-олата (ДИОКСОЛА); ZCVI₄ -2; бензил 3-дегидрокси-1,2,5-оксадиазоло[3',4':2,3]олеанолата); левожелудочкового устройства вспомогательного кровообращения (LVAD) или трансплантации легких и/или сердца. В некоторых вариантах осуществления, пациента лечили одним или несколькими агентами, выбранными из группы, состоящей из: ингибиторов фосфодиэстеразы 5 типа, стимуляторов растворимой гуанилатциклазы, агониста рецептора простаглицина и антагонистов рецептора эндотелина. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько агентов выбраны из группы, состоящей из: бозентана, силденафила, берапроста, мацитентана, селексипага, эпопростенола, трепростинила, илопроста, амбризентана и тадалафила. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает введение одного или нескольких агентов, выбранных из группы, состоящей из: ингибиторов фосфодиэстеразы 5 типа, стимуляторов растворимой гуанилатциклазы, агониста рецептора простаглицина и антагонистов рецептора эндотелина. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько агентов выбраны из группы, состоящей из: бозентана, силденафила, берапроста, мацитентана, селексипага, эпопростенола, трепростинила, илопроста, амбризентана и тадалафила. В некоторых вариантах осуществления, перед введением полипептида пациента лечили одним или несколькими вазодилататорами. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает введение одного или нескольких вазодилататоров. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько вазодилататоров выбраны из группы, состоящей из простаглицина, эпопростенола и силденафила. В некоторых вариантах осуществления, вазодилататором является простаглицин. В некоторых вариантах осуществления, пациент получал одну или несколько терапий РАН. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько терапий РАН выбраны из группы, состоящей из: простаглицина и его производных (*например*, эпопростенола, трепростинила и илопроста); агонистов рецептора простаглицина (*например*, селексипага); антагонистов рецептора эндотелина (*например*, телена, амбризентана, мацитентана и бозентана); блокаторов кальциевых каналов (*например*, амлодипина, дилтиазема и нифедипина); антикоагулянтов (*например*, варфарина); диуретиков; кислородной терапии; предсердной септостомии; легочной тромбозндартерэктомии; ингибиторов фосфодиэстеразы 5 типа (*например*, силденафила и тадалафила); активаторов

растворимой гуанилатциклазы (*например*, цинацигуата и риоцигуата); ингибиторов ASK-1 (*например*, СПА; SCH79797; GS-4997; MSC2032964A; 3H-нафто[1,2,3-de]хинилин-2,7-дионов, NQDI-1; 2-тиоксо-тиазолидинов, 5-бром-3-(4-оксо-2-тиоксотиазолидин-5-илиден)-1,3-дигидроиндол-2-она); антагонистов NF-κB (*например*, dh404, CDDO-эпоксида; 2,2-дифторпропионамида; C28 имидазола (CDDO-Im); 2-циано-3,12-диоксоол-1,9-диен-28-овой кислоты (CDDO); 3-ацетилолеаноловой кислоты; 3-трифторацетилолеаноловой кислоты; 28-метил-3-ацетилолеанана; 28-метил-3-трифторацетилолеанана; 28-метилоксиолеаноловой кислоты; SZC014; SCZ015; SZC017; ПЭГилированных производных олеаноловой кислоты; 3-O-(β-D-глюкопиранозил)олеаноловой кислоты; 3-O-[β-D-глюкопиранозил-(1→3)-β-D-глюкопиранозил]олеаноловой кислоты; 3-O-[β-D-глюкопиранозил-(1→2)-β-D-глюкопиранозил]олеаноловой кислоты; 28-O-β-D-глюкопиранозилового эфира 3-O-[β-D-глюкопиранозил-(1→3)-β-D-глюкопиранозил]олеаноловой кислоты; 28-O-β-D-глюкопиранозилового эфира 3-O-[β-D-глюкопиранозил-(1→2)-β-D-глюкопиранозил]олеаноловой кислоты; 3-O-[α-L-рамнопиранозил-(1→3)-β-D-глюкуронопиранозил]олеаноловой кислоты; 28-O-β-D-глюкопиранозилового эфира 3-O-[α-L-рамнопиранозил-(1→3)-β-D-глюкуронопиранозил]олеаноловой кислоты; 28-O-β-D-глюкопиранозилолеаноловой кислоты; 3-O-β-D-глюкопиранозил (1→3)-β-D-глюкопиранозидурановой кислоты (CS1); олеаноловой кислоты 3-O-β-D-глюкопиранозил (1→3)-β-D-глюкопиранозидурановой кислоты (CS2); метил 3,11-диоксоолеан-12-ен-28-лата (ДИОКСОЛА); ZCVI₄ -2; бензил-3-дегидроокси-1,2,5-оксадиазоло[3',4':2,3]олеанолата); левожелудочкового устройства вспомогательного кровообращения (LVAD) или трансплантации легких и/или сердца.

Краткое описание чертежей

На **фигуре 1** показано выравнивание внеклеточных доменов ActR11B человека (SEQ ID NO: 31) и ActR11A человека (SEQ ID NO: 2) с остатками, которые были выведены в настоящем документе на основе комплексного анализа нескольких кристаллических структур ActR11B и ActR11A, чтобы непосредственно контактировать лиганд, указанный рамками.

На **фигуре 2** показано множественное выравнивание последовательностей различных белков ActR11A позвоночных и ActR11A человека (SEQ ID NO: 6-10 и 36-38).

На **фигуре 3** показано множественное выравнивание последовательностей доменов Fc изоформ IgG человека с использованием Clustal 2.1. Шарнирные области обозначены пунктирным подчеркиванием. Двойное подчеркивание указывает на примеры положений, сконструированных в Fc IgG1 (SEQ ID NO: 32) для содействия асимметричному спариванию цепей, и соответствующие положения по отношению к другим изоформам IgG2 (SEQ ID NO: 33), IgG3 (SEQ ID NO: 34) и IgG4. (SEQ ID NO: 35).

На **фигурах 4A и 4B** показана очистка ActR11A-hFc, экспрессированного в клетках CHO. Белок очищают в виде одного четко определенного пика, что визуализируется с помощью калибровочной колонки (фигура 4A) и SDS-PAGE, окрашенного Кумасси

(фигура 4B) (левая дорожка: стандарты молекулярной массы; правая дорожка: ActR11A-hFc).

На **фигурах 5A и 5B** показано связывание ActR11A-hFc с активином (фигура 5A) и GDF-11 (фигура 5B), измеренное с помощью анализа Biacore™.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

1. Обзор

Настоящее изобретение относится к композициям и способам снижения риска телеангиэктазии у пациента, получающего терапевтически эффективное количество полипептида ActR11, как описано в настоящем документе, где способ включает введение полипептида ActR11 по схеме дозирования, включающей: (i) введение пациенту первой дозы полипептида ActR11 в количестве 0,3 мг/кг; и (ii) введение пациенту второй дозы полипептида ActR11 в количестве 0,7 мг/кг; при этом третью дозу начинают, если у пациента проявляются симптомы или имеются факторы риска развития телеангиэктазии, тем самым снижая риск телеангиэктазии.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает способы снижения риска телеангиэктазии у пациента, получающего терапевтически эффективное количество полипептида ActR11 для лечения легочной артериальной гипертензии (*например*, II функционального класса или III функционального класса), где легочную артериальную гипертензию лечат введением пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества полипептида ActR11, как описано в настоящем документе.

Легочная артериальная гипертензия [PH 1 группы согласно Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ)] представляет собой серьезное, прогрессирующее и опасное для жизни заболевание легочной сосудистой сети, характеризующееся глубокой вазоконстрикцией и аномальной пролиферацией гладкомышечных клеток в стенках легочных артерий. Сильное сужение кровеносных сосудов легких приводит к очень высокому давлению в легочной артерии. Такое высокое давление затрудняет перекачивание сердцем крови через легкие для насыщения ее кислородом. Пациенты с РАН страдают от сильной одышки, поскольку сердцу приходится бороться с высоким давлением. У пациентов с РАН обычно наблюдается значительное увеличение PVR и устойчивое повышение mPAP, что в конечном итоге приводит к правожелудочковой недостаточности и смерти. Пациенты с диагнозом РАН имеют плохой прогноз, и в равной степени ухудшается качество жизни, при этом средняя продолжительность жизни составляет от 2 до 5 лет с момента постановки диагноза при отсутствии лечения.

РАН можно диагностировать на основании среднего давления в легочной артерии выше 25 мм рт. ст. (или выше 20 мм рт. ст. в соответствии с обновленными рекомендациями) в состоянии покоя, при нормальном давлении заклинивания в легочных артериальных капиллярах. РАН может привести к одышке, головокружению, обмороку и другим симптомам, которые усугубляются при физической нагрузке. РАН может быть тяжелым заболеванием с заметно сниженной переносимостью физической нагрузки и сердечной недостаточностью. Два основных типа РАН включают идиопатическую РАН

(например, РАН, при которой не выявлен предрасполагающий фактор) и наследственную РАН (например, РАН, связанную с мутацией в *BMPR2*, *ALK1*, *ENG*, *SMAD9*, *CAV1*, *KCNK3* или *EIF2AK4*). В 70% случаев семейной РАН, мутации локализуются в гене *BMPR2*. Факторы риска развития РАН включают семейный анамнез РАН, употребление наркотиков и токсинов (например, употребление метамfetамfина или кокаина), инфекции (например, ВИЧ-инфекцию или шистосомоз), цирроз печени, врожденные пороки сердца, портальную гипертензию, легочную веноокклюзионную болезнь, легочный капиллярный гемангиоматоз или нарушения соединительных тканей/аутоиммунные нарушения (например, склеродермия или волчанка). РАН может быть связана с длительным ответом на блокаторы кальциевых каналов, значительными поражениями вен/капилляров (PVOD/PCN) и персистирующей РН новорожденных.

Термины, используемые в данном описании, обычно имеют свои обычные значения в данной области техники, в контексте данного описания, и в конкретном контексте, где используется каждый термин. Определенные термины обсуждаются ниже или в других местах спецификации, чтобы предоставить практикующему врачу дополнительные рекомендации при описании композиций и способов по настоящему описанию, и того, как их изготавливать и использовать. Объем или значение любого использования термина будут очевидны из конкретного контекста, в котором он используется.

Термин «сходство последовательностей» во всех его грамматических формах относится к степени идентичности или соответствия между последовательностями нуклеиновых кислот или аминокислот, которые могут иметь или не иметь общего эволюционного происхождения.

«Доля (%) идентичности последовательности» по отношению к эталонной полипептидной (или нуклеотидной) последовательности определяется как доля аминокислотных остатков (или нуклеиновых кислот) в кандидатной последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам (или нуклеиновым кислотам) в последовательности эталонного полипептида (нуклеотида) после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если это необходимо, для достижения максимальной доли идентичности последовательности, и не рассматривая какие-либо консервативные замены как часть идентичности последовательности. Выравнивание с целью определения доли идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, доступными специалистам в данной области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2, Clustal Omega или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. В некоторых вариантах осуществления, значения % идентичности последовательностей

аминокислот (нуклеиновых кислот) получают с использованием компьютерной программы сравнения последовательностей ALIGN-2. Компьютерная программа сравнения последовательностей ALIGN-2 была разработана компанией Genentech, Inc., и программный код был подан вместе с пользовательской документацией в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, где он зарегистрирован под регистрационным номером авторских прав США TXU510087. Программа ALIGN-2 общедоступна от Genentech, Inc., South San Francisco, Calif., или может быть скомпилирована из программного кода. Программу ALIGN-2 следует скомпилировать для использования в операционной системе UNIX, включая цифровую UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательностей задаются программой ALIGN-2 и не изменяются. Другие алгоритмы для определения идентичности или гомологии последовательностей включают: Clustal Omega, LALIGN, FASTA, SIM и EMBOSS Needle. В предпочтительном варианте осуществления, алгоритм, используемый для определения идентичности последовательности, представляет собой Clustal Omega.

«Агонизировать» во всех своих грамматических формах относится к процессу активации белка и/или гена (*например*, путем активации или амплификации экспрессии гена этого белка или путем индуцирования неактивного белка для перехода в активное состояние) или увеличения активности белка и/или гена.

«Антагонизировать» во всех своих грамматических формах относится к процессу ингибирования белка и/или гена (*например*, путем ингибирования или уменьшения экспрессии гена этого белка или путем индуцирования перехода активного белка в неактивное состояние) или уменьшения активности белка и/или гена.

Термины «примерно» и «приблизительно», используемые в связи с числовым значением во всем описании и формуле изобретения, обозначают интервал точности, знакомый и приемлемый для специалиста в данной области техники. В целом такой интервал точности составляет $\pm 10\%$. Альтернативно, и особенно в биологических системах, термины «примерно» и «приблизительно» могут означать значения, которые находятся в пределах порядка величины, предпочтительно в 5-кратном и более предпочтительно в 2-кратном отношении от заданного значения.

Числовые диапазоны, описанные в настоящем документе, включают числа, определяющие диапазоны.

Термины «а» и «an» включают в себя множественное число, если только контекст, в котором этот термин используется, явно не требует иного. Термины «а» (или «an»), а также термины «один или несколько» и «по меньшей мере один» могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо. Кроме того, термин «и/или», используемый в настоящем документе, следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух или нескольких указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, термин «и/или», используемый в настоящем документе в такой фразе, как «А и/или В», включает «А и В», «А или В», «А» (только) и «В» (только). Аналогичным образом, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А, В и/или С», предназначен для

охвата каждого из следующих аспектов: 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 (один); В (один) и С (один).

В этом описании, слово «содержать» или его варианты, такие как «содержит» или «содержащий», следует понимать как подразумевающие включение указанного целого числа или групп целых чисел, но не исключение любого другого целого числа или группы целых чисел.

2. Полипептиды ActRII

В некоторых аспектах, изобретение относится к полипептидам ActRII и их использованию (*например*, снижению риска телеангиэктазии у пациента, получающего терапевтически эффективное количество полипептида ActRII). Используемый в настоящем документе термин «ActRII» относится к семейству рецепторов активина II типа. В это семейство входят рецепторы активина IIA типа (ActRIIA) и рецепторы активина IIB типа (ActRIIB).

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к полипептидам ActRII, имеющим аминокислотную последовательность, 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 аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 23, 27, 30 и 40. В других вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к полипептидам ActRII, имеющим аминокислотную последовательность, 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 аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31. В настоящем документе, термин «ActRII» относится к семейству белков рецептора активина IIA типа (ActRIIA), семейству белков рецептора активина IIB типа (ActRIIB) или их комбинациям и/или вариантам. Полипептиды ActRII могут быть получены из любого вида и включают варианты, полученные из таких белков ActRII путем мутагенеза или другой модификации. Под ссылкой на ActRII в настоящем документе понимается ссылка на любую из идентифицированных в настоящее время форм. Члены семейства ActRII обычно представляют собой трансмембранные белки, состоящие из лигандсвязывающего внеклеточного домена, включающего богатую цистеином область, трансмембранный домен и цитоплазматический домен с прогнозируемой активностью серин/треонинкиназы.

Термин «полипептид ActRII» включает полипептиды, содержащие любой встречающийся в природе полипептид члена семейства ActRII, а также любые его варианты (включая мутанты, фрагменты, слияния и пептидомиметические формы), которые сохраняют полезную активность. Примеры таких вариантов полипептидов ActRII предложены в настоящем описании, а также в публикациях международных патентных заявок №№ WO 2006/012627, WO 2007/062188, WO 2008/097541, WO 2010/151426 и WO 2011/020045, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. Нумерация аминокислот для всех полипептидов, родственных ActRII, описанных в настоящем документе, основана на нумерации последовательности белка-

предшественника ActRII человека, представленной ниже (SEQ ID NO: 1), если специально не указано иное.

Каноническая последовательность белка-предшественника ActRII человека выглядит следующим образом:

1 MGAAAKLAFVFLISCSGA **ILGRSETQEC** LFFNANWEKD RTNQTGVEPC
 51 **YGD**KDKRRHC **FATWKNISGS** **IEIVKQGCWL** **DDINCYDRTD**
CVEKKDSPEV
 101 **YFCCCEGNMC** **NEKFSYFPEM** **EVTQPTSNPV** **TPKPPYYNIL**
 LYSLVPLMLI
 151 AGIVICAFWV YRHHKMA YPP VLVPTQDPGP PPPSPLLGLK PLQLLEV KAR
 201 GRFGCVWKAQ LLNEYVAVKI FPIQDKQSWQ NEYEVYSLPG MKHENILQFI
 251 GAEKRGTSVD VDLWLITAFH EKGSLSDFLK ANVVSWNELC
 HIAETMARGL
 301 AYLHEDIPGL KDGHKPAISH RDIKSKNVLL KNNLTACIAD FGLALKFEAG
 351 KSAGDTHGQV GTRRYMAPEV LEGAINFQRD AFLRIDMYAM
 GLVLWELASR
 401 CTAADGPVDE YMLPFEEEIG QHPSLEDMQE VVVHKKKRPV
 LRDYWQKHAG
 451 MAMLCETIEE CWDHDAEARL SAGCVGERIT QMQRLTNIIT TEDIVTVVTM
 501 VTNVDFPPKE SSL (SEQ ID NO: 1)

Сигнальный пептид обозначен одинарным подчеркиванием; внеклеточный домен выделен **жирным** шрифтом; и потенциальные эндогенные сайты N-связанного гликозилирования обозначены двойным подчеркиванием.

Процессированная (зрелая) внеклеточная последовательность полипептида ActRII человека выглядит следующим образом:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVK
 QGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPK
PP (SEQ ID NO: 2)

C-концевой «хвост» внеклеточного домена обозначен одинарным подчеркиванием. Последовательность с удаленным «хвостом» (последовательность Δ15) выглядит следующим образом:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVK
 QGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM (SEQ ID NO: 3)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок-предшественник ActRII человека, показана ниже (SEQ ID NO: 4) в виде следующих нуклеотидов 159-1700 эталонной последовательности Genbank NM_001616.4. Последовательность сигналов подчеркнута.

