



(51) МПК
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 14/47 (2020.05); C07K 14/705 (2020.05); C07K 19/00 (2020.05); C12N 15/09 (2020.05); A61K 38/17 (2020.05); A61P 19/08 (2020.05); C07K 2319/30 (2020.05)

(21)(22) Заявка: 2017138537, 12.04.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.04.2016Дата регистрации:
02.10.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
22.04.2015 US 62/150,994;
02.12.2015 US 62/262,356

(43) Дата публикации заявки: 22.05.2019 Бюл. № 15

(45) Опубликовано: 02.10.2020 Бюл. № 28

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 22.11.2017(86) Заявка РСТ:
US 2016/027046 (12.04.2016)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/171948 (27.10.2016)Адрес для переписки:
191036, Санкт-Петербург, а/я 24,
"НЕВИНПАТ"

(72) Автор(ы):

**ХАН Хк (US),
ЧЖОУ Сяолань (US)**

(73) Патентообладатель(и):

Байоджен МА Инк. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **GRAY P. C. et al., Identification of a binding site on the type II activin receptor for activin and inhibin, Journal of Biological Chemistry, 2000, V. 275, N. 5, p.3206-3212.**
THOMPSON T. B. et al., Structures of an ActRIIB: activin A complex reveal a novel binding mode for TGF- β ligand: receptor interactions, The EMBO journal, 2003, V. 22, N. 7, (см. прод.)

(54) **Новые гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов для лечения заболеваний, связанных с мышечной атрофией**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к получению мутантного растворимого полипептида внеклеточного домена рецептора активина ИВ (ActRIIB-ECD), и может быть использовано в медицине. Мутантный полипептид ActRIIB-ECD способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную

аффинность связывания с костным морфогенетическим белком 9 (BMP9) относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа и может быть использован для эффективного лечения связанных с мышечной атрофией заболеваний или заболеваний костной системы. 3 н. и 16 з.п. ф-лы, 12 ил., 8 табл., 8 пр.

(56) (продолжение):

p.1555-1566. SAKO D. et al., Characterization of the ligand binding functionality of the extracellular domain of activin receptor type IIb, Journal of Biological Chemistry, 2010, V. 285, N. 27, p.21037-21048. WO 2007053775, 10.05.2007. CHEN X. et al., Fusion protein linkers: property, design and functionality, Advanced drug delivery reviews, 2013, V. 65, N. 10, p.1357-1369. MAEDA Y. et al., Engineering of functional chimeric protein G-VargulaLuciferase, Analytical biochemistry, 1997, V. 249, N. 2, p.147-152. EA 201491231, 30.09.2014.

R U
2 7 3 3 3 4 9 2
C 2

R U
2 7 3 3 3 4 9 2
C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 14/47 (2020.05); *C07K 14/705* (2020.05); *C07K 19/00* (2020.05); *C12N 15/09* (2020.05); *A61K 38/17* (2020.05); *A61P 19/08* (2020.05); *C07K 2319/30* (2020.05)

(21)(22) Application: **2017138537, 12.04.2016**(24) Effective date for property rights:
12.04.2016Registration date:
02.10.2020

Priority:

(30) Convention priority:
22.04.2015 US 62/150,994;
02.12.2015 US 62/262,356(43) Application published: **22.05.2019 Bull. № 15**(45) Date of publication: **02.10.2020 Bull. № 28**(85) Commencement of national phase: **22.11.2017**(86) PCT application:
US 2016/027046 (12.04.2016)(87) PCT publication:
WO 2016/171948 (27.10.2016)Mail address:
191036, Sankt-Peterburg, a/ya 24, "NEVINPAT"

(72) Inventor(s):

HAN Hq (US),
ZHOU Xiaolan (US)

(73) Proprietor(s):

BIOGEN MA INC. (US)(54) **NOVEL HYBRID ACTRIIB LIGAND TRAP PROTEINS FOR TREATING DISEASES ASSOCIATED WITH MUSCULAR ATROPHY**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to producing a mutant soluble polypeptide of the extracellular domain of the activin IIB (ActRIIB-ECD) receptor, and can be used in medicine.

EFFECT: mutant ActRIIB-ECD polypeptide is capable of binding to myostatin and activin A, but

demonstrates reduced affinity binding to bone morphogenetic protein 9 (BMP9) relative to ActRIIB-ECD wild-type polypeptide and can be used for effective treatment of diseases associated with muscular atrophy or diseases of bone system.

19 cl, 12 dwg, 8 tbl, 8 ex

C 2
2 6 4 3 3 2
R UR U
2 7 3 3 4 9 2
C 2

Перекрестная ссылка на родственные заявки

В данной заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США No. 62/150994, поданной 22 апреля 2015 года, и предварительной заявки на патент США No. 62/262356, поданной 2 декабря 2015 года, каждая из которых включена в данное

5 описание ссылкой во всей полноте.

Предшествующий уровень техники

Мышечная атрофия относится к прогрессирующей потере мышечной массы и/или к прогрессирующему ослаблению и дегенерации мышц, включая скелетные и произвольно сокращающиеся мышцы, сердечные мышцы, контролирующие сердце

10 (кардиомиопатии) и гладкие мышцы. Хроническая мышечная атрофия представляет собой состояние (а именно персистирующее в течение продолжительного периода времени), характеризующееся прогрессирующей потерей мышечной массы, а также мышечным ослаблением и дегенерацией. Потеря мышечной массы возникает, когда скорость распада мышечного белка превышает синтез мышечного белка.

15 Мышечная атрофия представляет собой инвалидизирующее и угрожающее жизни болезненное состояние, которое ассоциировано с развитием множества хронических, неврологических, генетических, воспалительных, фиброзных или инфекционных патологий, включая, например, мышечные дистрофии, боковой амиотрофический склероз, миозит, денервирующие мышечные атрофии, синдром анорексии-кахексии,

20 злокачественные новообразования, ревматоидный артрит, остеоартрит, диабет, саркопеническое ожирение, возрастную саркопению, андрогенную депривацию, кортикостероидную миопатию, воспалительное заболевание кишечника, цирроз печени, хроническую обструктивную легочную болезнь, легочный фиброз, хроническую почечную недостаточность, травму, кардиомиопатию, хроническую сердечную

25 недостаточность и ВИЧ-инфекцию. Другие состояния, которые вызывают мышечную атрофию, включают хроническую боль в нижней части спины, пожилой возраст, повреждение центральной нервной системы, поражение периферических нервов, химическое повреждение, обширные ожоги, бедренно/коленные протезы, дисфункциональную атрофию, воздействие микрогравитации и долговременную

30 госпитализацию.

Рецептор активина IIA (ActRIIA) и рецептор активина IIB (ActRIIB) представляют собой рецепторы II типа для подсемейства членов семейства трансформирующего фактора роста бета (TGF- β), включая, например, активин А, миостатин (также известный как GDF-8), дифференцирующий фактор роста 11 (GDF-11) и различные другие костные

35 морфогенетические белки (BMP), такие как BMP-3, BMP-6, BMP-9 (также известный как GDF-2) и BMP-10. Связывание этих лигандов семейства TGF- β с ActRIIA и/или ActRIIB может регулировать дифференцировку клеток, апоптоз, синтез и распад белка, минерализацию, гемопоэз, ангиогенез, синтез стероидов, адгезию, миграцию, продукцию

40 внеклеточного матрикса и фиброгенез. Специфический ответ зависит от типов и уровней TGF- β лигандов и рецепторов, а также клеточного состояния и окружения. Известно, что измененная экспрессия этих лигандов ассоциирована с рядом заболеваний и расстройств. Например, повышенные уровни сывороточного активина А наблюдались при болезненных состояниях: мышечной атрофии, раке, хронической сердечной недостаточности, хронической почечной недостаточности, воспалении, фиброзе, анемии,

45 потере костной массы и старении, и, как полагают, вносят вклад в патогенез и прогрессирование заболевания.

ActRIIA и ActRIIB были идентифицированы как рецепторы II типа для активинов, включая активин А, активин В и активин АВ. ActRIIB представляет собой

высокоаффинный рецептор для миостатина, ключевого негативного регулятора мышечного роста, и поэтому играет центральную роль в регулировании мышечной массы.