1 ATGGGAGCTG CTGCAAAGTT GCGGTTTGCC GTCTTTCTTA TCTCCTGTTC
 51 TTCAGGTGCT АТАCTTGGTA GATCAGAAAC TCAGGAGTGT STTTTCTTTA
 101 ATGCTAATTG GGAAAAAGAC AGAACCAATC AAACCTGGTGT

TGAACCGTGT

151 TATGGTGACA AAGATAAACG GCGGCATTGT TTTGCTACCT
GGAAGAATAT

201 TTCTGGTTCC ATTGAAATAG TGAAACAAGG TTGTTGGCTG
GATGATATCA

251 ACTGCTATGA CAGGACTGAT TGTGTAGAAA AAAAAGACAG
CCCTGAAGTA

301 TATTTTTGTT GCTGTGAGGG CAATATGTGT AATGAAAAGT
TTTCTTATTT

351 TCCGGAGATG GAAGTCACAC AGCCCACTTC AAATCCAGTT
ACACCTAAGC

401 CACCCTATTA CAACATCCTG CTCTATTCCT TGGTGCCACT TATGTTAATT

451 GCGGGGATTG TCATTTGTGC ATTTTGGGTG TACAGGCATC
ACAAGATGGC

501 CTACCCTCCT GTACTIONGTTT CAACTCAAGA CCCAGGACCA
CCCCCACCTT

551 CTCCATTACT AGGTTTGAAA CCACTGCAGT TATTAGAAGT
GAAAGCAAGG

601 GGAAGATTTG GTTGTGTCTG GAAAGCCCAG TTGCTTAACG
AATATGTGGC

651 TGTCAAATA TTTCCAATAC AGGACAAACA GTCATGGCAA
AATGAATACG

701 AAGTCTACAG TTTGCCTGGA ATGAAGCATG AGAACATATT
ACAGTTCATT

751 GGTGCAGAAA AACGAGGCAC CAGTGTTGAT GTGGATCTTT
GGCTGATCAC

801 AGCATTTCAT GAAAAGGGTT CACTATCAGA CTTTCTTAAG
GCTAATGTGG

851 TCTCTTGAA TGAACTGTGT CATATTGCAG AAACCATGGC
TAGAGGATTG

901 GCATATTTAC ATGAGGATAT ACCTGGCCTA AAAGATGGCC
ACAAACCTGC

951 CATATCTCAC AGGGACATCA AAAGTAAAAA TGTGCTGTTG
AAAAACAACC

1001 TGACAGCTTG CATTGCTGAC TTTGGGTTGG CCTTAAAATT
TGAGGCTGGC

1051 AAGTCTGCAG GCGATACCCA TGGACAGGTT GGTACCCGGA
GGTACATGGC

1101 TCCAGAGGTA TTAGAGGGTG CTATAAACTT CCAAAGGGAT
GCATTTTTGA

1151 GGATAGATAT GTATGCCATG GGATTAGTCC TATGGGAACT
 GGCTTCTCGC
 1201 TGTACTGCTG CAGATGGACC TGTAGATGAA TACATGTTGC
 CATTTGAGGA
 1251 GGAAATTGGC CAGCATCCAT CTCTTGAAGA CATGCAGGAA
 GTTGTGTGTC
 1301 ATAAAAAAAAA GAGGCCTGTT TTAAGAGATT ATTGGCAGAA
 ACATGCTGGA
 1351 ATGGCAATGC TCTGTGAAAC CATTGAAGAA TGTTGGGATC
 ACGACGCAGA
 1401 AGCCAGGTTA TCAGCTGGAT GTGTAGGTGA AAGAATTACC
 CAGATGCAGA
 1451 GACTAACAAA TATTATTACC ACAGAGGACA TTGTAACAGT
 GGTCACAATG

1501 GTGACAAATG TTGACTTCC TCCCAAAGAA TCTAGTCTA (SEQ ID NO: 4)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая процессированный растворимый (внеклеточный) полипептид ActRII человека, выглядит следующим образом:

1 ATACTTGGTA GATCAGAAAC TCAGGAGTGT CTTTTCTTTA ATGCTAATTG
 51 GGAAAAGAC AGAACCAATC AAAGTGGTGT TGAACCGTGT
 TATGGTGACA
 101 AAGATAAACG GCGGCATTGT TTTGCTACCT GGAAGAATAT
 TTCTGGTTCC
 151 ATTGAAATAG TGAAACAAGG TTGTTGGCTG GATGATATCA
 ACTGCTATGA
 201 CAGGACTGAT TGTGTAGAAA AAAAAGACAG CCCTGAAGTA
 TATTTTTGTT
 251 GCTGTGAGGG CAATATGTGT AATGAAAAGT TTTCTTATTT
 TCCGGAGATG

301 GAAGTCACAC AGCCCACTTC AAATCCAGTT ACACCTAAGC CACCC (SEQ ID NO: 5)

ActRII достаточно консервативен среди позвоночных, причем большие участки внеклеточного домена полностью консервативны. Например, на **Фигуре 2** показано выравнивание нескольких последовательностей внеклеточного домена ActRIIA человека по сравнению с различными ортологами ActRIIA. Многие лиганды, связывающиеся с ActRIIA, также высококонсервативны. Соответственно, на основе этих выравниваний можно спрогнозировать ключевые положения аминокислот в лигандсвязывающем домене, которые важны для нормальной активности связывания ActRII с лигандом, а также спрогнозировать положения аминокислот, которые, вероятно, будут толерантны к замене без существенного изменения нормальной активности связывания ActRII-лиганд. Таким

образом, активный вариант полипептида ActRII человека, используемый в соответствии с описанными в настоящем документе способами, может включать одну или несколько аминокислот в соответствующих положениях из последовательности ActRII другого позвоночного, или может включать остаток, аналогичный остатку последовательностей человека или другого позвоночного.

Выравнивание аминокислотных последовательностей внеклеточного домена ActRIIA человека и внеклеточного домена ActRIIB человека показано на **Фигуре 1**. Это выравнивание указывает на аминокислотные остатки в обоих рецепторах, которые, как полагают, непосредственно контактируют с лигандами ActRII. Например, составные структуры ActRII показали, что карман связывания ActRIIA-лиганда определяется, частично, остатками F31, N33, N35, K38-T41, E47, Y50, K53-K55, R57, H58, F60, T62, K74, W78-N83, Y85, R87, E92 и K94-F101. Ожидается, что в этих положениях будут допускаться консервативные мутации.

Не будучи ограничивающими, следующие примеры иллюстрируют этот подход к определению активного варианта ActRII. Как показано на **Фигуре 2**, F13 во внеклеточном домене человека представляет собой Y в ActRIIA *Ovis aries* (SEQ ID NO: 7), *Gallus Gallus* (SEQ ID NO: 10), *Bos Taurus* (SEQ ID NO: 36), *Tyto alba* (SEQ ID NO: 37) и *Myotis davidii* (SEQ ID NO: 38), что указывает на то, что в этом положении допускаются ароматические остатки, включая F, W и Y. Q24 во внеклеточном домене человека представляет собой R в ActRIIA *Bos Taurus*, что указывает на то, что в этом положении допустимы заряженные остатки, включая D, R, K, H и E. S95 во внеклеточном домене человека представляет собой F в ActRIIA *Gallus Gallus* и *Tyto alba*, что указывает на то, что этот сайт может допускать широкий спектр изменений, включая полярные остатки, такие как E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y и, возможно, гидрофобные остатки, такие как L, I или F. E52 во внеклеточном домене человека представляет собой D в ActRIIA *Ovis aries*, что указывает на то, что в этом положении допустимы кислотные остатки, включая D и E. P29 во внеклеточном домене человека относительно слабо консервативен и появляется как S в ActRIIA *Ovis aries* и L в ActRIIA *Myotis davidii*, таким образом, в этом положении должна допускаться по существу любая аминокислота.

Более того, как обсуждалось выше, белки ActRII были охарактеризованы в данной области техники с точки зрения структурных/функциональных характеристик, особенно в отношении связывания лиганда [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 США №№: 7,709,605, 7,612,041 и 7,842,663]. Например, определяющий структурный мотив, известный как трехпальцевая токсинная складка, важен для связывания лиганда рецепторами I типа и II типа и формируется консервативными цистеиновыми остатками, расположенными в различных положениях во внеклеточном домене каждого мономерного рецептора [Greenwald *et al.* (1999) *Nat Struct Biol* 6:18-22 и Hinck (2012) *FEBS Lett* 586:1860-1870]. В дополнение к изложенным в настоящем документе идеям, эти ссылки

предоставляют достаточное руководство по созданию вариантов ActRII, которые сохраняют одну или несколько желаемых активностей (*например*, лигандсвязывающую активность).

Например, определяющий структурный мотив, известный как трехпальцевая токсинная складка, важен для связывания лиганда рецепторами I типа и II типа и формируется консервативными цистеиновыми остатками, расположенными в различных положениях во внеклеточном домене каждого мономерного рецептора [Greenwald et al. (1999) Nat Struct Biol 6:18-22; and Hinck (2012) FEBS Lett 586:1860-1870]. Соответственно, коровые лигандсвязывающие домены ActRII человека, разграниченные наиболее удаленными из этих консервативных цистеинов, соответствуют положениям 30-110 SEQ ID NO: 1 (предшественник ActRII). Следовательно, структурно менее упорядоченные аминокислоты, фланкирующие эти разграниченные цистеином коровые последовательности, могут быть усечены примерно 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, 28 или 29 остатков на N-конце, и примерно 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 на C-конце без обязательного изменения связывания лиганда. Типовые усечения внеклеточных доменов ActRII включают SEQ ID NO: 2 и 3.

Соответственно, общая формула активной части (*например*, лигандсвязывающей) ActRII представляет собой полипептид, который содержит, состоит по существу из или состоит из аминокислот 30-110 SEQ ID NO: 1. Таким образом, полипептиды ActRII могут, например, содержать, по существу состоять 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 ActRII, начинающейся с остатка, соответствующего любой из аминокислот 21-30 (*например*, начиная с любой из аминокислот 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) SEQ ID NO: 1, и заканчивающейся в положении, соответствующем любой из аминокислот 110-135 (*например*, заканчивающейся любой из аминокислот 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 или 135) SEQ ID NO: 1. Другие примеры включают конструкции, которые начинаются с положения, выбранного из 21-30 (*например*, начиная с любой из аминокислот 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30), 22-30 (*например*, начиная с любой из аминокислот 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30), 23-30 (*например*, начиная с любой из аминокислот 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30), 24-30 (*например*, начиная с любой из аминокислот 24, 25, 26, 27, 28, 29, или 30) SEQ ID NO: 1, и оканчиваются в положении, выбранном из 111-135 (*например*, оканчиваются любой из аминокислот 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 или 135), 112-135 (*например*, оканчиваются любой из аминокислот 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 или 135), 113-135 (*например*, оканчиваются любой из аминокислот 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 или 135), 120-135 (*например*,

оканчиваются любой из аминокислот 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 или 135), 130-135 (*например*, оканчиваются любой из аминокислот 130, 131, 132, 133, 134 или 135), 111-134 (*например*, оканчиваются любой из аминокислот 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), 111-133 (*например*, оканчиваются любой из аминокислот 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132 или 133), 111-132 (*например*, оканчиваются любой из аминокислот 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131 или 132) или 111-131 (*например*, оканчиваются любой из аминокислот 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130 или 131) SEQ ID NO: 1. Также рассматриваются варианты в этих диапазонах, особенно те, которые содержат, по существу состоят из или состоят из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность соответствующей части SEQ ID NO: 1. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, полипептид ActRII может содержать, состоять по существу или состоять из полипептида, который по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен аминокислотам 30-110 SEQ ID NO: 1. Необязательно, полипептиды ActRII содержат полипептид, который по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен аминокислотам 30-110 SEQ ID NO: 1 и содержит не более 1, 2, 5, 10 или 15 консервативных аминокислотных замен в лигандсвязывающем кармане. В некоторых вариантах осуществления, полипептид ActRII является частью гомодимерного белкового комплекса.

В некоторых вариантах осуществления, изобретение относится к полипептиду ActRII (*например*, полипептидам ActRIIA, полипептидам ActRIIB или их комбинациям), который включает его фрагменты, функциональные варианты и модифицированные формы, а также к его использованию (*например*, для снижения риска телеангиэктазии у пациента, получающего терапевтически эффективное количество полипептида ActRII). Предпочтительно, полипептиды ActRII являются растворимыми (*например*, внеклеточный домен ActRII). В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII ингибируют (*например*, передачу сигнала Smad) один или нескольких лигандов GDF/BMP [*например*, GDF11, GDF8, активин А, активин В, GDF3, BMP4, BMP6, BMP10 и/или BMP15]. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII связываются с одним или несколькими лигандами GDF/BMP [*например*, GDF11, GDF8, активином А, активином В, GDF3, BMP4, BMP6, BMP10 и/или BMP15]. В некоторых вариантах осуществления, полипептид ActRII по описанию содержит, состоит по существу 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 ActRII, начинающейся с остатка, соответствующего аминокислотам 21-

30 (*например*, начиная с любой из аминокислот 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) SEQ ID NO: 1 и оканчивающейся положением, соответствующим любой из аминокислот 110-135 (*например*, оканчивающейся любой из аминокислот 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134 или 135) SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII содержат, состоят или по существу 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 30-110 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII содержат, состоят или по существу 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 21-135 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII содержат, состоят или по существу 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 аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 23, 27, 30 и 40.

В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII содержат, состоят или по существу 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 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23. В некоторых альтернативных вариантах осуществления, в полипептиде ActRII (*например*, SEQ ID NO: 23) может отсутствовать С-концевой лизин. В некоторых вариантах осуществления, полипептид ActRII, лишенный С-концевого лизина, имеет SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII содержат, состоят или по существу 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 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления, пациенту вводят полипептид ActRII, содержащий, состоящий или по существу состоящий 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 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления, пациенту вводят полипептид ActRII, содержащий, состоящий или по существу состоящий 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 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления, пациенту вводят комбинацию SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 40.

В некоторых аспектах, настоящее описание относится к полипептидам ActRII (*например*, полипептидам ActRIIA, полипептидам ActRIIB или их комбинациям). В

некоторых вариантах осуществления, ловушки ActRII по настоящему описанию представляют собой варианты полипептидов ActRII (*например*, полипептиды ActRIIA, полипептиды ActRIIB или их комбинации), которые содержат одну или несколько мутаций (*например*, аминокислотные добавления, делеции, замены и их комбинации) во внеклеточном домене (также называемом лигандсвязывающим доменом) полипептида ActRII (*например*, «дикого типа» или немодифицированного полипептида ActRII), так что вариантный полипептид ActRII имеет одну или несколько измененных лигандсвязывающих активностей, чем соответствующий полипептид ActRII дикого типа. В предпочтительных вариантах осуществления, варианты полипептидов ActRII по настоящему описанию сохраняют по меньшей мере одну активность, аналогичную активности соответствующего полипептида ActRII дикого типа. Например, предпочтительные полипептиды ActRII связываются с и ингибируют (*например*, антагонизируют) функцию GDF11 и/или GDF8. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по настоящему описанию дополнительно связываются с и ингибируют один или несколько лигандов GDF/BMP [*например*, GDF11, GDF8, активин А, активин В, GDF3, BMP4, BMP6, BMP10 и/или BMP15]. Соответственно, настоящее описание относится к полипептидам ActRII, которые имеют измененную специфичность связывания в отношении одного или нескольких лигандов ActRII.

Для иллюстрации можно выбрать одну или несколько мутаций, которые повышают селективность измененного лигандсвязывающего домена в отношении GDF11 и/или GDF8 по сравнению с одним или несколькими ActRII-связывающими лигандами, такими как активины (активин А или активин В), особенно, активин А. Необязательно, измененный лигандсвязывающий домен имеет соотношение K_d для связывания активина и K_d для связывания GDF11 и/или GDF8, которое по меньшей мере в 2, 5, 10, 20, 50, 100 или даже 1000 раз больше по сравнению с соотношением для лигандсвязывающего домена дикого типа. Необязательно, измененный лигандсвязывающий домен имеет соотношение IC_{50} для ингибирования активина к IC_{50} для ингибирования GDF11 и/или GDF8, которое по меньшей мере в 2, 5, 10, 20, 50, 100 или даже 1000 раз больше, чем у лигандсвязывающего домена дикого типа. Необязательно, измененный лигандсвязывающий домен ингибирует GDF11 и/или GDF8 с IC_{50} по меньшей мере в 2, 5, 10, 20, 50, 100 или даже 1000 раз меньше, чем IC_{50} для ингибирования активина.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание рассматривает специфические мутации полипептида ActRII (*например*, полипептидов ActRIIA, полипептидов ActRIIB или их комбинаций) с целью изменения гликозилирования полипептида. Такие мутации могут быть выбраны таким образом, чтобы ввести или убрать один или несколько сайтов гликозилирования, таких как O-связанные или N-связанные сайты гликозилирования. Сайты узнавания аспарагин-связанного гликозилирования обычно содержат трипептидную последовательность, аспарагин-Х-треонин или аспарагин-Х-серин (где «Х» представляет собой любую аминокислоту), которая специфически распознается соответствующими клеточными ферментами

гликозилирования. Изменение также может быть осуществлено путем добавления или замены одного или нескольких сериновых или треониновых остатков в последовательности полипептида (для сайтов O-связанного гликозилирования). Разнообразные аминокислотные замены или делеции в одном или обоих из первого или третьего аминокислотных положений сайта узнавания гликозилирования (и/или делеция аминокислоты во втором положении) приводят к отсутствию гликозилирования в модифицированной трипептидной последовательности. Другим способом увеличения количества углеводных фрагментов в полипептиде является химическое или ферментативное связывание гликозидов с полипептидом. В зависимости от используемого способа связывания, сахар(а) может(гут) быть присоединен(ы) к (а) аргинину и гистидину; (b) свободным карбоксильным группам; (c) свободным сульфгидрильным группам, таким как группы цистеина; (d) свободным гидроксильным группам, таким как группы серина, треонина или гидроксипролина; (e) ароматическим остаткам, таким как фенилаланин, тирозин или триптофан; или (f) амидной группе глутамина. Удаление одного или нескольких углеводных фрагментов, присутствующих в полипептиде, можно осуществить химически и/или ферментативно. Химическое дегликозилирование может включать, например, воздействие на полипептид соединения трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентного соединения. Эта обработка приводит к расщеплению большинства или всех сахаров, за исключением связывающего сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), оставляя при этом аминокислотную последовательность неповрежденной. Ферментативное расщепление углеводных фрагментов полипептидов может быть достигнуто использованием различных эндо- и экзогликозидаз, как описано Thotakura *et al.* [Meth. Enzymol. (1987) 138:350]. Последовательность полипептида можно соответствующим образом корректировать в зависимости от типа используемой системы экспрессии, поскольку клетки млекопитающих, дрожжей, насекомых и растений могут иметь различные паттерны гликозилирования, на которые может влиять аминокислотная последовательность пептида. В общем, полипептиды настоящего описания для применения у людей могут быть экспрессированы в клеточной линии млекопитающих, которая обеспечивает надлежащее гликозилирование, такой как клеточные линии HEK293 или CHO, хотя ожидается, что другие экспрессирующие клеточные линии млекопитающих также будут полезны.

Настоящее описание дополнительно рассматривает способ создания мутантов, в частности, наборов комбинаторных мутантов полипептида ActRII (*например*, полипептидов ActRIIA, полипептидов ActRIIB или их комбинаций), а также усеченных мутантов. Пулы комбинаторных мутантов особенно полезны для идентификации функционально активных (*например*, лигандсвязывающих GDF/BMP) последовательностей ActRII. Целью скрининга таких комбинаторных библиотек может быть создание, например, вариантов полипептидов, которые имеют измененные свойства, такие как измененная фармакокинетика или измененное связывание лиганда. Ниже представлены различные скрининговые анализы, и такие анализы можно использовать для

оценки вариантов. Например, варианты ActRII могут быть подвергнуты скринингу на способность связываться с одним или несколькими лигандами GDF/BMP [*например*, GDF11, GDF8, активином А, активином В, GDF3, BMP4, BMP6, BMP10 и/или BMP15] для предотвращения связывания лиганда GDF/BMP с полипептидом ActRII, а также с его гетеромультимерами, и/или препятствования передаче сигнала, вызываемой лигандом GDF/BMP.

Активность полипептидов ActRII (*например*, полипептидов ActRIIA, полипептидов ActRIIB или их комбинаций) или их вариантов также можно тестировать в клеточном или *in vivo* анализе. Например, можно оценить влияние полипептида ActRII на экспрессию генов, участвующих в патогенезе легочной артериальной гипертензии. При необходимости это можно выполнить в присутствии одного или нескольких рекомбинантных белков-лигандов [*например*, GDF11, GDF8, активина А, активина В, GDF3, BMP4, BMP6, BMP10 и/или BMP15], и клетки можно трансфицировать для получения полипептида ActRII и, необязательно, лиганда GDF/BMP. Аналогичным образом, полипептид ActRII можно вводить мышам или другим животным, и его влияние на патогенез легочной артериальной гипертензии можно оценить с использованием признанных в данной области техники способов. Подобным образом, активность полипептида ActRII или его варианта можно тестировать в клетках-предшественниках клеток крови на наличие какого-либо влияния на рост этих клеток, например, с помощью анализов, описанных в настоящем документе и общеизвестных в данной области техники. SMAD-чувствительный ген-репортер можно использовать в таких клеточных линиях для мониторинга эффектов на нижестоящую передачу сигналов.

Могут быть созданы варианты комбинаторного происхождения, которые обладают повышенной селективностью или, как правило, повышенной эффективностью по сравнению с эталонным полипептидом ActRII (*например*, полипептидами ActRIIA, полипептидами ActRIIB или их комбинациями). Такие варианты, экспрессируемые из конструкций рекомбинантной ДНК, можно использовать в протоколах генной терапии. Аналогичным образом, мутагенез может привести к появлению вариантов, периоды внутриклеточной полужизни которых резко отличаются от периода соответствующего немодифицированного полипептида ActRII. Например, измененный белок можно сделать более стабильным или менее стабильным по отношению к протеолитической деградации или другим клеточным процессам, которые приводят к разрушению или иной инактивации немодифицированного полипептида. Такие варианты и гены, которые их кодируют, можно использовать для изменения уровней полипептидных комплексов путем модуляции периода полужизни полипептида. Например, короткий период полужизни может привести к более временным биологическим эффектам и, будучи частью индуцируемой системы экспрессии, может обеспечить более жесткий контроль уровней рекомбинантных полипептидных комплексов внутри клетки. В слитом белке Fc, мутации могут быть произведены в линкере (если таковой имеется) и/или части Fc для изменения периода полужизни полипептида ActRII.