Различные ActRIIA-Fc и ActRIIB-Fc слитые белки проходили или проходят клиническую оценку в настоящее время. ActRIIA-Fc слитый белок (Acceleron Pharma's ACE-011) проходил клиническую оценку (Ph1, Ph2a) у пациентов с остеолитическими поражениями при множественной миеломе и остеопорозе. К сожалению, при явной эффективности клиническому потенциалу ACE-011 в отношении лечения остеопороза препятствовали проблемы безопасности (высокий рост числа эритроцитов в крови (RBC)). ACE-011 в настоящее время проходит оценку в отношении вызванной химиотерапией анемии (CIA) у пациентов с метастатическим немелкоклеточным раком легких (NSCLC) (Ph2/3) (ClinicalTrials.gov). ActRIIB-Fc слитый белок (Acceleron Pharma's ACE-031) проходил клиническую оценку (Ph1, Ph2) в отношении терапевтической эффективности при мышечной дистрофии Дюшенна (DMD). ACE-031 демонстрировал значительный рост мышц, который был более выраженным, чем вызванный селективным ингибитором миостатина, таким как антитело против миостатина, пептид-ассоциированное антитело или пропептид. К сожалению, несмотря на многообещающую эффективность в отношении мышечного роста, клиническому потенциалу ACE-031 препятствовали побочные эффекты в виде кровотечений из носа и десен у пациентов с DMD, поэтому имело место сдерживание в клиническом продвижении ACE-031 (Smith R.C. и Lin B.K., Curr Opin Support Palliat Care. 7(4): 352-360, 2013). ActRIIB-Fc слитый белок (Acceleron Pharma's ACE-083) в настоящее время проходит клиническую оценку в Ph1 на здоровых субъектах с использованием местной доставки посредством внутримышечной инъекции (ClinicalTrials.gov), а ActRIIB-Fc слитый белок от Atara Biotherapeutic's (STM 434) включен в оценку (идет набор испытуемых в Ph1) у пациентов с раком яичников или другими распространенными солидными опухолями (ClinicalTrials.gov).

Несмотря на эти преимущества, по-прежнему явно имеется критическая необходимость в предложении новых терапевтических средств, являющихся как высокоэффективными, так и безопасными для лечения заболеваний, связанных с мышечной атрофией.

Раскрытие изобретения

В одном аспекте настоящего изобретения предложены выделенные новые гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов, содержащие новые гибридные растворимые ActRIIB-ECD полипептиды, которые сохраняют нейтрализующие миостатин и активин А активности, но демонстрируют чрезвычайно пониженную нейтрализацию BMP9. В различных воплощениях гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов содержат гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где по меньшей мере один из аминокислотных остатков R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 или T110 замещен другой аминокислотой, и где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа. В различных воплощениях гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов содержат гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где по меньшей мере два из аминокислотных остатков R3, I6, Y7, Y8, L14,

E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 или T110 замещены другой аминокислотой, и где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа. В различных воплощениях гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов содержат гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где по меньшей мере три из аминокислотных остатков R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 или T110 замещены другой аминокислотой, и где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа. В различных воплощениях гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов содержат гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где по меньшей мере четыре из аминокислотных остатков R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 или T110 замещены другой аминокислотой, и где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа. В различных воплощениях гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов содержат гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где по меньшей мере пять из аминокислотных остатков R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 или T110 замещены другой аминокислотой, и где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа. В различных воплощениях гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов содержат гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где по меньшей мере шесть из аминокислотных остатков R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 или T110 замещены другой аминокислотой, и где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа. В различных воплощениях гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов содержат гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где по меньшей мере семь из аминокислотных остатков R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 или T110 замещены другой аминокислотой, и где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует

пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа. В различных воплощениях гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов содержат гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где по меньшей мере восемь из аминокислотных остатков R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 или T110 замещены другой аминокислотой, и где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином A, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа. В различных воплощениях гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов содержат гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где по меньшей мере девять из аминокислотных остатков R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 или T110 замещены другой аминокислотой, и где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином A, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа. В различных воплощениях гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов содержат гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где по меньшей мере десять из аминокислотных остатков R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 или T110 замещены другой аминокислотой, и где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином A, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа. В различных воплощениях гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов содержат гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где по меньшей мере пятнадцать из аминокислотных остатков R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 или T110 замещены другой аминокислотой, и где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином A, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа. В различных воплощениях гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов содержат гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где по меньшей мере двадцать из аминокислотных остатков R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 или T110 замещены другой аминокислотой, и где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином A, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа. В различных воплощениях гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов содержат гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где по меньшей мере двадцать пять из аминокислотных остатков R3, I6,

Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 или T110 замещены другой аминокислотой, и где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа. В различных воплощениях гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов содержат гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где по меньшей мере тридцать из аминокислотных остатков R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 или T110 замещены другой аминокислотой, и где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа.

В различных воплощениях гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов содержат гибридные растворимые ActRIIB-ECD полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 37, где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа. В различных воплощениях гибридные растворимые ActRIIB полипептиды представляют собой гибридные растворимые ActRIIB полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3-37, где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа.

В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116 или SEQ ID NO: 117, где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную аффинность

связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа. В различных воплощениях гибридные растворимые ActRIIB полипептиды представляют собой гибридные растворимые ActRIIB полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 51-117, где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа.

В другом аспекте гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов по настоящему изобретению содержат гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид и по меньшей мере один гетерологичный белок, где гибридный ActRIIB белок-ловушка лигандов способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа. В различных воплощениях гетерологичный белок представляет собой Fc домен. В различных воплощениях Fc домен представляет собой Fc домен человеческого IgG. В различных воплощениях Fc домен имеет происхождение из последовательности константной области тяжелой цепи человеческого IgG1, изложенной в SEQ ID NO: 38. В различных воплощениях Fc домен представляет собой Fc домен, имеющий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 39. В различных воплощениях Fc домен имеет происхождение из последовательности константной области тяжелой цепи человеческого IgG2, изложенной в SEQ ID NO: 40. В различных воплощениях Fc домен представляет собой Fc домен, имеющий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 41. В различных воплощениях Fc домен имеет происхождение из последовательности константной области тяжелой цепи человеческого IgG4, изложенной в SEQ ID NO: 42. В различных воплощениях Fc домен представляет собой Fc домен, имеющий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 43.

В различных воплощениях гетерологичный белок присоединен к гибриднему растворимому ActRIIB-ECD полипептиду посредством линкерного и/или шарнирного линкерного пептида. Линкер или шарнирный линкер может представлять собой искусственную последовательность между 5, 10, 15, 20, 30, 40 или более аминокислот, которые относительно свободны от вторичной структуры. В различных воплощениях линкер является обогащенным по содержанию G/S, например, по меньшей мере примерно 60%, 70%, 80%, 90% или более аминокислот в линкере представляют собой G или S. В различных воплощениях линкер имеет мотив (GGGGS (SEQ ID NO: 44))_n, где n равно 1-6. В различных воплощениях линкер, имеющий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 44, используют с шарнирным линкером, имеющим аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 118, для присоединения Fc человеческого IgG4 (SEQ ID NO: 43) к гибриднему растворимому ActRIIB-ECD полипептиду (например, любой из SEQ ID NO: 3-37 или 51-117) по настоящему изобретению.

В другом аспекте настоящего изобретения предложены выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие полинуклеотид, кодирующий гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид по настоящему изобретению. В различных воплощениях полинуклеотиды кодируют одну из полипептидных последовательностей, изложенных в SEQ ID NO: 3-37 или 51-117, где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа.

В различных воплощениях полинуклеотиды кодируют полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из полипептидных последовательностей, изложенных в SEQ ID NO: 3-37 или 51-117, где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа.

В различных воплощениях полинуклеотиды кодируют полипептид, имеющий по меньшей мере 90%-ную идентичность любой из полипептидных последовательностей, изложенных в SEQ ID NO: 3-37 или 51-117, где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа.

В различных воплощениях полинуклеотиды кодируют полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из полипептидных последовательностей, изложенных в SEQ ID NO: 3-37 или 51-117, где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа.

В различных воплощениях выделенные молекулы нуклеиновой кислоты содержат описанные здесь полинуклеотиды и дополнительно содержат полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один гетерологичный белок, описанный здесь. В различных воплощениях молекулы нуклеиновой кислоты дополнительно содержат полинуклеотиды, кодирующие линкеры и шарнирные линкеры, описанные здесь.

В другом аспекте настоящего изобретения предложены векторы, содержащие описанные здесь нуклеиновые кислоты. В различных воплощениях вектор представляет собой вектор экспрессии. В другом аспекте настоящего изобретения предложены выделенные клетки, содержащие нуклеиновые кислоты по изобретению. В различных воплощениях клетка представляет собой клетку-хозяин, содержащую вектор экспрессии по изобретению. В другом аспекте предложены способы получения ActRIIB белков-ловушек лигандов путем культивирования клеток-хозяев в условиях, способствующих экспрессии белков или полипептидов.