Комбинаторную библиотеку можно получить посредством вырожденной библиотеки генов, кодирующей библиотеку полипептидов, каждая из которых включает по меньшей мере часть потенциальных полипептидных последовательностей ActRII. Например, смесь синтетических олигонуклеотидов можно ферментативно лигировать в генные последовательности, так что вырожденный набор потенциальных нуклеотидных последовательностей, кодирующих ActRII, может быть экспрессирован в виде отдельных полипептидов или, альтернативно, в виде набора 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 провести в автоматическом синтезаторе ДНК, и затем синтетические гены можно лигировать в подходящий вектор для экспрессии. Синтез вырожденных олигонуклеотидов хорошо известен в данной 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 методы могут применяться в направленном развитии 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; Cwirla *et al.*, (1990) *PNAS USA* 87: 6378-6382; а также патенты США №№ 5,223,409, 5,198,346 и 5,096,815].

Альтернативно, для создания комбинаторной библиотеки можно использовать другие формы мутагенеза. Например, полипептиды ActRII по описанию (*например*, полипептиды ActRIIA, полипептиды ActRIIB или их комбинации) могут быть созданы и выделены из библиотеки путем скрининга 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; и Cunningham *et al.* (1989) *Science* 244:1081-1085], линкер-сканирующего мутагенеза [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]; насыщающего мутагенеза [Meyers *et al.*, (1986) *Science* 232:613]; ПЦР-мутагенеза [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; и Greener *et al.* (1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34]. Линкер-сканирующий мутагенез, особенно в комбинаторном режиме, является привлекательным способом идентификации усеченных (биоактивных) форм полипептидов ActRII.

В данной области техники известен широкий спектр методов скрининга генных продуктов комбинаторных библиотек, полученных посредством точечных мутаций и усечений, и, в этом отношении, скрининга библиотек кДНК на наличие генных продуктов, обладающих определенным свойством. Такие методы обычно можно адаптировать для

быстрого скрининга библиотек генов, полученных в результате комбинаторного мутагенеза полипептидов ActRII (*например*, полипептидов ActRIIA, полипептидов ActRIIB или их комбинаций). Наиболее широко используемые методы скрининга больших библиотек генов обычно включают клонирование библиотеки генов в реплицируемые векторы экспрессии, трансформацию соответствующих клеток с полученной библиотекой векторов, и экспрессию комбинаторных генов в условиях, в которых обнаружение желаемой активности облегчает относительно легкое выделение вектора, кодирующего ген, продукт которого был обнаружен. Предпочтительные анализы включают анализы связывания лигандов [*например*, GDF11, GDF8, активина А, активина В, GDF3, BMP4, BMP6, BMP10 и/или BMP15] и/или анализы лиганд-опосредованной клеточной сигнализации.

Как будет понятно специалисту в данной области техники, большинство описанных в настоящем документе мутаций, вариантов или модификаций могут быть сделаны на уровне нуклеиновой кислоты или, в некоторых случаях, посредством пост-трансляционной модификации или химического синтеза. Такие методы хорошо известны в данной области техники, и некоторые из них описаны в настоящем документе. Частично, настоящее описание идентифицирует функционально активные части (фрагменты) и варианты полипептидов ActRII (*например*, полипептидов ActRIIA, полипептидов ActRIIB или их комбинаций), которые можно использовать в качестве руководства для создания и использования других вариантов полипептидов ActRII в рамках объема настоящего описания, предложенного в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, функционально активные фрагменты полипептидов ActRII по настоящему описанию можно получить путем скрининга полипептидов, рекомбинантно продуцированных из соответствующего фрагмента нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид ActRII. Кроме того, фрагменты могут быть химически синтезированы с использованием методов, известных в данной области техники, таких как обычная твердофазная химия Меррифилда f-Мос или t-Вос. Фрагменты могут быть продуцированы (рекомбинантно или путем химического синтеза) и протестированы для идентификации тех пептидных фрагментов, которые могут действовать как антагонисты (ингибиторы) рецепторов ActRII и/или одного или нескольких лигандов [*например*, GDF11, GDF8, активина А, активина В, GDF3, BMP4, BMP6, BMP10 и/или BMP15].

В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по настоящему изобретению (*например*, полипептиды ActRIIA, полипептиды ActRIIB или их комбинации) могут дополнительно содержать пост-трансляционные модификации в дополнение к любым, которые в природе присутствуют в полипептиде ActRII. Такие модификации включают, но не ограничены ими, ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, липидирование и ацилирование. В результате, полипептид ActRII может содержать не аминокислотные элементы, такие как полиэтиленгликоли, липиды, полисахариды или моносахариды и фосфаты. Влияние таких

не аминокислотных элементов на функциональность полипептида-ловушки лиганда можно тестировать, как описано в настоящем документе, для других вариантов ActRII. Когда полипептид по настоящему изобретению продуцируется в клетках путем расщепления возникающей формы полипептида, пост-трансляционный процессинг также может быть важен для правильного сворачивания и/или функции белка. Различные клетки (*например*, CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 или HEK293) обладают специфическим клеточным механизмом и характерными механизмами для такой посттрансляционной активности, и могут быть выбраны для обеспечения правильной модификации и процессинга полипептидов ActRII.

В некоторых аспектах, полипептиды ActRII по настоящему описанию (*например*, полипептиды ActRIIA, полипептиды ActRIIB или их комбинации) включают слитые белки, имеющие по меньшей мере часть (домен) полипептида ActRII и одну или несколько гетерологичных частей (доменов). Хорошо известные примеры таких слитых доменов включают, но не ограничены ими, полигистидин, Glu-Glu, глутатион-S-трансферазу (GST), тиоредоксин, белок А, белок G, константную область тяжелой цепи иммуноглобулина (Fc), мальтоза-связывающий белок (MBP) или сывороточный альбумин человека. Домен слияния может быть выбран так, чтобы придавать желаемое свойство. Например, некоторые слитые домены особенно полезны для выделения слитых белков с помощью аффинной хроматографии. С целью аффинной очистки, используют соответствующие матрицы для аффинной хроматографии, такие как глутатион-, амилаза-, никель- или кобальт-конъюгированные смолы. Многие из таких матриц доступны в форме «набора», например, система очистки Pharmacia GST и система QIAexpress™ (Qiagen), используемая с партнерами по слиянию (HIS₆) (SEQ ID NO: 39). В качестве другого примера можно выбрать слитый домен так, чтобы облегчить обнаружение полипептида ActRII. Примеры таких доменов обнаружения включают различные флуоресцентные белки (*например*, GFP), а также «эпитопные метки», которые обычно представляют собой короткие пептидные последовательности, для которых доступны специфические антитела. Хорошо известные эпитопные метки, для которых легко доступны специфические моноклональные антитела, включают метки FLAG, гемагглютинин вируса гриппа (HA) и с-тус. В некоторых случаях, слитые домены имеют сайт расщепления протеазой, такой как фактор Ха или тромбин, который позволяет соответствующей протеазе частично переваривать слитые белки и тем самым высвободить из них рекомбинантные белки. Высвобожденные белки затем можно выделить из домена слияния путем последующего хроматографического разделения. Другие типы слитых доменов, которые могут быть выбраны, включают мультимеризующие (*например*, димеризующие, тетрамеризующие) домены и функциональные домены (которые придают дополнительную биологическую функцию), включая, например, константные домены из иммуноглобулинов (*например*, домены Fc).

В некоторых аспектах, полипептиды ActRII по настоящему описанию (*например*, полипептиды ActRIIA, полипептиды ActRIIB или их комбинации) содержат одну или

несколько модификаций, которые способны «стабилизировать» полипептиды. Под «стабилизацией» подразумевается все, что увеличивает период полужизни *in vitro*, период полужизни в сыворотке, независимо от того, происходит ли это из-за снижения разрушения, снижения клиренса почками или другого фармакокинетического эффекта агента. Например, такие модификации увеличивают срок хранения полипептидов, увеличивают период полужизни полипептидов в кровотоке и/или уменьшают протеолитическую деградацию полипептидов. Такие стабилизирующие модификации включают, но не ограничены ими, слитые белки (включая, например, слитые белки, содержащие полипептидный домен ActRII и стабилизирующий домен), модификации сайта гликозилирования (включая, например, добавление сайта гликозилирования к полипептиду по описанию) и модификации углеводного фрагмента (включая, например, удаление углеводных фрагментов из полипептида по описанию). В настоящем документе термин «домен-стабилизатор» не только относится к слитому домену (*например*, домену Fc иммуноглобулина), как в случае слитых белков, но также включает небелковые модификации, такие как углеводный фрагмент, или небелковый фрагмент, такой как полиэтиленгликоль. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, полипептид ActRII слит с гетерологичным доменом, который стабилизирует полипептид (домен-«стабилизатор»), предпочтительно, с гетерологичным доменом, который повышает стабильность полипептида *in vivo*. Известно, что слияния с константным доменом иммуноглобулина (*например*, доменом Fc) придают желаемые фармакокинетические свойства широкому спектру белков. Аналогичным образом, слияние с сывороточным альбумином человека может придавать желаемые свойства.

Пример нативной аминокислотной последовательности, которую можно использовать для Fc части IgG1 человека (G1Fc), показан ниже (SEQ ID NO: 11). Пунктирное подчеркивание указывает шарнирную область, и сплошное подчеркивание указывает на положения с вариантами, существующими в природе. Частично, изобретение предлагает полипептиды, содержащие, состоящие по существу из или состоящий из аминокислотных последовательностей с 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 11. Существующие в природе варианты G1Fc будут включать E134D и M136L в соответствии с системой нумерации, используемой в SEQ ID NO: 11 (см. Uniprot P01857).

```

1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51  VKFNWYVDGV  EVHNAKTKPR  EEQYNSTYRV  VSVLTVLHQD
WLVNGKEYKCK

101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSREEMTKNQ VSLTCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSL S LSPGK (SEQ ID NO: 11)

```

Необязательно, домен Fc IgG1 имеет одну или несколько мутаций в таких остатках, как Asp-265, лизин 322 и Asn-434. В некоторых случаях, мутантный домен Fc IgG1, имеющий одну или несколько из этих мутаций (*например*, мутацию Asp-265), имеет

пониженную способность связывания с рецептором Fc γ по сравнению с доменом Fc дикого типа. В других случаях, мутантный домен Fc, имеющий одну или несколько из этих мутаций (*например*, мутацию Asn-434), обладает повышенной способностью связываться с рецептором Fc, родственным МНС I класса (FcRN), по сравнению с доменом Fc IgG1 дикого типа.

Пример нативной аминокислотной последовательности, которую можно использовать для Fc части IgG2 человека (G2Fc), показан ниже (SEQ ID NO: 12). Пунктирное подчеркивание указывает шарнирную область, и двойное подчеркивание указывает положения, где в последовательности возникают конфликты баз данных (согласно UniProt P01859). Частично, изобретение предлагает полипептиды, содержащие, состоящие по существу из или состоящие из аминокислотных последовательностей с 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 12.

```

1 VECPPCPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ
51 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL
NGKEYKCKVS
101 NKGLPAPIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFPY
151 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PMLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
201 CSVMHEALHN NYTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 12)

```

Два примера аминокислотных последовательностей, которые можно использовать для Fc части IgG3 человека (G3Fc), показаны ниже. Шарнирная область в G3Fc может быть вплоть до четырех раз длиннее, чем в других цепях Fc, и содержит три идентичных сегмента по 15 остатков, которым предшествует аналогичный сегмент из 17 остатков. Первая последовательность G3Fc, показанная ниже (SEQ ID NO: 13), содержит короткую шарнирную область, состоящую из одного сегмента из 15 остатков, тогда как вторая последовательность G3Fc (SEQ ID NO: 14) содержит полноразмерную шарнирную область. В каждом случае, пунктирное подчеркивание указывает шарнирную область, и сплошное подчеркивание указывает на положения с вариантами, существующими в природе, согласно UniProt P01859. Частично, изобретение предлагает полипептиды, содержащие, состоящие по существу из или состоящие из аминокислотных последовательностей с 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 13 и 14.

```

1 EPKSCDTPPP CPRCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
51 VSHEDPEVQF KQYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTFRVVS
LTVLHQDWLN
101 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
151 TCLVKGFPYPS DIAVEWESSG QPENNYNTTP PMLDSGDSFF LYSKLTVDKS
201 RWQQGNIFSC SVMHEALHNR FTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 13)
1 ELKTPLGDTT HTCPRCPEPK SCDTPPPCPR CPEPKSCDTP PPCPRCPEPK
51 SCDTPPPCPR CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTP E VTCVVVDVSH

```

101 EDPEVQFKWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TFRVVSVLTV
LHQDWLNGKE

151 YKCKVSNKAL PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL

201 VKGFYPSDIA VEWESGQPE NNYNTTPPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ

251 QGNIFSCSVM HEALHNRFQT KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 14)

Существующие в природе варианты G3Fc (например, см. Uniprot P01860) включают E68Q, P76L, E79Q, Y81F, D97N, N100D, T124A, S169N, S169del, F221Y при преобразовании в систему нумерации, используемую в SEQ ID NO: 13, и настоящее описание предлагает слитые белки, содержащие домены G3Fc, содержащие один или несколько из этих вариантов. Кроме того, ген иммуноглобулина IgG3 человека (*IGHG3*) демонстрирует структурный полиморфизм, характеризующийся различными длинами шарнира [см. Uniprot P01859]. В частности, в варианте WIS отсутствует большая часть области V и вся область CH1. Он имеет дополнительную межцепочечную дисульфидную связь в положении 7 в дополнение к 11, обычно присутствующей в шарнирной области. В варианте ZUC отсутствует большая часть области V, вся область CH1 и часть шарнира. Вариант OMM может представлять собой аллельную форму или другой подкласс гамма-цепи. Настоящее описание предлагает дополнительные слитые белки, содержащие домены G3Fc, содержащие один или несколько из этих вариантов.

Пример нативной аминокислотной последовательности, которую можно использовать для Fc части IgG4 человека (G4Fc), показан ниже (SEQ ID NO: 15). Пунктирное подчеркивание указывает на шарнирную область. Частично, описание предлагает полипептиды, содержащие, состоящие по существу из или состоящие из аминокислотных последовательностей с 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 15.

1 ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ

51 EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV
LHQDWLNGKE

101 YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL

151 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPV L DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ

201 EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK (SEQ ID NO: 15)

В настоящем документе представлены различные сконструированные мутации в домене Fc в отношении последовательности G1Fc (SEQ ID NO: 11), и аналогичные мутации в G2Fc, G3Fc и G4Fc могут быть получены в результате их выравнивания с G1Fc на **Фигуре 3**. Из-за неравных длин шарнира, аналогичные положения Fc, основанные на выравнивании изотипов (**Фигура 3**), имеют разные номера аминокислот в SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14 и 15. Также можно понять, что данное положение аминокислоты в последовательности иммуноглобулина, состоящей из шарнира, областей C_{H2} и C_{H3} (например, SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14 и 15), будет идентифицироваться номером, отличным от того же положения, когда нумерация охватывает весь константный домен

тяжелой цепи IgG1 (состоящий из C_{H1}, шарнирной области, C_{H2} и C_{H3}), как в базе данных Uniprot. Например, соответствие между выбранными положениями C_{H3} в последовательности G1Fc человека (SEQ ID NO: 11), константном домене тяжелой цепи IgG1 человека (Uniprot P01857) и тяжелой цепи IgG1 человека является следующим.

Соответствие положений C _{H3} в разных системах нумерации		
G1Fc (Нумерация начинается на первом треонине в шарнирной области)	Константный домен тяжелой цепи IgG1 (Нумерация начинается на C _{H1})	Тяжелая цепь IgG1 (Схема нумерации EU из 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 в <i>Sequences of Proteins of Immunological Interest</i> , 5 th ed., Vol. 1, NIH, Bethesda, MD.		

В данной области известны различные способы, которые увеличивают желаемое спаривание Fc-содержащих слитых полипептидных цепей в одной клеточной линии с получением предпочтительного асимметричного слитого белка с приемлемыми выходами [Klein et al (2012) *mAbs* 4:653-663; и Spiess et al (2015) *Molecular Immunology* 67(2A): 95-106]. Способы получения желаемого спаривания Fc-содержащих цепей включают, но не ограничены ими, спаривание на основе заряда (электростатическое взаимодействие), пространственное спаривание «выступы во впадины», спаривание SEEDbody и спаривание на основе лейциновой молнии [Ridgway et al (1996) *Protein Eng* 9:617-621; Merchant et al (1998) *Nat Biotech* 16:677-681; Davis et al (2010) *Protein Eng Des Sel* 23:195-202; Gunasekaran et al (2010); 285:19637-19646; Wranik et al (2012) *J Biol Chem* 287:43331-43339; US5932448; WO 1993/011162; WO 2009/089004, и WO 2011/034605].

Понятно, что различные элементы слитых белков (*например*, слитых белков Fc иммуноглобулина) могут быть расположены любым образом, который соответствует желаемой функциональности. Например, полипептидный домен ActRII может быть размещен на C-конце гетерологичного домена или, альтернативно, гетерологичный домен может быть размещен на C-конце по отношению к полипептидному домену ActRII.

Полипептидный домен ActRII и гетерологичный домен не обязательно должны быть соседними в слитом белке, и дополнительные домены или аминокислотные последовательности могут быть включены на С- или N-конце любого домена или между доменами.

Например, слитый белок рецептора ActRII может содержать аминокислотную последовательность, представленную формулой А-В-С. Часть В соответствует домену полипептида ActRII (*например*, полипептидов ActRIIA, полипептидов ActRIIB или их комбинаций). Части А и С могут независимо состоять из нуля, одной или более чем одной аминокислоты, и обе части А и С, если они присутствуют, гетерологичны В. Части А и/или С могут быть присоединены к части В через линкерную последовательность. Линкер может быть богат глицином (*например*, 2-10, 2-5, 2-4, 2-3 глициновых остатка) или глициновыми и пролиновыми остатками и может, *например*, содержать одну последовательность треонина/серина и глицинов или повторяющиеся последовательности треонина/серина и/или глицинов, *например*, синглеты GGG (SEQ ID NO: 16), GGGG (SEQ ID NO: 17), TGGGG (SEQ ID NO: 18), SGGGG (SEQ ID NO: 19), TGGG (SEQ ID NO: 20), SGGG (SEQ ID NO: 21) или GGGGS (SEQ ID NO: 22) или повторы. В некоторых вариантах осуществления, слитый белок ActRII содержит аминокислотную последовательность, представленную формулой А-В-С, где А представляет собой лидерную (сигнальную) последовательность, В состоит из полипептидного домена ActRII, и С представляет собой часть полипептида, которая усиливает одно или несколько из стабильности *in vivo*, периода полужизни *in vivo*, поглощения/введения, локализации или распределения в тканях, образования белковых комплексов и/или очистки. В некоторых вариантах осуществления, слитый белок ActRII содержит аминокислотную последовательность, представленную формулой А-В-С, где А представляет собой лидерную последовательность ТРА, В состоит из полипептидного домена рецептора ActRII, и С представляет собой домен Fc иммуноглобулина. Предпочтительные слитые белки содержат аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 23, 27, 30 и 40.

В предпочтительных вариантах осуществления, полипептиды ActRII, используемые в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, представляют собой выделенные полипептиды. В настоящем документе, выделенный белок или полипептид представляет собой белок, который был отделен от компонента его естественного окружения. В некоторых вариантах осуществления, полипептид по настоящему изобретению очищают до чистоты более 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по данным, *например*, электрофореза (*например*, SDS-PAGE, изоэлектрического фокусирования (IEF), капиллярного электрофореза) или хроматографии (*например*, ионообменной или обращенно-фазовой ВЭЖХ). Способы оценки чистоты хорошо известны в данной области техники [см., *например*, Flatman *et al.*, (2007) J. Chromatogr. B 848:79-87]. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII, которые следует использовать в соответствии со способами, описанными в настоящем документе,

представляют собой рекомбинантные полипептиды.

Полипептиды ActRII по настоящему изобретению могут быть получены различными известными в данной области методами. Например, полипептиды по настоящему изобретению можно синтезировать с использованием стандартных методов белковой химии, таких как описаны в 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, коммерчески доступны автоматизированные синтезаторы пептидов (*например*, Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Bioscience 9600). Альтернативно, полипептиды по настоящему изобретению, включая их фрагменты или варианты, могут быть получены рекомбинантно с использованием различных систем экспрессии [*например*, E.coli, клеток яичника китайского хомячка (CHO), клеток COS, бакуловируса], как хорошо известно в данной области техники. В дополнительном варианте осуществления, модифицированные или не модифицированные полипептиды по настоящему изобретению могут быть получены путем расщепления рекомбинантно полученных полноразмерных полипептидов ActRII с использованием, например, протеазы, *например*, трипсина, термолизина, химотрипсина, пепсина или фермента, расщепляющего белок в месте спаренных основных аминокислот (PASE). Компьютерный анализ (с использованием коммерчески доступного программного обеспечения, *например* MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) можно использовать для идентификации сайтов протеолитического расщепления. Альтернативно, такие полипептиды могут быть получены из рекомбинантно полученных полноразмерных полипептидов ActRII с использованием химического расщепления (*например*, бромистого цианогена, гидроксилamina и *т.д.*).

3. Нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды ActRII

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание предлагает выделенные и/или рекомбинантные нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды ActRII (*например*, полипептиды ActRIIA, полипептиды ActRIIB или их комбинации), включая их фрагменты, функциональные варианты и слитые белки.

В настоящем документе, выделенная(ые) нуклеиновая(ые) кислота(ы) относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая была отделена от компонента ее естественного окружения. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые обычно содержат молекулу нуклеиновой кислоты, но молекула нуклеиновой кислоты присутствует внехромосомно или в хромосомном положении, отличном от ее естественного хромосомного положения.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды ActRII по описанию, включают нуклеиновые кислоты, которые являются вариантами любой из SEQ ID NO: 4, 5 или 28. Вариантные нуклеотидные последовательности включают последовательности, которые отличаются одной или несколькими нуклеотидными заменами, добавлениями или делециями, включая аллельные варианты, и, следовательно, будут включать кодирующую последовательность,

которая отличается от нуклеотидной последовательности, обозначенной в любой из SEQ ID NO: 4, 5 или 28.

В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию кодируются выделенными и/или рекомбинантными последовательностями нуклеиновой кислоты, 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: 4, 5 или 28. Специалисту в данной области техники будет понятно, что последовательности нуклеиновой кислоты, 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: 4, 5 или 28, и их варианты также входят в объем настоящего описания. В дополнительных вариантах осуществления, последовательности нуклеиновой кислоты по описанию могут быть выделенными, рекомбинантными и/или слитыми с гетерологичной нуклеотидной последовательностью, или находиться в библиотеке ДНК.

В других вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты по настоящему описанию также включают нуклеотидные последовательности, которые гибридизуются в очень жестких условиях с нуклеотидной последовательностью, обозначенной в SEQ ID NO: 4, 5 или 28, комплементарными последовательностями SEQ ID NO: 4, 5 или 28 или их фрагментами. Как обсуждалось выше, специалист в данной области техники легко поймет, что подходящие условия жесткости, которые способствуют гибридизации ДНК, могут быть изменены. Специалист в данной области техники легко поймет, что подходящие условия жесткости, которые способствуют гибридизации ДНК, могут быть изменены. Например, можно провести гибридизацию при 6,0 x хлорид натрия/цитрат натрия (SSC) при температуре примерно 45°C с последующей промывкой 2,0 x SSC при 50°C. Например, концентрация соли на стадии промывки может быть выбрана от условий низкой жесткости примерно 2,0 x SSC при 50°C до условий высокой жесткости примерно 0,2 x SSC при 50°C. Кроме того, температура на стадии промывки может быть повышена от условий низкой жесткости при комнатной температуре, примерно 22°C, до условий высокой жесткости при температуре примерно 65°C. И температуру, и соль можно варьировать, или температуру или концентрацию соли можно поддерживать постоянными, в то время как другая переменная изменяется. В одном варианте осуществления, описания предлагают нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются в условиях низкой жесткости 6 x SSC при комнатной температуре с последующей промывкой при 2 x SSC при комнатной температуре.

Выделенные нуклеиновые кислоты, которые отличаются от нуклеиновых кислот, указанных в SEQ ID NO: 4, 5 или 28, вырожденностью генетического кода, также входят в объем описания. Например, ряд аминокислот обозначаются более чем одним триплетом. Кодоны, определяющие одну и ту же аминокислоту, или синонимы (например, CAU и CAC являются синонимами гистидина) могут приводить к «молчащим» мутациям, которые не влияют на аминокислотную последовательность белка. Однако ожидается, что

среди клеток млекопитающих будут существовать полиморфизмы последовательностей ДНК, которые действительно приводят к изменениям аминокислотных последовательностей рассматриваемых белков. Специалисту в данной области техники будет понятно, что эти вариации в одном или нескольких нуклеотидах (до примерно 3-5% нуклеотидов) нуклеиновых кислот, кодирующих конкретный белок, могут существовать среди особей данного вида вследствие естественных аллельных вариаций. Любые и все такие вариации нуклеотидов и полученные полиморфизмы аминокислот входят в объем описания.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты по настоящему описанию могут быть функционально связаны с одной или несколькими регуляторными нуклеотидными последовательностями в конструкции экспрессии. Регуляторные нуклеотидные последовательности обычно подходят для клетки-хозяина, используемой для экспрессии. В данной области техники известны многочисленные типы подходящих векторов экспрессии и подходящих регуляторных последовательностей, которые можно использовать в различных клетках-хозяевах. Обычно одна или несколько регуляторных нуклеотидных последовательностей могут включать, но не ограничены ими, промоторные последовательности, лидерные или сигнальные последовательности, сайты связывания рибосом, последовательности начала и терминации транскрипции, последовательности начала и терминации трансляции, и последовательности энхансера или активатора. В настоящем описании рассматриваются конститутивные или индуцируемые промоторы, известные в данной области техники. Промоторы могут быть либо существующими в природе промоторами, либо гибридными промоторами, которые сочетают в себе элементы более чем одного промотора. Конструкция экспрессии может присутствовать в клетке на эписоме, такой как плаزمид, или конструкция экспрессии может быть встроена в хромосому. В некоторых вариантах осуществления, вектор экспрессии содержит селективируемый маркерный ген, позволяющий осуществлять селекцию трансформированных клеток-хозяев. Гены селективных маркеров хорошо известны в данной области техники и могут варьироваться в зависимости от используемой клетки-хозяина.

В некоторых аспектах, рассматриваемая нуклеиновая кислота, описанная в настоящем документе, предложена в векторе экспрессии, содержащем нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид ActRII (*например*, полипептиды ActRIIA, полипептиды ActRIIB или их комбинации), функционально связанную по меньшей мере с одной регуляторной последовательностью. Регуляторные последовательности известны в данной области техники и выбраны для управления экспрессией полипептида ActRII. Соответственно, термин «регуляторная последовательность» включает промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии. Типовые регуляторные последовательности описаны в Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, CA (1990). Например, лбе из множества последовательностей контроля экспрессии, которые контролируют экспрессию

последовательности ДНК, будучи функционально связанными с ней, могут быть использованы в этих векторах для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих полипептид ActRII. Такие полезные последовательности контроля экспрессии включают, например, ранний и поздний промоторы SV40, промотор *tet*, немедленно ранний промотор аденовируса или цитомегаловируса, промоторы RSV, систему *lac*, систему *trp*, систему TAC или TRC, промотор T7, экспрессия которого управляется T7 РНК полимеразой, основной оператор и промоторные области фага лямбда, контрольные области белка оболочки fd, промотор 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, промоторы кислой фосфатазы, *например*, Pho5, промоторы α -факторов спаривания дрожжей, промотор полиэдра бакуловирусной системы и другие последовательности, которые, как известно, контролируют экспрессию генов прокариотических или эукариотических клеток или их вирусов, а также их различные комбинации. Следует понимать, что конструкция вектора экспрессии может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, и/или типа белка, который желательно экспрессировать. Кроме того, следует также учитывать количество копий вектора, возможность контролировать это количество копий и экспрессию любого другого белка, кодируемого вектором, например маркеров антибиотиков.

Рекомбинантный нуклеиновая кислота по настоящему описанию может быть получена путем лигирования клонированного гена или его части в вектор, подходящий для экспрессии либо в прокариотических клетках, либо в эукариотических клетках (дрожжей, птиц, насекомых или млекопитающих), либо в тех и других. Средства экспрессии для получения рекомбинантного полипептида ActRII включают плазмиды и другие векторы. Например, подходящие векторы включают плазмиды следующих типов: pBR322-производные плазмиды, pEMBL-производные плазмиды, pEX-производные плазмиды, pVTac-производные плазмиды и pUC-производные плазмиды для экспрессии в прокариотических клетках, таких как *E. coli*.

Некоторые векторы экспрессии млекопитающих содержат как прокариотические последовательности, для облегчения распространения вектора в бактериях, так и одну или несколько эукариотических единиц транскрипции, которые экспрессируются в эукариотических клетках. Векторы, производные из pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo и pNyg, являются примерами векторов экспрессии млекопитающих, подходящих для трансфекции эукариотических клеток. Некоторые из этих векторов модифицированы последовательностями бактериальных плазмид, таких как pBR322, для облегчения репликации и селекции лекарственной резистентности как в прокариотических, так и в эукариотических клетках. Альтернативно, для временной экспрессии белков в эукариотических клетках можно использовать производные вирусов, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота (BPV-1) или вирус Эпштейн-Барр (pHEBo, pREP-производный и p205). Примеры других вирусных (в том числе ретровирусных) систем экспрессии можно найти ниже в описании систем доставки генной терапии. Различные

способы, используемые при получении плазмид и трансформации организмов-хозяев, хорошо известны в данной области техники. Для других подходящих систем экспрессии как для прокариотических, так и для эукариотических клеток, а также для общих рекомбинантных процедур, *например*, 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 использованием бакуловирусной системы экспрессии. Примеры таких бакуловирусных систем экспрессии включают pVL-производные векторы (такие как pVL1392, pVL1393 и pVL941), pAcUW-производные векторы (такие как pAcUW1) и pBlueBac-производные векторы (такие как β -gal, содержащий pBlueBac III).

В предпочтительном варианте осуществления, будет сконструирован вектор для продуцирования рассматриваемых полипептидов ActRII в клетках CHO, такой как вектор Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), векторы pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) и векторы pCI-neo (Promega, Madison, Wisc.). Как будет очевидно, рассматриваемые генные конструкции можно использовать для того, чтобы вызвать экспрессию рассматриваемых полипептидов ActRII в клетках, размноженных в культуре, *например*, для получения белков, включая слитые белки или варианты белков, для очистки.

Настоящее описание также относится к клетке-хозяину, трансфицированной рекомбинантным геном, включающим кодирующую последовательность одного или нескольких рассматриваемых полипептидов ActRII. Клетка-хозяин может представлять собой любую прокариотическую или эукариотическую клетку. Например, полипептид ActRII по описанию может экспрессироваться в бактериальных клетках, таких как *E.coli*, клетках насекомых (*например*, с использованием системы экспрессии бакуловируса), дрожжах или клетках млекопитающих [*например*, клеточной линии яичника китайского хомячка (CHO)]. Другие подходящие клетки-хозяева известны специалистам в данной области техники.

Соответственно, настоящее описание дополнительно относится к способам продуцирования рассматриваемых полипептидов ActRII. Например, клетку-хозяина, трансфицированную вектором экспрессии, кодирующим полипептид ActRII, можно культивировать в соответствующих условиях, чтобы обеспечить возможность экспрессии полипептида ActRII. Полипептид может быть секретирован и выделен из смеси клеток и среды, содержащей полипептид. Альтернативно, полипептид ActRII можно сохранить в цитоплазме или в мембранной фракции, и клетки можно собрать, лизировать и выделить белок. Клеточная культура включает клетки-хозяева, среду и другие побочные продукты. Подходящие среды для культуры клеток хорошо известны в данной области техники. Рассматриваемые полипептиды могут быть выделены из среды клеточной культуры, клеток-хозяев или того и другого, используя методы, известные в данной области техники для очистки белков, включая ионообменную хроматографию, гель-фильтрационную хроматографию, ультрафильтрацию, электрофорез, иммуноаффинную очистку с антителами, специфичными к конкретным эпитопам полипептидов ActRII, и аффинную

очистку с помощью агента, который связывается с доменом, слитым с полипептидом ActRII (*например*, колонку с белком А можно использовать для очистки слитых белков ActRII-Fc). В некоторых вариантах осуществления, полипептид ActRII представляет собой слитый белок, содержащий домен, который облегчает его очистку.

В некоторых вариантах осуществления, очистка достигается с помощью серии стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих, в любом порядке: хроматография на белке А, хроматография на Q-сефарозе, хроматография на фенилсефарозе, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершить вирусной фильтрацией и заменой буфера. Белок ActRII может быть очищен до чистоты >90%, >95%, >96%, >98% или >99% по данным эксклюзионной хроматографии, и >90%, >95%, >96%, >98% или >99% по данным SDS PAGE. Целевой уровень чистоты должен быть достаточным для достижения желаемых результатов в системах млекопитающих, особенно приматах, не являющихся человеком, грызунах (мышях) и людях.

В другом варианте осуществления, гибридный ген, кодирующий лидерную последовательность очистки, такую как последовательность сайта расщепления поли-(His)/энтерокиназой на N-конце желаемой части рекомбинантного полипептида ActRII, может обеспечить очистку экспрессированного слитого белка аффинной хроматографией с использованием металлической смолы Ni²⁺. Лидерную последовательность очистки затем можно впоследствии удалить обработкой энтерокиназой с получением очищенного полипептида ActRII. См., *например*, Hochuli *et al.* (1987) *J. Chromatography* 411:177; и Janknecht *et al.* (1991) *PNAS USA* 88:8972.

Методы создания слитых генов хорошо известны. По существу, соединение различных фрагментов ДНК, кодирующих разные полипептидные последовательности, осуществляют в соответствии с традиционными методами, используя концы с тупыми или ступенчатыми концами для лигирования, перевар рестрикционными ферментами для получения соответствующих концов, заполнение липких концов по мере необходимости, обработка щелочной фосфатазой во избежание нежелательного соединения и ферментативное лигирование. В другом варианте осуществления, слитый ген можно синтезировать обычными методами, включая автоматические синтезаторы ДНК. Альтернативно, ПЦР амплификация фрагментов гена может быть проведена с использованием якорных праймеров, которые вызывают образование комплементарных липких концов между двумя последовательными фрагментами гена, которые впоследствии можно отжигать для создания химерной последовательности гена. См., *например*, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons: 1992.

4. Способы использования

Частично, настоящее описание относится к способам снижения риска телеангиэктазии у пациента, получающего терапевтически эффективное количество полипептида ActRII, описанного в настоящем документе, где способ включает введение

полипептида ActRII по схеме дозирования, включающей: (i) введение пациенту первой дозы полипептида ActRII в количестве 0,3 мг/кг; и (ii) введение пациенту второй дозы полипептида ActRII в количестве 0,7 мг/кг; при этом третью дозу начинают, если у пациента проявляются симптомы или имеются факторы риска развития телеангиэктазии, тем самым снижая риск телеангиэктазии. В некоторых вариантах осуществления, пациент получает терапевтически эффективное количество полипептида ActRII, описанного в настоящем документе, для лечения легочной артериальной гипертензии (РАН).

Эти способы, в частности, направлены на терапевтическое и профилактическое лечение животных и, более конкретно, человека. Термины «субъект», «индивидуум» или «пациент» являются взаимозаменяемыми во всем описании и относятся как к человеку, так и к животному, не являющемуся человеком. Эти термины включают млекопитающих, таких как люди, приматы, не являющиеся человеком, лабораторные животные, домашний скот (включая крупный рогатый скот, свиней, верблюдов и т. д.), домашние животные (например, собаки, кошки, другие домашние животные и т. д.) и грызуны (например, мыши и крысы). В конкретных вариантах осуществления, пациент, субъект или индивидуум представляет собой человека.

Термины «лечение», «лечить», «облегчение» и подобные используются в настоящем документе для обозначения достижения желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта, а также могут использоваться для обозначения улучшения, облегчения и/или снижения тяжести одного или нескольких клинических осложнений состояния, подлежащего лечению (например, снижения риска телеангиэктазии у пациента, получающего терапевтически эффективное количество полипептида ActRII). Эффект может быть профилактическим в смысле полной или частичной задержки начала или рецидива заболевания, состояния или его осложнений, и/или может быть терапевтическим в смысле частичного или полного излечения заболевания или состояния и/или неблагоприятного эффекта, присущего заболеванию или состоянию. Термин «лечение» в настоящем документе охватывает любое лечение заболевания или состояния млекопитающего, особенно человека. В настоящем документе, термин терапевтический агент, который «предотвращает» нарушение или состояние, относится к соединению, которое, в статистической выборке, снижает возникновение нарушения или состояния в обработанном образце по сравнению с необработанным контрольным образцом, или задерживает начало заболевания или состояния по сравнению с необработанным контрольным образцом.

В общем, лечение или профилактика заболевания или состояния, как описано в настоящем описании (например, снижение риска телеангиэктазии у пациента, получающего терапевтически эффективное количество полипептида ActRII) достигается путем введения одного или нескольких полипептидов ActRII по настоящему описанию в «эффективном количестве». Эффективное количество агента относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического или профилактического результата. «Терапевтически

эффективное количество» агента по настоящему описанию может варьироваться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и вес индивидуума, и способность агента вызывать желаемый ответ у индивидуума. «Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата.

В некоторых аспектах, описание рассматривает применение полипептида ActRII в комбинации с одним или несколькими дополнительными активными агентами или другой поддерживающей терапией для лечения или профилактики заболевания или состояния (*например*, снижения риска телеангиэктазии у пациента, получающего терапевтически эффективное количество полипептида ActRII). В настоящем документе, термины «в комбинации с», «комбинации», «комбинированное» или «совместное» введение относятся к любой форме введения, такой, чтобы дополнительные активные агенты или поддерживающие терапии (*например*, вторая, третья, четвертая и т.д.) были по-прежнему эффективны в организме (*например*, несколько соединений одновременно эффективны в организме пациента в течение некоторого периода времени, что может включать синергетический эффект этих соединений). Эффективность может не коррелировать с измеримой концентрацией препарата в крови, сыворотке или плазме. Например, разные терапевтические соединения можно вводить либо в одном и том же составе, либо в отдельных составах, либо одновременно, либо последовательно, и по разным схемам. Таким образом, субъект, получающий такое лечение, может получить пользу от комбинированного эффекта различных активных агентов или терапий. Один или несколько полипептидов ActRII по описанию можно вводить одновременно, до или после одного или нескольких других дополнительных агентов или поддерживающих терапий, таких как описаны в настоящем документе. В общем, каждый активный агент или терапию будут вводить в дозе и/или по схеме, определенной для этого конкретного агента. Конкретная комбинация для использования в схеме будет учитывать совместимость полипептида ActRII по настоящему описанию с дополнительным активным агентом или терапией и/или желаемый эффект.

Конспект классификации ВОЗ

Состояние легочной артериальной гипертензии, лечение которого осуществляется способами, описанными в настоящем документе, может включать любое одно или несколько состояний, признанных Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ). См., *например*, Simonneau (2019) Eur Respir J: 53:1801913.

Таблица 1. Клиническая классификация легочной артериальной гипертензии

Группа 1: Легочная артериальная гипертензия (РАН).
1.1 Идиопатическая РАН
1.2 Наследуемая РАН
1.2.1 BMPR2

1.2.2 ALK-1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3

1.2.3 Неизвестная

1.3 РАН, вызванная лекарственными средствами и токсинами

1.4 Связанная с:

1.4.1 Заболеваниями соединительной ткани

1.4.2 ВИЧ инфекцией

1.4.3 Портальной гипертензией

1.4.4 Врожденными пороками сердца

1.4.5 Шистосомозом

1.5 РАН с длительным ответом на блокаторы кальциевых каналов

1.6 РАН со значительными поражениями вен/капилляров (PVOD/PCH)

1.7 Персистирующая РН новорожденных

Клиническая цель классификации РАН состоит в том, чтобы разделить клинические состояния, связанные с РАН, на конкретные подгруппы в соответствии с их патофизиологическими механизмами, клинической картиной, гемодинамическими характеристиками и стратегией лечения. Эта клиническая классификация может быть обновлена, когда появятся новые данные о вышеуказанных признаках, или когда будут рассмотрены дополнительные клинические объекты.

В настоящем документе, термин «параметр легочной гемодинамики» относится к любому параметру, используемому для описания или оценки кровотока через сердце и легочную сосудистую систему. Примеры параметров легочной гемодинамики включают, но не ограничены ими, среднее давление в легочной артерии (mPAP), диастолическое давление в легочной артерии (dPAP) [также известное как диастолическое давление в легочной артерии (PADP)], систолическое давление в легочной артерии (sPAP) [также известное как систолическое давление в легочной артерии (PASP)], среднее давление в правом предсердии (mRAP), давление заклинивания легочных капилляров (PCWP) [также известное как давление заклинивания в легочной артерии (PAWP)], легочное сосудистое сопротивление (PVR) и сердечный выброс (CO)).

Многие из описанных выше параметров легочной гемодинамики взаимосвязаны. Например, PVR связан с mPAP, PCWP и CO следующим уравнением:

$$PVR = (mPAP - PCWP) / CO \text{ [единицы Вуда]}$$

PVR измеряет сопротивление потоку, создаваемое легочной сосудистой сетью, без влияния левого давления наполнения. PVR также можно измерить по следующим уравнениям:

$$PVR = TPG \times 80 / CO \text{ [единица измерения: дин-сек-см}^{-5}\text{]} \text{ OR } PVR = (mPAP - PCWP) \times 80 / CO \text{ [единица измерения: дин-сек-см}^{-5}\text{]}$$

В некоторых вариантах осуществления, общее периферическое сопротивление (TPR) можно измерить с использованием следующего уравнения:

$$TPR = mPAP/CO.$$

Согласно некоторым вариантам осуществления, вклад прекапиллярной легочной артерии в РН может отражаться повышенным PVR. В некоторых вариантах осуществления, нормальный PVR составляет 20-130 дин-сек-см⁻⁵ или 0,5-1,1 единиц Вуда. Согласно некоторым вариантам осуществления, повышенный PVR может относиться к PVR выше 2 единиц Вуда, выше 2,5 единиц Вуда, выше 3 единиц Вуда или выше 3,5 единиц Вуда.

В качестве еще одного примера, mPAP связан с dPAP и sPAP следующим уравнением: $mPAP = (2/3)dPAP + (1/3)sPAP$.

Кроме того, dPAP и sPAP можно использовать для расчета пульсового давления (мм рт. ст.) по следующему уравнению: пульсовое давление = sPAP - dPAP.

Пульсовое давление можно использовать для расчета эластичности легочной артерии по следующему уравнению: эластичность легочной артерии (мл.мм рт. ст.⁻¹) = ударный объем / пульсовое давление.

В некоторых вариантах осуществления, параметры легочной гемодинамики измеряют напрямую, например, во время катетеризации правых отделов сердца. В других вариантах осуществления, параметры легочной гемодинамики оценивают и/или оценивают с помощью других методов, таких как магнитно-резонансная томография (МРТ) или эхокардиография.

Типовые параметры легочной гемодинамики включают mPAP, PAWP и PVR. Один или несколько параметров легочной гемодинамики могут быть измерены с помощью любых подходящих процедур, например, с использованием катетеризации правых отделов сердца или эхокардиографии. Различные гемодинамические характеристики РН и РАН представлены в Таблице 2.

Таблица 2. Гемодинамические характеристики легочной гипертензии (РН) и РАН

	Гемодинамические характеристики
Легочная гипертензия	mPAP >20 мм рт. ст.
Легочная артериальная гипертензия	mPAP >20 мм рт. ст.
	PAWP ≤15 мм рт. ст.
	PVR ≥3 единиц Вуда

Клиническая классификация или гемодинамические характеристики РАН, описанные в настоящем документе, и связанные с ними диагностические параметры могут быть обновлены или изменены в зависимости от наличия новых или существующих источников данных или при рассмотрении дополнительных клинических объектов.

Характеристики РАН

Легочная артериальная гипертензия (РН 1 группы ВОЗ) представляет собой серьезное, прогрессирующее и опасное для жизни заболевание легочной сосудистой сети,

характеризующееся глубокой вазоконстрикцией и аномальной пролиферацией гладкомышечных клеток в стенках легочных артерий. Сильное сужение кровеносных сосудов легких приводит к очень высокому давлению в легочной артерии. Из-за высокого давления, сердцу трудно перекачивать кровь через легкие для насыщения ее кислородом. Пациенты с РАН страдают от сильной одышки, поскольку сердцу приходится бороться с высоким давлением. У пациентов с РАН обычно наблюдается значительное увеличение PVR и устойчивое повышение mPAP, что в конечном итоге приводит к правожелудочковой недостаточности и смерти. Пациенты с диагнозом РАН имеют плохой прогноз и в равной степени ухудшается качество жизни, при этом средняя продолжительность жизни составляет от 2 до 5 лет с момента постановки диагноза при отсутствии лечения.

Различные факторы способствуют патогенезу легочной гипертензии, включая пролиферацию легочных клеток, которая может способствовать ремоделированию сосудов (*т.е.* гиперплазии). Например, ремоделирование легочных сосудов происходит преимущественно за счет пролиферации артериальных эндотелиальных клеток и гладкомышечных клеток у пациентов с легочной гипертензией. Считается, что сверхэкспрессия различных цитокинов способствует легочной гипертензии. Кроме того, было обнаружено, что легочная гипертензия может возникать вследствие гиперпролиферации гладких клеток легочных артерий и эндотелиальных клеток легких. Кроме того, запущенная РАН может характеризоваться мускуляризацией дистальных легочных артериол, концентрическим утолщением интимы и обструкцией просвета сосудов пролиферирующими эндотелиальными клетками. Pietra et al., J. Am. Coll. Cardiol., 43:255-325 (2004).

РАН можно диагностировать на основании среднего давления в легочной артерии выше 25 мм рт. ст. (или выше 20 мм рт. ст. в соответствии с обновленными рекомендациями) в состоянии покоя при нормальном давлении заклинивания в легочных артериальных капиллярах. РАН может привести к одышке, головокружению, обмороку и другим симптомам, которые усугубляются при физической нагрузке. РАН может быть тяжелым заболеванием с заметно сниженной переносимостью физической нагрузки и сердечной недостаточностью. Два основных типа РАН включают идиопатическую РАН (*например*, РАН, при которой не выявлен предрасполагающий фактор) и наследуемую РАН (*например*, РАН, связанную с мутацией в *BMPR2*, *ALK1*, *ENG*, *SMAD9*, *CAVI*, *KCNK3* или *EIF2AK4*). В 70% случаев семейной РАН, мутации локализуются в гене *BMPR2*. Факторы риска развития РАН включают семейный анамнез РАН, употребление наркотиков и токсинов (*например*, употребление метамfetамина или кокаина), инфекцию (*например*, ВИЧ инфекцию или шистосомоз), цирроз печени, врожденные пороки сердца, портальную гипертензию, легочную веноокклюзионную болезнь, легочный капиллярный гемангиоматоз или нарушения соединительной ткани/аутоиммунные нарушения (*например*, склеродермию или волчанку). РАН может быть связана с длительным ответом на блокаторы кальциевых каналов, со значительными поражениями вен/капилляров

(PVOD/PCN) и персистирующей РН новорожденных.

Диагноз РАН

Диагноз РАН, включая функциональную группу, может быть установлен на основании симптомов и физического обследования с использованием обзора полного набора параметров для определения соответствия гемодинамическим и другим критериям. Некоторые из критериев, которые могут учитываться, включают клиническую картину пациента (*например*, одышку, утомляемость, слабость, стенокардию, обмороки, сухой кашель, тошноту и рвоту, вызванную физической нагрузкой), результаты электрокардиограммы (ЭКГ), результаты рентгенографии грудной клетки, тест на функциональную способность легких, газы артериальной крови, результаты эхокардиографии, результаты вентиляционно-перфузионного сканирования легких, результаты компьютерной томографии высокого разрешения, результаты компьютерной томографии с контрастным усилением, результаты ангиографии легких, магнитно-резонансную томографию сердца, анализы крови (*например*, биомаркеры, такие как BNP или NT-proBNP), иммунологию, ультразвуковое исследование брюшной полости, катетеризацию правых отделов сердца (RHC), вазореактивность и генетическое тестирование. *См., например*, Galie N., et al Euro Heart J. (2016) 37, 67-119.

В некоторых вариантах осуществления, биомаркер можно использовать, чтобы помочь диагностировать РАН. Например, в некоторых вариантах осуществления, биомаркер представляет собой маркер сосудистой дисфункции (*например*, асимметричный диметиларгинин (ADMA), эндотелин-1, ангиопоэтины или фактор фон Виллебранда). В некоторых вариантах осуществления, биомаркер представляет собой маркер воспаления (С-реактивный белок, интерлейкин 6, хемокины). В некоторых вариантах осуществления, биомаркер представляет собой маркер миокардиального стресса [*например*, (предсердный натрийуретический пептид, мозговой натрийуретический пептид (BNP)/NT-proBNP или тропонины)]. В некоторых вариантах осуществления, биомаркер представляет собой маркер низкого СО и/или гипоксии тканей (*например*, рСО₂, мочевиная кислота, фактор дифференциации роста 15 (GDF15) или остеоопонтин). В некоторых вариантах осуществления, биомаркер представляет собой маркер вторичного повреждения органов (*например*, креатинин или билирубин). *См., например*, Galie N., et al Euro Heart J. (2016) 37, 67-119.

Измерения рН

В некоторых аспектах, описание относится к способам снижения риска телеангиэктазии у пациента, получающего терапевтически эффективное количество полипептида ActRII (*например*, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, соответствующей остаткам 30-110 SEQ ID NO: 1) для лечения и/или прогрессирования легочной артериальной гипертензии (РАН). В некоторых вариантах осуществления, способ относится к лечению пациентов с РАН, страдающих идиопатической РАН. В некоторых вариантах осуществления, способ относится к лечению пациентов с РАН, которые имеют

наследственную РАН (*например, РАН вследствие одной или нескольких мутаций в BMP2, ALK-1, ENG, SMAD9, CAV1 и KCNK3*). В некоторых вариантах осуществления, способ относится к лечению пациентов с РАН, у которых имеется наследственная РАН вследствие неизвестной мутации. В некоторых вариантах осуществления, способ относится к лечению пациентов с РАН, у которых РАН вызвана приемом наркотиков или токсинов. В некоторых вариантах осуществления, способ относится к лечению пациентов с РАН, у которых РАН связана с заболеванием соединительной ткани. В некоторых вариантах осуществления, способ относится к лечению пациентов с РАН, у которых РАН связана с ВИЧ инфекцией. В некоторых вариантах осуществления, способ относится к лечению пациентов с РАН, у которых РАН связана с портальной гипертензией. В некоторых вариантах осуществления, способ относится к лечению пациентов с РАН, у которых РАН связана с шистосомозом. В некоторых вариантах осуществления, способ относится к лечению пациентов с РАН, классифицированных как долго отвечающие на блокаторы кальциевых каналов. В некоторых вариантах осуществления, способ относится к лечению пациентов с РАН со значительными поражениями вен/капилляров (PVOD/PCN). В некоторых вариантах осуществления, способ относится к лечению пациентов с РАН, у которых имеется персистирующая легочная гипертензия (PH) новорожденных. В некоторых вариантах осуществления, способ относится к лечению пациентов с РАН, у которых РАН связана с простыми врожденными системно-легочными шунтами, по меньшей мере, через 1 год после восстановления шунта.

Функциональные классы

РАН на исходном уровне может быть легкой, средней или тяжелой, что определяется, например, функциональным классом Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), который является мерой тяжести заболевания у пациентов с легочной гипертензией. Функциональная классификация ВОЗ является адаптацией системы Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA) и обычно используется для качественной оценки переносимости физической активности, например, при мониторинге прогрессирования заболевания и ответа на лечение (Rubin (2004) Chest 126:7-10). В системе ВОЗ признаны четыре функциональных класса: I функциональный класс: легочная гипертензия без ограничения физической активности; обычная физическая активность не вызывает чрезмерной одышки или усталости, боли в груди или предобморочных состояний; II функциональный класс: легочная гипертензия, приводящая к незначительному ограничению физической активности; пациент чувствует себя комфортно в состоянии покоя; обычная физическая активность вызывает чрезмерную одышку или усталость, боль в груди или предобморочное состояние; III функциональный класс: легочная гипертензия, приводящая к выраженному ограничению физической активности; пациент чувствует себя комфортно в состоянии покоя; активность, меньшая, чем обычно, вызывает чрезмерную одышку или усталость, боль в груди или предобморочное состояние; IV функциональный класс: легочная гипертензия, приводящая к неспособности осуществлять любую физическую активность без симптомов; у больного

появляются признаки правожелудочковой недостаточности; одышка и/или усталость могут присутствовать даже в состоянии покоя; дискомфорт усиливается при любой физической активности.

Известные методы лечения РАН

Не существует известного лечения РАН; современные методы лечения направлены на продление продолжительности жизни пациентов и улучшение качества жизни пациентов. Обычно это связано с хорошей переносимостью физической нагрузки, хорошей функцией правого желудочка и низким риском смертности (*например*, приведение и/или содержание пациента в I функциональном классе или II функциональном классе ВОЗ). Современные методы лечения РАН могут включать введение: вазодилаторов, таких как простаглицлин, эпопростенол и силденафил; антагонистов рецепторов эндотелина, таких как бозентан; блокаторов кальциевых каналов, таких как амлодипин, дилтиазем и нифедипин; антикоагулянтов, таких как варфарин; и диуретики. Лечение РАН также проводят с использованием кислородной терапии, предсердной септостомии, легочной тромбэндартерэктомии и трансплантации легких и/или сердца. Однако каждый из этих способов имеет один или несколько недостатков, которые могут включать недостаточную эффективность, серьезные побочные эффекты, низкую комплаентность пациентов и высокую стоимость. В некоторых аспектах, способ относится к снижению риска телеангиэктазии у пациента, получающего терапевтически эффективное количество полипептида ActRII (*например*, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, соответствующей остаткам 30-110 SEQ ID NO: 1) в комбинации с одним или несколькими дополнительными активными агентами и/или поддерживающими терапиями для лечения РАН (*например*, вазодилаторами, такими как простаглицлин, эпопростенол и силденафил; антагонистами рецепторов эндотелина, такими как бозентан; блокаторами кальциевых каналов, такими как амлодипин, дилтиазем и нифедипин; антикоагулянтами, такими как варфарин; диуретиками; кислородной терапией; предсердной септостомией; легочной тромбэндартерэктомией; и трансплантацией легких и/или сердца); бардоксолон метилом или его производным; олеаноловой кислотой или ее производным.

Схема дозирования для снижения риска телеангиэктазии

Вероятность телеангиэктазии у пациента может быть выше во время первоначального лечения полипептидом ActRII. В некоторых вариантах осуществления, можно использовать схему дозирования для профилактики, облегчения или уменьшения симптомов телеангиэктазии. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по настоящему изобретению вводят с использованием схемы дозирования. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение пациенту схемы дозирования терапевтически эффективного количества полипептида ActRII, как описано в настоящем документе, включающей первую дозу от 0,1 мг/кг до 1,0 мг/кг указанного полипептида в течение первого периода времени и вторую дозу от 0,1 мг/кг до 1,0 мг/кг указанного

полипептида, которую затем вводят в течение второго периода времени. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение пациенту схемы дозирования терапевтически эффективного количества полипептида ActRII, как описано в настоящем документе, включающей первую дозу от 0,1 мг/кг до 1,0 мг/кг указанного полипептида в течение первого периода времени, вторую дозу от 0,1 мг/кг до 1,0 мг/кг указанного полипептида, вводимую в течение второго периода времени, и третью дозу от 0,1 мг/кг до 1,0 мг/кг указанного полипептида, впоследствии вводимую в течение третьего периода времени. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение пациенту схемы дозирования терапевтически эффективного количества полипептида ActRII, как описано в настоящем документе, включающего первую дозу от 0,1 мг/кг до 1,0 мг/кг указанного полипептида в течение первого периода времени, вторую дозу от 0,1 мг/кг до 1,0 мг/кг указанного полипептида, вводимую в течение второго периода времени, и третью дозу, при которой лечение полипептидом ActRII приостанавливается на третий период времени. В некоторых вариантах осуществления, первую дозу полипептида ActRII вводят пациенту в количестве от примерно 0,2 мг/кг до примерно 0,4 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, первую дозу полипептида ActRII вводят пациенту в дозе 0,3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, вторую дозу полипептида ActRII вводят пациенту в количестве от примерно 0,5 мг/кг до примерно 0,8 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, вторую дозу полипептида ActRII вводят пациенту в дозе 0,7 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу полипептида ActRII вводят пациенту в количестве от примерно 0,2 мг/кг до примерно 0,4 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу полипептида ActRII вводят пациенту в дозе 0,3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, третья доза включает приостановку лечения полипептидом ActRII на определенный период времени. В некоторых вариантах осуществления, лечение полипептидом ActRII приостанавливают на период по меньшей мере 2-6 недель. В некоторых вариантах осуществления, лечение полипептидом ActRII приостанавливают на период по меньшей мере 3 недели. В некоторых вариантах осуществления, лечение полипептидом ActRII приостанавливается на период по меньшей мере 6 недель. В некоторых вариантах осуществления, лечение полипептидом ActRII приостанавливают на период по меньшей мере 9 недель. В некоторых вариантах осуществления, лечение полипептидом ActRII возобновляют после периода, в течение которого лечение полипептидом ActRII было приостановлено.

В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования включает введение пациенту первой дозы полипептида ActRII в количестве 0,3 мг/кг с последующим введением пациенту второй дозы полипептида ActRII в количестве 0,7 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования включает введение пациенту первой дозы полипептида ActRII в количестве 0,3 мг/кг, введение пациенту второй дозы полипептида ActRII в количестве 0,7 мг/кг и введение пациенту третьей дозы полипептида ActRII в количестве 0,3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования включает введение пациенту первой дозы полипептида ActRII в количестве 0,3 мг/кг, введение

пациенту второй дозы полипептида ActRII в количестве 0,7 мг/кг и введение пациенту третьей дозы полипептида ActRII, где третья доза включает приостановку лечения полипептидом ActRII на период по меньшей мере 3 недели. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования включает введение пациенту первой дозы полипептида ActRII в количестве 0,3 мг/кг и введение пациенту второй дозы полипептида ActRII, где вторая доза включает приостановку лечения полипептидом ActRII на период по меньшей мере 3 недели. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования включает введение пациенту первой дозы полипептида ActRII в количестве 0,3 мг/кг, введение пациенту второй дозы полипептида ActRII в количестве 0,7 мг/кг, введение пациенту третьей дозы полипептида ActRII, где третья доза включает приостановку лечения полипептидом ActRII на период по меньшей мере 3 недели, и введение пациенту четвертой дозы полипептида ActRII в количестве 0,3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, вторая доза превышает первую дозу. В некоторых вариантах осуществления, первая доза превышает вторую дозу. В некоторых вариантах осуществления третья доза превышает вторую дозу. В некоторых вариантах осуществления, вторая доза превышает третью дозу. В некоторых вариантах осуществления, третья доза включает введение пациенту дозы полипептида ActRII в количестве 0,3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, третья доза включает приостановку лечения полипептидом ActRII на период по меньшей мере 2-6 недель. В некоторых вариантах осуществления, вторая доза включает приостановку лечения полипептидом ActRII на период по меньшей мере 2-6 недель. В некоторых вариантах осуществления, третья доза включает приостановку лечения полипептидом ActRII на период по меньшей мере 3 недели. В некоторых вариантах осуществления, вторая доза включает приостановку лечения полипептидом ActRII на период по меньшей мере 3 недели. В некоторых вариантах осуществления, первый период времени составляет по меньшей мере 3 недели. В некоторых вариантах осуществления, второй период времени составляет по меньшей мере 3 недели. В некоторых вариантах осуществления, третий период времени составляет по меньшей мере 3 недели. В некоторых вариантах осуществления, второй период времени составляет по меньшей мере 21 неделю. В некоторых вариантах осуществления, второй период времени составляет по меньшей мере 45 недель. В некоторых вариантах осуществления, второй период времени превышает первый период времени. В некоторых вариантах осуществления, третий период времени превышает первый период времени. В некоторых вариантах осуществления, третий период времени превышает второй период времени. В некоторых вариантах осуществления, первую дозу вводят пациенту в течение по меньшей мере 3 недель. В некоторых вариантах осуществления, вторую дозу вводят в течение по меньшей мере 21 недели. В некоторых вариантах осуществления, вторую дозу вводят в течение по меньшей мере 45 недель.

В некоторых вариантах осуществления, изменение дозировки между первой дозой и второй дозой определяется лечащим врачом с учетом различных факторов (*например,*

симптомов и/или факторов риска телеангиэктазии). В некоторых вариантах осуществления, изменение дозировки между второй дозой и третьей дозой определяется лечащим врачом с учетом различных факторов (*например*, симптомов и/или факторов риска телеангиэктазии). В некоторых вариантах осуществления, изменение дозировки между третьей дозой и четвертой дозой определяется лечащим врачом с учетом различных факторов (*например*, симптомов и/или факторов риска телеангиэктазии).

В некоторых вариантах осуществления, различные факторы включают, но не ограничены ими, факторы риска развития телеангиэктазии у пациента. В некоторых вариантах осуществления, факторы риска развития телеангиэктазии выбраны из группы, состоящей из низких уровней BMP9, низких уровней BMP10, низких уровней VEGF, наследственной геморрагической телеангиэктазии (ННТ) и заболевания соединительной ткани (CTD). В некоторых вариантах осуществления, у пациента имеется один или несколько из этих факторов риска до лечения полипептидом ActRII. В некоторых вариантах осуществления, у пациента имеется один или несколько из этих факторов риска во время лечения полипептидом ActRII. В некоторых вариантах осуществления, фактором риска развития телеангиэктазии является наличие у пациента одной или нескольких мутаций, связанных с наследственной геморрагической телеангиэктазией (ННТ) и/или заболеванием соединительной ткани (CTD). В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько мутаций, связанных с ННТ, представляют собой мутации в гене, выбранном из группы, состоящей из *ENG, ACVRL1, EPHB4, SMAD4, GDF2, BMPR9* и *RASA1*. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько мутаций, связанных с CTD, представляют собой мутации в гене, выбранном из группы, состоящей из *ABCC6, ACTA2, ADAMTS2, ADAMTS10, ADAMTSL2, ALDH18A1, ATP6V0A2, ATP7A, B3GALT6, B4GALT7, BGN, CIR, C1S, CBS, CHST14, COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL3A1, COL5A1, COL5A2, COL9A1, COL9A2, COL9A3, COL11A1, COL11A2, DSE, EFEMP2 (FBLN4), ELN, FBLN5, FBN1, FBN2, FKBP14, FLCN, FLNA, FOXE3, GORAB, LOX, LTBP4, MED12, MFAP5, MYH11, MYLK, NOTCH1, NOTCH2, PKD1, PKD2, PLOD1, PRDM5, PRKG1, PTDSS1, PYCR1, RIN2, SKI, SLC2A10, SLC39A13, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD6, TAB2, TGFB2, TGFB3, TGFBR1, TGFBR2, TNXB* и *ZNF469*. В некоторых вариантах осуществления, дозу полипептида ActRII для пациента, как описано в настоящем документе, поддерживают (*например*, поддерживают на уровне 0,3 мг/кг или 0,7 мг/кг), если один или несколько симптомов или факторов риска у пациента до или во время лечения являются аномальными.

В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования предотвращает, облегчает или уменьшает побочные эффекты полипептида ActRII. В некоторых вариантах осуществления, введение полипептида ActRII в соответствии со схемой дозирования, предложенной в настоящем документе, приводит к снижению риска телеангиэктазии. В некоторых вариантах осуществления, введение полипептида ActRII в соответствии со схемой дозирования, предложенной в настоящем документе, снижает риск телеангиэктазии в течение второго периода времени. В некоторых вариантах

осуществления, введение полипептида ActRII в соответствии со схемой дозирования, предложенной в настоящем документе, снижает риск телеангиэктазии в течение третьего периода времени. В некоторых вариантах осуществления, введение полипептида ActRII в соответствии со схемой дозирования, предложенной в настоящем документе, снижает риск телеангиэктазии в течение четвертого периода времени. В некоторых вариантах осуществления, введение полипептида ActRII в соответствии со схемой дозирования, предложенной в настоящем документе, снижает риск телеангиэктазии после первой 21 недели лечения. В некоторых вариантах осуществления, введение полипептида ActRII в соответствии со схемой дозирования, предложенной в настоящем документе, снижает риск телеангиэктазии после первых 45 недель лечения.

Симптомы и факторы риска телеангиэктазии

Телеангиэктазии также известны как сосудистые сеточки, сеточки в виде черточек, ретикулярные вены, солнечнолучевые вены, звездчатые вены и паутинообразные вены. Телеангиэктазии включают расширенные венулы (мельчайшие кровеносные сосуды), в результате чего на коже появляются нитевидные красные линии или узоры. Считается, что эти паттерны, или телеангиэктазии, вызваны высвобождением или активацией вазоактивных веществ при различных условиях. Симптомы телеангиэктазии включают боль, зуд, нитевидные красные пятна на коже, слизисто-кожные телеангиэктазии, желудочно-кишечные кровотечения, поражения кожи, носовое кровотечение, кровоточивость десен, артериовенозные мальформации, внутренние телеангиэктазии и красные пятна на коже.

Хотя телеангиэктазии часто бывают доброкачественными, они могут быть вызваны серьезным заболеванием, например наследственной геморрагической телеангиэктазией (ННТ). У пациентов с ННТ, телеангиэктазии могут появляться в жизненно важных органах, таких как печень. Разрыв этих телеангиэктазий может привести к опасному для жизни кровотечению.

В некоторых аспектах, описание относится к способам снижения риска телеангиэктазии у пациента, получающего терапевтически эффективное количество полипептида ActRII (*например*, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, соответствующей остаткам 30-110 SEQ ID NO: 1), где способ включает введение полипептида ActRII по схеме дозирования, если у пациента наблюдаются симптомы или имеются факторы риска развития телеангиэктазии, тем самым снижая риск телеангиэктазии. В некоторых вариантах осуществления, симптомы телеангиэктазии выбраны из группы, состоящей из боли, зуда, нитевидных красных пятен на коже, слизисто-кожных телеангиэктазий, желудочно-кишечных кровотечений, поражений кожи, носового кровотечения, кровоточивости десен, артериовенозных мальформаций, внутренних телеангиэктазий и красных пятен на коже. В некоторых вариантах осуществления, симптомом телеангиэктазии являются поражения кожи. В некоторых вариантах осуществления, симптомом телеангиэктазии является кровоточивость десен. В некоторых вариантах

осуществления, симптомом телеангиэктазии является носовое кровотечение. В некоторых вариантах осуществления, симптомом телеангиэктазии являются артериовенозные мальформации. В некоторых вариантах осуществления, симптомом телеангиэктазии являются внутренние телеангиэктазии. В некоторых вариантах осуществления, артериовенозные мальформации или внутренние телеангиэктазии возникают во внутренних органах (*например*, головном мозге, печени, легких, селезенке, мочевыводящих путях и позвоночнике). В некоторых вариантах осуществления, факторы риска развития телеангиэктазии выбраны из группы, состоящей из низких уровней BMP9; низких уровней BMP10; низких уровней VEGF; наследственной геморрагической телеангиэктазии (ННТ); и заболевания соединительной ткани (СТД).

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает способы ведения пациента, который лечился или является кандидатом на лечение одним или несколькими полипептидами ActRII по настоящему изобретению (*например*, аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, соответствующей остаткам 30-110 SEQ ID NO: 1) путем измерения одного или нескольких симптомов или факторов риска телеангиэктазии у пациента. Один или несколько симптомов и/или факторов риска телеангиэктазии можно использовать для оценки подходящей дозировки для пациента, который является кандидатом на лечение одним или несколькими полипептидами ActRII по настоящему изобретению, для мониторинга симптомов и/или факторов риска телеангиэктазии во время лечения, чтобы оценить, следует ли корректировать дозу во время лечения одним или несколькими полипептидами ActRII по настоящему изобретению, и/или для оценки подходящей поддерживающей дозы одного или нескольких полипептидов ActRII по настоящему изобретению. Если один или несколько симптомов и/или факторов риска телеангиэктазии являются аномальными, дозирование одного или нескольких полипептидов ActRII можно уменьшить, отложить или прекратить.

В одном варианте осуществления, если один или несколько симптомов и/или факторов риска телеангиэктазии являются аномальными у пациента, который является кандидатом на лечение одним или несколькими полипептидами ActRII, то начало введения одного или нескольких полипептидов ActRII по настоящему изобретению может быть отложено до тех пор, пока симптомы и/или факторы риска телеангиэктазии не вернуться к нормальному или приемлемому уровню естественным путем или посредством терапевтического вмешательства.

В некоторых вариантах осуществления, если один или несколько симптомов и/или факторов риска телеангиэктазии являются аномальными у пациента, который является кандидатом на лечение одним или несколькими полипептидами ActRII, то начало введения не может быть отложено. Однако величина дозирования или частота дозирования одного или нескольких полипептидов ActRII по настоящему изобретению может быть установлена на уровне, который снизил бы риск телеангиэктазии, возникающей при введении одного или нескольких полипептидов ActRII по настоящему

изобретению. Альтернативно, для пациента может быть разработана терапевтическая схема, сочетающая один или несколько полипептидов ActRII с терапевтическим агентом, снижающим риск телеангиэктазии.

Тяжесть телеангиэктазии у пациента

Телеангиэктазия и степень ее тяжести можно описать и измерить с помощью различных классификаций. Например, классификация хронических венозных заболеваний по Клинической-этиологии-анатомии-патофизиологии (СЕАР) классифицирует венозные заболевания в порядке возрастания тяжести. СЕАР относит телеангиэктазию к наименее тяжелой категории (C1), которая описывает телеангиэктазию как слияние расширенных внутривенных венул диаметром менее 1 мм. *См., например, Таблицу 3 ниже.*

Таблица 3. Клиническая классификация хронических заболеваний вен СЕАР

Клиническая классификация	
С0	Отсутствие видимых или осязаемых признаков заболевания
С1	Телеангиэктазии или ретикулярный варикоз
С2	Варикозное расширение вен
С3	Отек
С4а	Пигментация или экзема
С4б	Липодерматосклероз или белая атрофия кожи
С5	Зажившая венозная язва
С6	Активная венозная язва
С	Симптоматическая, включая боль, стеснение, раздражение кожи, тяжесть, мышечные спазмы и другие жалобы, связанные с венозной дисфункцией
А	Бессимптомная

Телеангиэктазия может быть дополнительно разделена на определенные степени тяжести. Например, телеангиэктазии можно разделить на три степени в зависимости от степени и масштаба извилистости и выраженности вен. *См., например, Ruckley CV, et al. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery. 2008;36(6):719-724.*

В некоторых аспектах, описание относится к способам снижения риска телеангиэктазии у пациента, получающего терапевтически эффективное количество полипептида ActRII (*например, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, соответствующей остаткам 30-110 SEQ ID NO: 1*), где у пациента имеется телеангиэктазия С1 по классификации Клинической-этиологии-анатомии-патофизиологии (СЕАР). В некоторых вариантах осуществления, способ улучшает телеангиэктазию с С1 до С0 по классификации СЕАР.

В некоторых аспектах, изобретение относится к способам снижения риска телеангиэктазии у пациента, получающего терапевтически эффективное количество полипептида ActRII (*например, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, соответствующей остаткам*

30-110 SEQ ID NO: 1), где у пациента наблюдается телеангиэктазия 1, 2 или 3 степени. В некоторых вариантах осуществления, у пациента наблюдается телеангиэктазия 1 степени. В некоторых вариантах осуществления, у пациента наблюдается телеангиэктазия 2 степени. В некоторых вариантах осуществления, у пациента наблюдается телеангиэктазия 3 степени. В некоторых вариантах осуществления, риск телеангиэктазии снижается за счет облегчения или улучшения тяжести телеангиэктазии. В некоторых вариантах осуществления, риск телеангиэктазии снижается за счет улучшения степени телеангиэктазии. В некоторых вариантах осуществления, способ улучшает телеангиэктазию со 2 степени до 1 степени. В некоторых вариантах осуществления, способ улучшает телеангиэктазию с 3 степени до 2 степени. В некоторых вариантах осуществления, способ улучшает телеангиэктазию с 3 степени до 1 степени. В некоторых вариантах осуществления, риск телеангиэктазии снижается за счет профилактики прогрессирования телеангиэктазии. В некоторых вариантах осуществления, способ предотвращает прогрессирование телеангиэктазии от 1 степени до 2 степени. В некоторых вариантах осуществления, способ предотвращает прогрессирование телеангиэктазии от 2 степени до 3 степени.

В некоторых аспектах, изобретение относится к способам снижения риска телеангиэктазии у пациента, получающего терапевтически эффективное количество полипептида ActRII (*например*, аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, соответствующей остаткам 30-110 SEQ ID NO: 1), где способ включает введение полипептида ActRII по схеме дозирования, включающей (i) введение пациенту первой дозы полипептида ActRII в количестве 0,3 мг/кг; и (ii) введение пациенту второй дозы полипептида ActRII в количестве 0,7 мг/кг; при этом третью дозу начинают, если у пациента проявляются симптомы или имеются факторы риска развития телеангиэктазии, тем самым снижая риск телеангиэктазии. В некоторых вариантах осуществления, третья доза включает приостановку лечения полипептидом ActRII до тех пор, пока телеангиэктазия не улучшится до ≤ 1 степени. В некоторых вариантах осуществления, третья доза включает приостановку лечения полипептидом ActRII до тех пор, пока телеангиэктазия не улучшится до ≤ 2 степени. В некоторых вариантах осуществления, третья доза включает приостановку лечения полипептидом ActRII до тех пор, пока телеангиэктазия не улучшится до ≤ 3 степени.

5. Фармацевтические композиции и способы введения

В некоторых вариантах осуществления, терапевтические способы по настоящему описанию включают системное или местное введение композиции в виде имплантата или устройства. При введении, терапевтическая композиция для применения по настоящему описанию находится в по существу апиrogenной или апиrogenной физиологически приемлемой форме. Терапевтически полезные агенты, отличные от полипептидов ActRII, которые также необязательно могут быть включены в композицию, как описано выше, можно вводить одновременно или последовательно с рассматриваемыми соединениями

способами, описанными в настоящем документе.

Обычно, белковые терапевтические агенты, описанные в настоящем документе, вводят парентерально, в частности, внутривенно или подкожно. Фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, могут содержать один или несколько полипептидов ActR^{II} в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми изотоническими водными или не водными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями, или стерильными порошками, которые могут быть восстановлены в стерильные растворы или дисперсии для инъекций непосредственно перед использованием, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты, растворенные вещества, которые делают состав изотоничным по отношению к крови предполагаемого реципиента, или суспендирующие или загущающие агенты. Примеры подходящих водных и не водных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях по описанию, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и подобные) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Соответствующую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрывающих материалов, таких как лецитин, за счет поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий, и за счет использования поверхностно-активных веществ. Составы могут быть представлены в герметичных контейнерах для разовой или многократной дозы, таких как ампулы и флаконы, и могут храниться в высушенном вымораживанием (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого эксципиента, например, воды, для инъекций, непосредственно перед применением. Растворы и суспензии для инъекций для немедленного приема можно приготовить из стерильных порошков, гранул и таблеток, описанных в настоящем документе.

Композиции и составы, если желательно, могут быть предложены в упаковке или дозирующем устройстве, которое может содержать одну или несколько стандартных дозированных форм, содержащих активный ингредиент. Упаковка может, например, содержать металлическую или пластиковую фольгу, например, блистерная упаковка. Упаковка или дозирующее устройство могут сопровождаться инструкциями по введению.

Кроме того, композиция может быть инкапсулирована или инъецирована в форму для доставки в участок ткани-мишень. В некоторых вариантах осуществления, композиции по настоящему изобретению могут включать матрицу, способную доставлять одно или несколько терапевтических соединений (*например*, полипептиды ActR^{II}) в участок ткани-мишень, обеспечивая структуру для развивающейся ткани и оптимально способную к резорбции в организме. Например, матрица может обеспечивать медленное высвобождение полипептида ActR^{II}. Такие матрицы могут быть изготовлены из материалов, используемых в настоящее время для других имплантируемых медицинских применений.

Выбор материала матрицы основан на биосовместимости, биоразлагаемости,

механических свойствах, косметическом внешнем виде и свойствах интерфейса. Конкретное применение рассматриваемых композиций определит подходящий состав. Потенциальными матрицами для композиций могут быть биоразлагаемые и химически определенные сульфат кальция, трикальцийфосфат, гидроксипатит, полимолочная кислота и полиангидриды. Другие потенциальные материалы являются биоразлагаемыми и биологически четко определенными, например, костный или кожный коллаген. Другие матрицы состоят из чистых белков или компонентов внеклеточного матрикса. Другие потенциальные матрицы не являются биоразлагаемыми и химически определены, например, спеченный гидроксипатит, биостекло, алюминаты или другая керамика. Матрицы могут состоять из комбинаций любого из вышеупомянутых типов материалов, таких как полимолочная кислота и гидроксипатит или коллаген и трикальцийфосфат. Биокерамика может быть изменена по составу, например, с использованием алюминат-фосфата кальция и обработке для изменения размера пор, размера частиц, формы частиц и биоразлагаемости.

В некоторых вариантах осуществления, способы по изобретению можно вводить перорально, *например*, в форме капсул, облаток, пилюль, таблеток, пастилок (с использованием ароматизированной основы, обычно сахарозы и аравийской камеди или трагаканта), порошков, гранул, или в виде раствора или суспензии в водной или не водной жидкости, или в виде жидкой эмульсии масло в воде или вода в масле, или в виде эликсира или сиропа, или в виде пастилок (с использованием инертной основы, такой как желатин и глицерин или сахароза и аравийская камедь) и/или в виде средств для полоскания рта и подобных, каждое из которых содержит заданное количество агента в качестве активного ингредиента. Агент также можно вводить в виде болюса, электуария или пасты.

В твердых дозированных формах для перорального введения (капсулы, таблетки, пилюли, драже, порошки, гранулы и подобные), одно или несколько терапевтических соединений настоящего изобретения могут быть смешаны с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, такими как цитрат натрия или дикальцийфосфат, и/или любой из следующих: (1) наполнители или разбавители, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; (2) связующие агенты, такие как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или аравийская камедь; (3) увлажнители, такие как глицерин; (4) разрыхлители, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный крахмал или крахмал тапиоки, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия; (5) агенты, замедляющие растворение, такие как парафин; (6) ускорители абсорбции, такие как соединения четвертичного аммония; (7) смачивающие агенты, такие как, например, цетиловый спирт и моностеарат глицерина; (8) абсорбенты, такие как каолин и бентонитовая глина; (9) смазывающие агенты, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси; и (10) красители. В случае капсул, таблеток и пилюль, фармацевтические композиции также

могут содержать буферные агенты. Твердые композиции подобного типа также можно использовать в качестве наполнителей мягких и твердых желатиновых капсул с использованием таких эксципиентов, как лактоза или молочный сахар, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и подобные.

Жидкие дозированные формы для перорального введения включают фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активному ингредиенту, жидкие дозированные формы могут содержать инертные разбавители, обычно используемые в данной 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, хлопковое, арахисовое, кукурузное, зародышевое, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры сорбитана и жирных кислот, и их смеси. Помимо инертных разбавителей, композиции для перорального введения также могут включать адъюванты, такие как смачивающие агенты, эмульгирующие и суспендирующие агенты, подсластители, ароматизаторы, красители, ароматизаторы и консерванты.

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

Композиции по изобретению также могут содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Профилактика действия микроорганизмов может быть обеспечена включением различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и подобных. Также может быть желательно включить в композиции изотонические агенты, такие как сахара, хлорид натрия и подобные. Кроме того, пролонгированное всасывание инъекционной фармацевтической формы может быть достигнуто за счет включения агентов, замедляющих всасывание, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Понятно, что схема дозирования будет определяться лечащим врачом с учетом различных факторов, которые модифицируют действие рассматриваемых соединений по описанию (*например*, полипептидов ActRII). Различные факторы включают, но не ограничены ими, возраст, пол и диету пациента, тяжесть заболевания, время введения и другие клинические факторы. Необязательно, дозировка может варьироваться в зависимости от типа матрицы, используемой при восстановлении, и типов соединений в композиции. В некоторых вариантах осуществления, гематологические параметры пациента можно контролировать путем периодических оценок, чтобы определить, превышают ли они нормальные уровни эритроцитов и/или уровни гемоглобина (*например*, уровни гемоглобина >16,0 г/дл или уровни гемоглобина >18,0 г/дл). В

некоторых вариантах осуществления, пациент, у которого уровни эритроцитов и/или гемоглобина выше нормы, может получать отсроченную или сниженную дозу до тех пор, пока уровни не вернуться к нормальному или приемлемому уровню.

В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по настоящему описанию вводят в диапазоне доз от 0,1 мг/кг до 2,0 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят в дозе 0,1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят в дозе 0,2 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят в дозе 0,3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят в дозе 0,4 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят в дозе 0,5 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят в дозе 0,6 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят в дозе 0,7 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят в дозе 0,8 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят в дозе 0,9 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят в дозе 1,0 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят в дозе 1,1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят в дозе 1,2 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят в дозе 1,3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят в дозе 1,4 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят в дозе 1,5 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят в дозе 1,6 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят в дозе 1,7 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят в дозе 1,8 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят в дозе 1,9 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят в дозе 2,0 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят один раз в день. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят два раза в день. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят один раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят два раза в неделю. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят три раза в неделю. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят каждые две недели. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят каждые три недели. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления, полипептиды ActRII по описанию вводят каждый месяц.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение также предлагает

генную терапию для продуцирования полипептидов ActRII *in vivo*. Такая терапия достигнет своего терапевтического эффекта путем введения полинуклеотидных последовательностей полипептида ActRII в клетки или ткани, имеющие нарушения, перечисленные выше. Доставка полипептидных полинуклеотидных последовательностей ActRII может быть достигнута с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, такого как химерный вирус или система коллоидной дисперсии. Предпочтительным для терапевтической доставки полинуклеотидных последовательностей полипептида ActRII является использование таргетных липосом.

Различные вирусные векторы, которые можно использовать для генной терапии, как описано в настоящем документе, включают аденовирус, вирус герпеса, вирус коровьей оспы или, предпочтительно, РНК вирус, такой как ретровирус. Предпочтительно, ретровирусный вектор представляет собой производное ретровируса мыши или птицы. Примеры ретровирусных векторов, в которые может быть встроен один чужеродный ген, включают, но не ограничены ими: вирус мышинного лейкоза Молони (MoMuLV), вирус мышинной саркомы Харви (HaMuSV), вирус опухоли молочной железы мышей (MuMTV) и вирус саркомы Рауса (RSV). Ряд дополнительных ретровирусных векторов могут включать в себя несколько генов. Все эти векторы могут переносить или включать ген селективируемого маркера так, чтобы можно было идентифицировать и генерировать трансдуцированные клетки. Ретровирусные векторы можно сделать мишень-специфическими путем присоединения, например, сахара, гликолипида или белка. Предпочтительное таргетирование осуществляется с использованием антитела. Специалисты в данной области техники поймут, что специфические полинуклеотидные последовательности могут быть вставлены в ретровирусный геном или прикреплены к вирусной оболочке, чтобы обеспечить мишень-специфическую доставку ретровирусного вектора, содержащего полипептид ActRII. В предпочтительном варианте осуществления, вектор таргетирует кость или хрящ.

Альтернативно, клетки тканевой культуры можно напрямую трансфицировать плазмидами, кодирующими ретровирусные структурные гены gag, pol и env, путем традиционной трансфекции фосфатом кальция. Эти клетки затем трансфицируют векторной плазмидой, содержащей представляющие интерес гены. Полученные клетки высвобождают ретровирусный вектор в культуральную среду.

Другой системой адресной доставки полипептидных полинуклеотидов ActRII является система коллоидной дисперсии. Системы коллоидной дисперсии включают комплексы макромолекул, нанокапсулы, микросферы, микроносители и системы на основе липидов, включая эмульсии масла в воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Предпочтительной коллоидной системой настоящего изобретения является липосома. Липосомы представляют собой искусственные мембранные везикулы, которые можно использовать в качестве средств доставки *in vitro* и *in vivo*. РНК, ДНК и интактные вирионы могут быть инкапсулированы в водную среду и доставлены в клетки в биологически активной форме (см., например, Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6:77,

1981). Способы эффективного переноса генов с использованием липосомального носителя известны в данной области техники, см., например, Mannino, et al., *Biotechniques*, 6:682, 1988. Композиция липосомы обычно представляет собой комбинацию фосфолипидов, обычно в комбинации со стероидами, особенно, холестерином. Также могут быть использованы другие фосфолипиды или другие липиды. Физические характеристики липосом зависят от pH, ионной силы и присутствия двухвалентных катионов.

Примеры липидов, полезных для производства липосом, включают фосфатидиловые соединения, такие как фосфатидилглицерин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, сфинголипиды, цереброзиды и ганглиозиды. Иллюстративные фосфолипиды включают яичный фосфатидилхолин, дипальмитоилфосфатидилхолин и дистеароилфосфатидилхолин. Таргетирование липосом также возможно на основе, например, органной специфичности, клеточной специфичности и специфичности к органеллам и известно в данной области техники.

В настоящем описании предложены составы, которые могут быть изменены путем включения кислот и оснований для регулирования pH; и буферных агентов для поддержания pH в узком диапазоне.

6. Примеры

Вышеприведенное описание будет более понятно при обращении к следующим примерам, которые включены исключительно в целях иллюстрации определенных вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначены для его ограничения.

Пример 1: Слитые белки ActRIIA-Fc

Конструируют растворимый слитый белок ActRIIA, в котором внеклеточный домен ActRIIA человека слит с доменом Fc человека или мыши с минимальным линкером между ними. Конструкции обозначены как ActRIIA-hFc и ActRIIA-mFc, соответственно.

ActRIIA-hFc показан ниже как очищенный из клеточных линий CHO (SEQ ID NO: 23):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVK
QGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPK
PPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Дополнительный ActRIIA-hFc, лишенный C-концевого лизина, показан ниже как очищенный из клеточных линий CHO (SEQ ID NO: 40):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVK
QGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPK
PPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK

TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

ActRIIA-hFc и ActRIIA-mFc экспрессируют в клеточных линиях CHO. Рассматривают три различные лидерные последовательности:

(i) Меллитин медоносной пчелы (HBML): MKFLVNVVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 24)

(ii) Тканевый активатор плазминогена (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 25)

(iii) Нативная: MGAAAKLAFVFLISSGA (SEQ ID NO: 26)

Выбранная форма использует лидер TPA и имеет следующую непроцессированную аминокислотную последовательность:

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVE
PCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCEG
NMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVIIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 27)

Этот полипептид кодируется следующей последовательностью нуклеиновой кислоты:

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAG
TCTTCGTTTCGCCCGGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTT
TTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGTAACCGTGTAT
GGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCC
ATTGAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAAACCTGCTATGACAGGACT
GATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGAGGGCAA
TATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCGGAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTC
AAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGGAACTCACACATGCCCAACCGT
GCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCA
AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTG
AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA
TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGTCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGG
GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCA
AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTG
CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG
TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC
TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGAATTC (SEQ ID NO: 28)

И ActRIIA-hFc, и ActRIIA-mFc замечательно поддаются рекомбинантной

экспрессии. Как показано на **Фигурах 4А и 4В**, белок очищают до одного четко определенного пика белка. N-концевое секвенирование выявляет одну последовательность -ILGRSETQE (SEQ ID NO: 29). Очистка может быть достигнута с помощью ряда стадий колоночной хроматографии, включая, например, три или более из следующих стадий, в любом порядке: хроматография на белке А, хроматография на Q-сефарозе, хроматография на фенолсефарозе, эксклюзионная хроматография и катионообменная хроматография. Очистку можно завершить вирусной фильтрацией и заменой буфера. Белок ActR11A-hFc очищают до чистоты >98% по данным эксклюзионной хроматографии, и >95% по данным SDS PAGE.

ActR11A-hFc и ActR11A-mFc показывают высокую аффинность к лигандам. GDF11 или активин А иммобилизуют на чипе Biacore™ CM5 с использованием стандартной процедуры сочетания амина. Белки ActR11A-hFc и ActR11A-mFc загружают в систему и измеряют связывание. ActR11A-hFc связывается с активином с константой диссоциации (K_D) 5×10^{-12} и связывается с GDF11 с K_D $9,96 \times 10^{-9}$. См. **Фигуру 5А** и **Фигуру 5В**. С помощью аналогичного анализа связывания устанавливают, что ActR11A-hFc имеет аффинность от высокой до умеренной к другим лигандам надсемейства TGF-бета, включая, например, активин В, GDF8, BMP6 и BMP10. ActR11A-mFc ведет себя аналогично.

ActR11A-hFc является очень стабильным в фармакокинетических исследованиях. Крысам вводят 1 мг/кг, 3 мг/кг или 10 мг/кг белка ActR11A-hFc, и уровни белка в плазме измеряют через 24, 48, 72, 144 и 168 часов. В отдельном исследовании, крысам вводят дозы 1 мг/кг, 10 мг/кг или 30 мг/кг. У крыс, ActR11A-hFc имеет период полужизни в сыворотке 11-14 дней, и уровни лекарственного средства в кровотоке являются довольно высокими через две недели (11 мкг/мл, 110 мкг/мл или 304 мкг/мл при начальном введении 1 мг/кг, 10 мг/кг или 30 мг/кг, соответственно.) У яванских макаков, период полужизни в плазме существенно превышает 14 дней, и уровни лекарственного средства в кровотоке составляют 25 мкг/мл, 304 мкг/мл или 1440 мкг/мл при начальном введении 1 мг/кг, 10 мг/кг или 30 мг/кг, соответственно.

Пример 2: Характеризация белка ActR11A-hFc

Слитый белок ActR11A-hFc экспрессируют в стабильно трансфицированных клетках CHO-DUKX B11 из вектора pAID4 (SV40 ori/энхансер, промотор CMV) с использованием лидерной последовательности тканевого плазминогена SEQ ID NO: 25. Белок, очищенный, как описано выше в Примере 1, имеет последовательность SEQ ID NO: 23. Часть Fc представляет собой последовательность Fc IgG1 человека, как показано в SEQ ID NO: 23. Анализ белка показывает, что слитый белок ActR11A-hFc образуется в виде гомодимера с дисульфидной связью.

Материал, экспрессируемый клетками CHO, имеет более высокую аффинность к лиганду активина В, чем сообщалось для слитого белка ActR11A-hFc, экспрессируемого в клетках человека 293 [см. del Re *et al.* (2004) *J Biol Chem.* 279(51):53126-53135]. Кроме того, использование лидерной последовательности ТРА обеспечивает большее

продуцирование, чем другие лидерные последовательности, и, в отличие от ActR11A-Fc, экспрессируемого с нативным лидером, обеспечивает N-концевую последовательность высокой чистоты. Использование нативной лидерной последовательности приводит к образованию двух основных видов ActR11A-Fc, каждый из которых имеет различную N-концевую последовательность.

Пример 3: Альтернативные белки ActR11A-Fc

Различные варианты ActR11A, которые можно использовать в соответствии с описанными в настоящем документе способами, описаны в международной заявке на патент, опубликованной как WO2006/012627 (см., например, стр. 55-58), полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки. Альтернативная конструкция может иметь делецию С-концевого хвоста (последние 15 аминокислот внеклеточного домена ActR11A). Последовательность такой конструкции представлена ниже (часть Fc подчеркнута) (SEQ ID NO: 30):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVK
 QGCWLDDINCYDRITDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP~~EMTGGGTHTCPPCPA~~
~~PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK~~
~~PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQV~~
~~YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS~~
~~KLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK~~

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ снижения риска телеангиэктазии при лечении пациента полипептидом ActRII, где способ включает введение полипептида ActRII по схеме дозирования, включающей:

(i) введение пациенту одной или нескольких первых доз полипептида ActRII в количестве 0,3 мг/кг один раз каждые 3 недели в течение периода 24 недель; и

(ii) если пациент показывает один или несколько симптомов или факторов риска развития телеангиэктазии, введение пациенту одной или нескольких вторых доз полипептида ActRII в количестве, уменьшенном по меньшей мере на половину количества первой дозы.

2. Способ снижения риска телеангиэктазии при лечении пациента полипептидом ActRII, где способ включает введение полипептида ActRII по схеме дозирования, включающей:

(i) введение пациенту одной или нескольких доз полипептида ActRII в количестве 0,3 мг/кг один раз каждые 3 недели в течение 24 недель;

(ii) если пациент показывает один или несколько симптомов или факторов риска развития телеангиэктазии, пропуск дозы, где пациента не лечат в течение 6 недель после стадии (i); и

(iii) возобновление введения пациенту одной или нескольких доз полипептида ActRII в количестве 0,3 мг/кг один раз каждые 3 недели в течение по меньшей мере 24 недель.

3. Способ лечения легочной артериальной гипертензии, где способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, полипептида ActRII по схеме дозирования, включающей:

(i) введение пациенту первой дозы полипептида ActRII в количестве 0,3 мг/кг; и

(ii) введение пациенту второй дозы полипептида ActRII в количестве 0,7 мг/кг один раз каждые 3 недели в течение всего времени, пока пациент нуждается в лечении;

где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, соответствующей остаткам 30-110 SEQ ID NO: 1.

4. Способ снижения риска телеангиэктазии при лечении пациента полипептидом ActRII, где способ включает введение полипептида ActRII по схеме дозирования, включающей:

(i) введение пациенту одной или нескольких первых доз полипептида ActRII в количестве 0,3 мг/кг один раз каждые 3 недели в течение периода 24 недель;

(ii) введение пациенту одной или нескольких вторых доз полипептида ActRII в количестве 0,7 мг/кг один раз каждые 3 недели в течение всего времени, пока пациент нуждается в лечении; и

(iii) если пациент показывает один или несколько симптомов или факторов риска развития телеангиэктазии, введение одной или нескольких третьих доз полипептида

ActRII, при этом третью дозу вводят в количестве 0,3 мг/кг один раз каждые 3 недели до улучшения симптомов;

где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, соответствующей остаткам 30-110 SEQ ID NO: 1, тем самым снижая риск телеангиэктазии.

5. Способ по п.4, где стадия (iii) включает введение пациенту одной или нескольких доз полипептида ActRII в количестве 0,3 мг/кг один раз каждые 3 недели в течение по меньшей мере 24 недель.

6. Способ по п.4, где пациента не лечат полипептидом ActRII в течение периода по меньшей мере 2-6 недель между стадией (ii) и стадией (iii).

7. Способ по п.4 или 6, где пациента не лечат полипептидом ActRII в течение периода по меньшей мере 3 недель между стадией (ii) и стадией (iii).

8. Способ по любому из пп.4-7, где стадия (i) включает пациенту введение первой дозы в течение по меньшей мере 3 недель.

9. Способ по любому из пп. 4-8, где стадия (ii) включает введение пациенту второй дозы в течение по меньшей мере 21 недели.

10. Способ по любому из пп.4-8, где стадия (ii) включает введение пациенту второй дозы в течение по меньшей мере 45 недель.

11. Способ по любому из пп. 1-2 и 4-10, где один или несколько симптомов телеангиэктазии выбраны из группы, состоящей из боли, зуда, нитевидных красных пятен на коже, слизисто-кожных телеангиэктазий, желудочно-кишечных кровотечений, поражений на коже, носового кровотечения, кровоточивости десен, артериовенозных мальформаций, внутренних телеангиэктазий и красных пятен на коже.

12. Способ по любому из пп. 1-2 и 4-11, где один или несколько симптомов телеангиэктазии включают поражения на коже.

13. Способ по любому из пп. 1-2 и 4-11, где один или несколько симптомов телеангиэктазии включают кровоточивость десен.

14. Способ по любому из пп. 1-2 и 4-11, где один или несколько симптомов телеангиэктазии включают носовое кровотечение.

15. Способ по любому из пп. 1-2 и 4-11, где один или несколько симптомов телеангиэктазии включают артериовенозные мальформации.

16. Способ по любому из пп. 1-2 и 4-11, где один или несколько симптомов телеангиэктазии включают внутренние телеангиэктазии.

17. Способ по любому из пп.11, 15 или 16, где артериовенозные мальформации или внутренние телеангиэктазии возникают во внутренних органах.

18. Способ по любому из пп. 1-2 и 4-14, где факторы риска развития телеангиэктазии выбраны из группы, состоящей из:

- i. низких уровней BMP9;
- ii. низких уровней BMP10;
- iii. низких уровней VEGF;

- iv. наследственной геморрагической телеангиэктазии (ННТ); и
- v. заболевания соединительной ткани (СТД).

19. Способ по любому из пп. 1-2 и 4-18, где способ облегчает или улучшает тяжесть телеангиэктазии у пациента.

20. Способ по любому из пп.1-2 и 4-18, где способ предотвращает прогрессирование телеангиэктазии у пациента.

21. Способ по п. 2 или 4, где стадия (iii) включает приостановку лечения полипептидом ActRII до тех пор, пока телеангиэктазия не улучшится до ≤ 1 степени.

22. Способ по п.19, где способ снижает тяжесть телеангиэктазии со 2 степени до 1 степени.

23. Способ по п.19, где способ снижает тяжесть телеангиэктазии с 3 степени до 2 степени.

24. Способ по п.19, где способ снижает тяжесть телеангиэктазии с 3 степени до 1 степени.

25. Способ по п.20, где способ предотвращает прогрессирование телеангиэктазии с 1 степени до 2 степени.

26. Способ по п.20, где способ предотвращает прогрессирование телеангиэктазии со 2 степени до 3 степени.

27. Способ по любому из пп. 1-2 и 4-26, где пациент получает полипептид ActRII для лечения легочной гипертензии.

28. Способ по любому из пп.1-2 и 4-27, где пациент получает полипептид ActRII для лечения легочной артериальной гипертензии.

29. Способ по любому из пп. 1-28, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности, соответствующей остаткам 30-110 SEQ ID NO: 1.

30. Способ по любому из пп. 1-28, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, соответствующей остаткам 21-135 SEQ ID NO: 1.

31. Способ по любому из пп. 1-28, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности, соответствующей остаткам 21-135 SEQ ID NO: 1.

32. Способ по любому из пп. 1-31, где полипептид ActRII содержит аминокислотную последовательность, 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 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

33. Способ по любому из пп. 1-31, где полипептид ActRII содержит аминокислотную последовательность, 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 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3.

34. Способ по любому из пп.1-33, где полипептид ActRII представляет собой

слитый белок, дополнительно содержащий домен Fc иммуноглобулина.

35. Способ по п.34, где домен Fc иммуноглобулина представляет собой домен Fc иммуноглобулина IgG1.

36. Способ по п.34 или 35, где слитый белок Fc дополнительно содержит линкерный домен, расположенный между доменом полипептида ActRII и доменом Fc иммуноглобулина.

37. Способ по п.36, где линкерный домен выбран из группы, состоящей из: TGGG (SEQ ID NO: 20), TGGGG (SEQ ID NO: 18), SGGGG (SEQ ID NO: 19), GGGGS (SEQ ID NO: 22), GGG (SEQ ID NO: 16), GGGG (SEQ ID NO: 17) и SGGG (SEQ ID NO: 21).

38. Способ по любому из пп. 1-37, где полипептид ActRII содержит аминокислотную последовательность, 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 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23.

39. Способ по любому из пп. 1-37, где полипептид ActRII содержит аминокислотную последовательность, 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 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 40.

40. Способ по любому из пп.1-39, где полипептид восстанавливают после лиофилизации.

41. Способ по любому из пп.1-40, где полипептид является растворимым.

42. Способ по любому из пп.1-41, где полипептид вводят пациенту с помощью подкожной инъекции.

43. Способ по любому из пп.1-42, где полипептид вводят пациенту по схеме, выбранной из группы, состоящей из: каждую неделю, каждые 2 недели, каждые 3 недели и каждые 4 недели.

44. Способ по любому из пп.1-42, где полипептид вводят пациенту каждые 3 недели.

45. Способ по любому из пп.1-42, где полипептид вводят пациенту каждые 4 недели.

46. Способ по любому из пп.1-45, где полипептид является частью гомодимерного белкового комплекса.

47. Способ по любому из пп.1-46, где полипептид является гликозилированным.

48. Способ по любому из пп.1-47, где полипептид имеет паттерн гликозилирования, который можно получить путем экспрессии в клетках яичника китайского хомячка.

49. Способ по любому из пп. 1-48, где полипептид ActRII связывается с одним или несколькими лигандами, выбранными из группы, состоящей из: активина А, активина В и GDF11.

50. Способ по любому из пп.1-48, где полипептид ActRII связывается с активином и/или GDF11.

51. Способ по п.49 или 50, где полипептид ActRII дополнительно связывается с одним или несколькими лигандами, выбранными из группы, состоящей из: BMP10, GDF8 и BMP6.

52. Способ по любому из пп.1-51, включающий дополнительное введение пациенту дополнительного активного агента и/или поддерживающей терапии.

53. Способ по п.52, где дополнительный активный агент и/или поддерживающая терапия выбраны из группы, состоящей из: бета-блокаторов, ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (ингибиторов ACE), блокаторов рецепторов ангиотензина (ARB), диуретиков, гиполипидемических препаратов, блокаторов эндотелина, ингибиторов PDE5, простацклинов и левожелудочкового устройства вспомогательного кровообращения (LVAD).

54. Способ по п.52, где дополнительный активный агент и/или поддерживающая терапия выбраны из группы, состоящей из: простацклина и его производных (*например*, эпопростенола, трепростинила и илопроста); агонистов рецептора простацклина (*например*, селексипага); антагонистов рецептора эндотелина (*например*, телина, амбризентана, мацитентана и бозентана); блокаторов кальциевых каналов (*например*, амлодипина, дилтиазема и нифедипина); антикоагулянтов (*например*, варфарина); диуретиков; кислородной терапии; предсердной септостомии; легочной тромбозндартерэктомии; ингибиторов фосфодиэстеразы 5 типа (*например*, силденафила и тадалафила); активаторов растворимой гуанилатциклазы (*например*, цинацигуата и риоцигуата); ингибиторов ASK-1 (*например*, СИА; SCH79797; GS-4997; MSC2032964A; 3Н-нафто[1,2,3-de]хинилин-2,7-дионон, NQDI-1; 2-тиокс -тиазолидинон, 5-бром-3-(4-оксо-2-тиоксотиазолидин-5-илиден)-1,3-дигидроиндол-2-она); антагонистов NF-κB (*например*, dh404, CDDO-эпоксида; 2,2-дифторпропионамида; C28 имидазола (CDDO-Im); 2-циано-3,12-диоксоол-1,9-диен-28-овой кислоты (CDDO); 3-ацетилолеаноловой кислоты; 3-трифторацетилолеаноловой кислоты; 28-метил-3-ацетилолеанана; 28-метил-3-трифторацетилолеанана; 28-метилоксиолеаноловой кислоты; SZC014; SCZ015; SZC017; ПЭГилированных производных олеаноловой кислоты; 3-О-(бета-D-глюкопиранозил)олеаноловой кислоты; 3-О-β-D-глюкопиранозил-(1-->3)-бета-D-глюкопиранозил]олеаноловой кислоты; 3-О-[бета-D-глюкопиранозил-(1-->2)-бета-D-глюкопиранозил]олеаноловой кислоты; 28-О-бета-D-глюкопиранозилового эфира 3-О-[бета-D-глюкопиранозил-(1-->3)-бета-D-глюкопиранозил]олеаноловой кислоты; 28-О-бета-D-глюкопиранозилового эфира 3-О-[бета-D-глюкопиранозил-(1-->2)-бета-D-глюкопиранозил]олеаноловой кислоты; 3-О-[α-L-рамнопиранозил-(1-->3)-бета-D-глюкуронопиранозил]олеаноловой кислоты; 28-О-бета-D-глюкопиранозилового эфира 3-О-[альфа-L-рамнопиранозил-(1-->3)-бета-D-глюкуронопиранозил]олеаноловой кислоты; 28-О-β-D-глюкопиранозилолеаноловой кислоты; 3-О-β-D-глюкопиранозил (1→3)-β-D-глюкопиранозидурановой кислоты (CS1); олеаноловой кислоты 3-О-β-D-глюкопиранозил (1→3)-β-D-глюкопиранозидурановой кислоты (CS2); метил-3,11-диоксоолеан-12-ен-28-лата (ДИОКСОЛА); ZCVI₄ -2; бензил-3-дегидроокси-1,2,5-

оксадиазоло[3',4':2,3]олеанолата); левожелудочкового устройства вспомогательного кровообращения (LVAD) и трансплантации легких и/или сердца.

55. Способ по любому из пп. 1-54, где пациента лечили одним или несколькими агентами, выбранными из группы, состоящей из: ингибиторов фосфодиэстеразы типа 5, стимуляторов растворимой гуанилатциклазы, агониста рецептора простациклина и антагонистов рецептора эндотелина.

56. Способ по п.55, где один или несколько агентов выбраны из группы, состоящей из: бозентана, силденафила, берапроста, мацитентана, селексипага, эпопростенола, трепростинила, илопроста, амбризентана и тадалафила.

57. Способ по любому из пп.1-56, где способ дополнительно включает введение одного или нескольких агентов, выбранных из группы, состоящей из: ингибиторов фосфодиэстеразы типа 5, стимуляторов растворимой гуанилатциклазы, агониста рецептора простациклина и антагонистов рецептора эндотелина.

58. Способ по п.57, где один или несколько агентов выбраны из группы, состоящей из: бозентана, силденафила, берапроста, мацитентана, селексипага, эпопростенола, трепростинила, илопроста, амбризентана и тадалафила.

59. Способ по любому из пп.1-58, где перед введением полипептида пациента лечили одним или несколькими вазодилататорами.

60. Способ по любому из пп. 1-59, где способ дополнительно включает введение одного или нескольких вазодилататоров.

61. Способ по п.59 или 60, где один или несколько вазодилататоров выбраны из группы, состоящей из простациклина, эпопростенола и силденафила.

62. Способ по п.61, где вазодилататором является простациклин.

63. Способ по любому из пп. 1-62, где пациент получал одну или несколько терапий РАН.

64. Способ по п.63, где одна или несколько терапий РАН выбраны из группы, состоящей из: простациклина и его производных (*например*, эпопростенола, трепростинила и илопроста); агонистов рецептора простациклина (*например*, селексипага); антагонистов рецептора эндотелина (*например*, телена, амбризентана, мацитентана и бозентана); блокаторов кальциевых каналов (*например*, амлодипина, дилтиазема и нифедипина); антикоагулянтов (*например*, варфарина); диуретиков; кислородной терапии; предсердной септостомии; легочной тромбоэндартерэктомии; ингибиторов фосфодиэстеразы 5 типа (*например*, силденафила и тадалафила); активаторов растворимой гуанилатциклазы (*например*, цинацигуата и риоцигуата); ингибиторов ASK-1 (*например*, СПА; SCH79797; GS-4997; MSC2032964A; 3Н-нафто[1,2,3-de]хинилин-2,7-дионов, NQDI-1; 2-тиоксо-тиазолидинов, 5-бром-3-(4-оксо-2-тиоксо-тиазолидин-5-илиден)-1,3-дигидроиндол-2-она); антагонистов NF-κB (*например*, dh404, CDDO-эпоксида; 2,2-дифторпропионамида; C28 имидазола (CDDO-Im); 2-циано-3,12-диоксоол-1,9-диен-28-овой кислоты (CDDO); 3-ацетилолеаноловой кислоты; 3-трифторацетилолеаноловой кислоты; 28-метил-3-ацетилолеанана; 28-метил-3-

трифторацетилолеанана; 28-метилоксиолеаноловой кислоты; SZC014; SCZ015; SZC017; ПЭГилированных производных олеаноловой кислоты; 3-О-(бета-D-глюкопиранозил)олеаноловой кислоты; 3-О-β-D-глюкопиранозил-(1→3)-бета-D-глюкопиранозил]олеаноловой кислоты; 3-О-[бета-D-глюкопиранозил-(1→2)-бета-D-глюкопиранозил]олеаноловой кислоты; 28-О-бета-D-глюкопиранозилового эфира 3-О-[бета-D-глюкопиранозил-(1→3)-бета-D-глюкопиранозил]олеаноловой кислоты; 28-О-бета-D-глюкопиранозилового эфира 3-О-[бета-D-глюкопиранозил-(1→2)-бета-D-глюкопиранозил]олеаноловой кислоты; 3-О-[α-L-рамнопиранозил-(1→3)-бета-D-глюкуронопиранозил]олеаноловой кислоты; 28-О-бета-D-глюкопиранозилового эфира 3-О-[альфа-L-рамнопиранозил-(1→3)-бета-D-глюкуронопиранозил]олеаноловой кислоты; 28-О-β-D-глюкопиранозилолеаноловой кислоты; 3-О-β-D-глюкопиранозил (1→3)-β-D-глюкопиранозидурановой кислоты (CS1); олеаноловой кислоты 3-О-β-D-глюкопиранозил (1→3)-β-D-глюкопиранозидурановой кислоты (CS2); метил-3,11-диоксолеан-12-ен-28-лата (ДИОКСОЛА); ZCVI₄ -2; бензил-3-дегидрокси-1,2,5-оксадиазоло[3',4':2,3]олеанолата); левожелудочкового устройства вспомогательного кровообращения (LVAD) и трансплантации легких и/или сердца.

ActRIIa ILGRSETQEC LFFNANWEKD RTNQTVGVEPC YGDKDKRRHC FATWKNISGS
ActRIIb GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT

IEIVKQGOWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV YFCCEGNMC NEKFSYFPEM
IELVKKGOWL DDFNCDRQE CVATEENPQV YFCCEGNFC NERFTHLPEA

EVTQPTSNPV TPKPP (SEQ ID NO: 2)
GGPEVTYEPPTAPT (SEQ ID NO: 31)

ФИГ. 1

1020304050
Человек	ILGRSETQEC	FFNANWEKD	RTNQTQVEPC	YGDKDKRRHC	FATWXNISGS
Овца	ILGRSETQEC	LFYNANWERD	RTNRTGVESC	YGDKDKRRHC	FATWXNISGS
Крот	ILGRSETQEC	FFNANWERD	RTNQTQVEPC	YGDKDKRRHC	FATWXNISGS
Мышь	ILGRSETQEC	FFNANWERD	RTNQTQVEPC	YGDKDKRRHC	FATWXNISGS
Курица	ILGRSETQEC	LYNANWEKD	KTNRSGIEPC	YGDKDKRRHC	FATWXNISGS
Корова	ILGRSETQEC	LFYNANWERD	RTNRTGVESC	YGDKDKRRHC	FATWXNISGS
Сова	ILGRSETQEC	LYNANWEKD	KTNRSGIEPC	YGDKDKRRHC	FATWXNISGS
Летучая мышь	ILGRSETQEC	LFYNANWERD	KTNRTGVELC	YGDKDKRRHC	FATWXNISGS

60708090100
Человек	IEIVKQGCWL	DDINCYDRTD	CVEKKDSPEV	YFCCCEGNC	NEKFSTFPEM
Овца	IDIVKQGCWL	DDINCYDRTD	CIEKKDSPEV	YFCCCEGNC	NERFSTFPEM
Крот	IEIVKQGCWL	DDINCYDRTD	CIEKKDSPEV	YFCCCEGNC	NEKFSTFPEM
Мышь	IEIVKQGCWL	DDINCYDXTD	CIEKKDSPEV	YFCCCEGNC	NEKFSTFPEM
Курица	IEIVKQGCWL	DDINCYDRND	CIEKKDSPEV	FFCCCEGNC	NERFFTFPEM
Корова	IEIVKQGCWL	DDINCYDRTD	CIEKKDSPEV	YFCCCEGNC	NERFSTFPEM
Сова	IEIVKQGCWL	DDINCYDRND	CIEKKDSPEV	FFCCCEGNC	NERFFTFPEM
Летучая мышь	IEIVKQGCWL	DDINCYDKTD	CIEKKDSPEV	YFCCCEGNC	NERFSTFPEM

110.....	
Человек	EVTQPTSNPV TPKPP	(SEQ ID NO:6)
Овца	EVTQPTSNPV TPKXP	(SEQ ID NO:7)
Крот	EVTQPTSNPV TPXAP	(SEQ ID NO:8)
Мышь	EVTQPTSNPV TPKPP	(SEQ ID NO:9)
Курица	EVTQPTSNPV TPXPP	(SEQ ID NO:10)
Корова	EVTQPTSNPV TPXPP	(SEQ ID NO:36)
Сова	EVTQPTSNPV TPXPP	(SEQ ID NO:37)
Летучая мышь	EVTQPTSNPV TPKPP	(SEQ ID NO:38)

ФИГ. 2

IgG1 -----THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF 53
 IgG4 ---ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQF 57
 IgG2 -----VECPPCPAPPVAG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQF 51
 IgG3 EPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQF 60

** **** . * *****:*****:*

IgG1 N^WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 113
 IgG4 N^WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT 117
 IgG2 N^WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT 111
 IgG3 K^WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 120

:*****:***:*****:*****.***:****

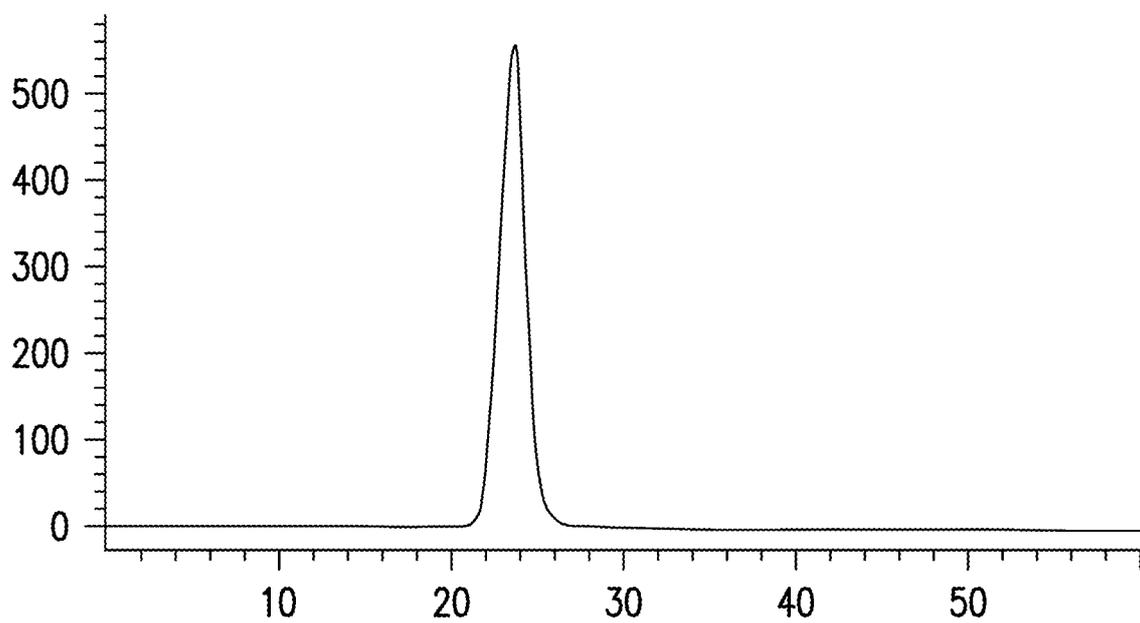
IgG1 ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^TTP 173
 IgG4 ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^TTP 177
 IgG2 ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^TTP 171
 IgG3 ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYK^TTP 180

:**:*****:*****.*****:***

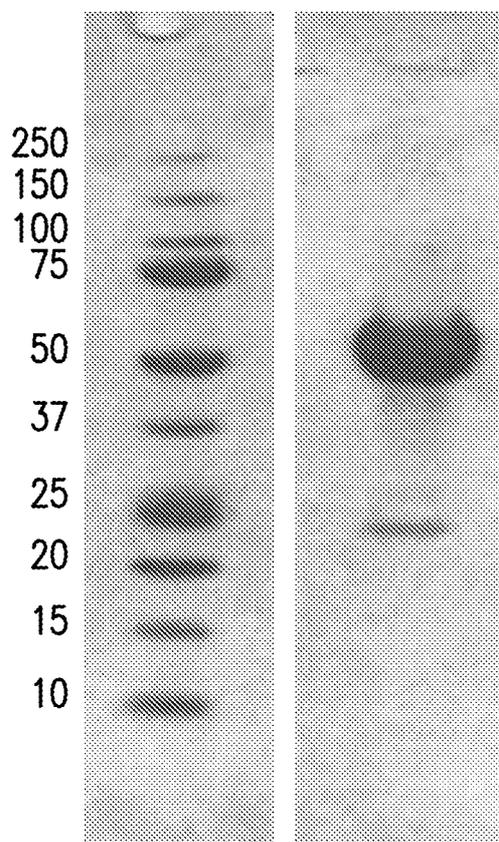
IgG1 PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS^CSVMHEALHNHYTQK^SLSLSPGK 225 (SEQ ID NO:32)
 IgG4 PVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS^CSVMHEALHNHYTQK^SLSLSLGK 229 (SEQ ID NO:35)
 IgG2 PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS^CSVMHEALHNHYTQK^SLSLSPGK 223 (SEQ ID NO:33)
 IgG3 PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIF^SCSVMHEALHNRF^TQK^SLSLSPGK 232 (SEQ ID NO:34)

*:*****:*****:***:*****:***** **

4/5



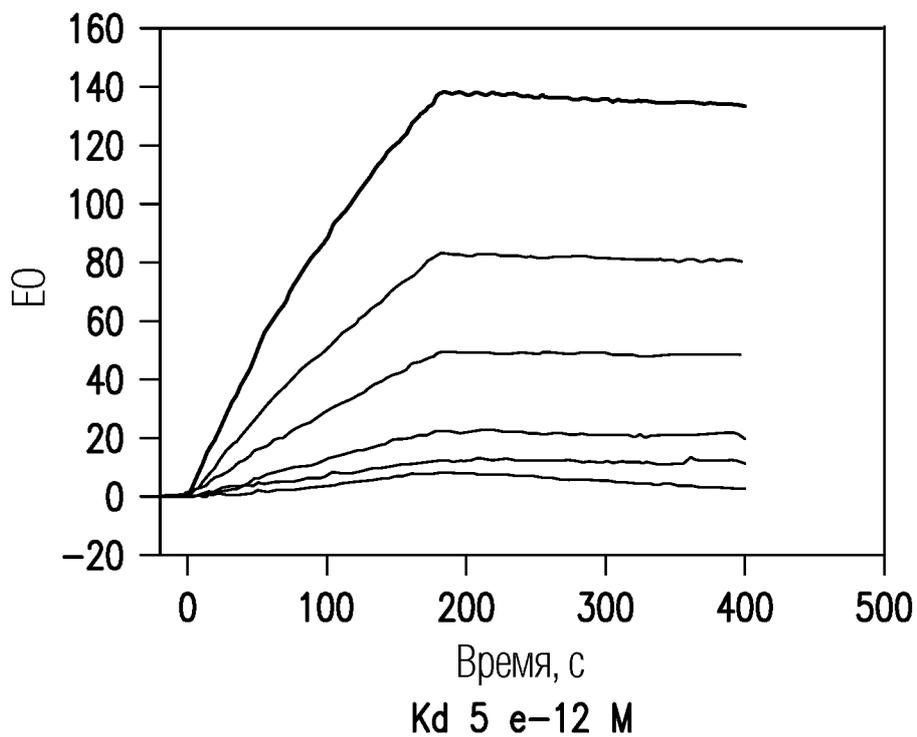
ФИГ. 4А



ФИГ. 4В

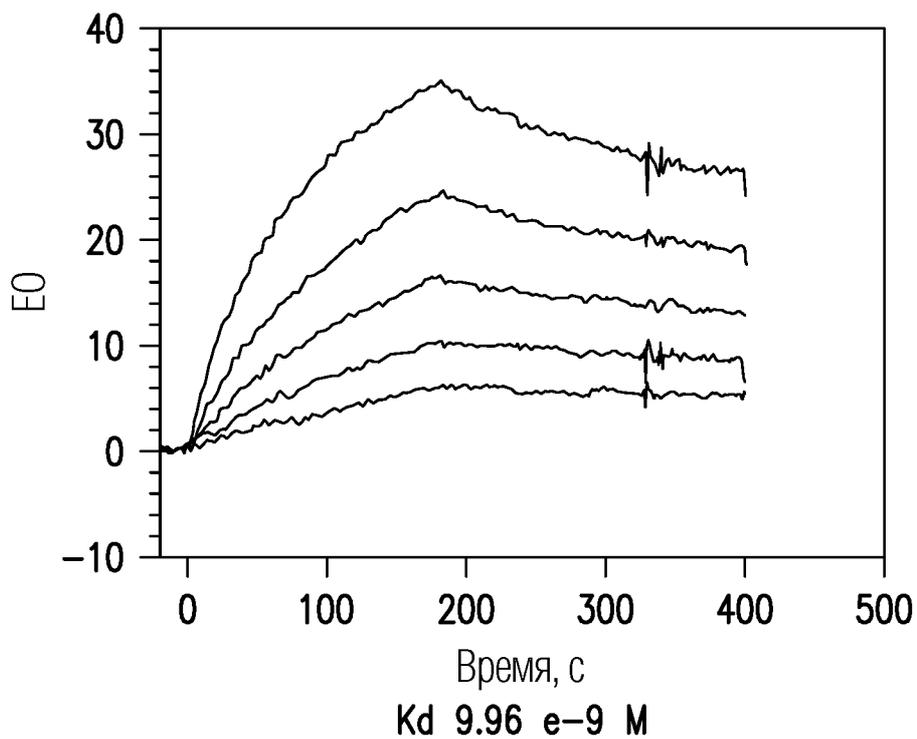
5/5

Связывание ActRIIa с активином



ФИГ. 5А

Связывание ActRIIa с GDF11



ФИГ. 5В