В другом аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая выделенные гибридные растворимые ActRIIB полипептиды или гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов в смеси с фармацевтически приемлемым носителем.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения или предупреждения заболевания, связанного с мышечной атрофией, у субъекта, страдающего таким расстройством, путем введения указанному субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей гибридный ActRIIB белок-ловушку лигандов по настоящему изобретению. Заболевания или состояния, связанные с мышечной атрофией, включают, без ограничения, следующие: мышечные дистрофии (такие как миодистрофия Дюшенна (DMD), мышечная дистрофия Беккера, дистрофия Лейдена-Мебиуса, миотоническая MD и плече-лопаточно-лицевая миопатия (FSHD)), миозит (такой как дерматомиозит, миозит с тельцами включения, юношеские формы миозита, полимиозит), миопатии (включая врожденную миопатию и приобретенную миопатию, такую как диабетическая миопатия или вызванная приемом лекарств миопатия), заболевания двигательных нейронов (такие как болезнь Лу Герига или боковой амиотрофический склероз), тяжелая миастения, нейродегенеративные расстройства (такие как болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона и болезнь Альцгеймера), мышечная атрофия, ассоциированная с раковыми заболеваниями (такими

как рак поджелудочной железы, рак легкого, рак желудка, рак яичника, колоректальный рак, меланома, лейкоз, рак легких, рак предстательной железы, рак головного мозга, рак мочевого пузыря и рак головы и шеи), мышечная атрофия, ассоциированная с хронической сердечной недостаточностью (CHF), хронической болезнью почек (CKD),
5 печеночной недостаточностью, диабетом, хронической обструктивной болезнью легких (COPD), эмфиземой, муковисцидозом, ревматоидным артритом, остеоартритом, фиброзом печени, циррозом, травмой (такой как ожоги или травма при мотоциклетной аварии), переломом кости, трансплантацией органа (такой как трансплантация сердца, легкого, печени или почки), критическим состоянием в отделении интенсивной терапии
10 (ICU), денервацией (такой как удар или повреждение спинного мозга), андроген-депривационной терапией, кортикостероидной терапией, инфекциями (такими как СПИД или туберкулез), длительным постельным режимом, саркопеническим ожирением и возрастной саркопенией.

Кроме того, в настоящем изобретении предложены способы лечения сердечно-сосудистого заболевания у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся
15 в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтических композиций по изобретению. В одном воплощении субъект представляет собой субъекта-человека. В различных воплощениях сердечнососудистое заболевание выбрано из сердечной недостаточности, сердечной атрофии, фиброза сердца, легочной гипертензии,
20 миокардита, ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда, сердечных аритмий, болезни сердечного клапана, кардиомиопатии, перикардальной болезни, болезни аорты и синдрома Марфана.

Кроме того, в настоящем изобретении предложены способы лечения метаболического расстройства у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом,
25 терапевтически эффективного количества фармацевтических композиций по изобретению. В одном воплощении субъект представляет собой субъекта-человека. В различных воплощениях метаболическое расстройство выбрано из ожирения, дислипидемии, саркопенического ожирения, неалкогольной жировой дистрофии печени, такой как неалкогольный стеатогепатит, алкогольной жировой болезни печени,
30 инсулинорезистентности, диабета и метаболического синдрома, а также диабетической миопатии, диабетической нефропатии, диабетической нейропатии, диабетической ретинопатии и гемохроматоза.

Кроме того, в настоящем изобретении предложены способы лечения рака или метастаза рака у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом,
35 терапевтически эффективного количества фармацевтических композиций по изобретению. В одном воплощении субъект представляет собой субъекта-человека. В различных воплощениях рак выбран из рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичника, колоректального рака, меланомы, лейкоза, миелодиспластического синдрома, рака легкого, рака предстательной железы, рака головного мозга, рака
40 мочевого пузыря, рака головы и шеи или рабдомиосаркомы.

Кроме того, в настоящем изобретении предложены способы лечения аутоиммунного заболевания у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтических композиций по изобретению. В одном воплощении субъект представляет собой субъекта-человека. В
45 различных воплощениях заболевание выбрано из аутоиммунных расстройств, включая рассеянный склероз, системный склероз, диабет (типа 1), гломерулонефрит, тяжелую миастению, псориаз, системную красную волчанку, полимиозит, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит и первичный билиарный цирроз.

Кроме того, в настоящем изобретении предложены способы лечения артрита у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтических композиций по изобретению. В одном воплощении субъект представляет собой субъекта-человека. В различных воплощениях артрит выбран из ревматоидного артрита или остеоартрита.

Кроме того, в настоящем изобретении предложены способы лечения анорексии у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтических композиций по изобретению. В одном воплощении субъект представляет собой субъекта-человека. В различных воплощениях анорексия выбрана из нервной анорексии и синдрома анорексии-кахексии.

Кроме того, в настоящем изобретении предложены способы лечения заболевания печени у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтических композиций по изобретению. В одном воплощении субъект представляет собой субъекта-человека. В различных воплощениях заболевание печени выбрано из жировой дистрофии печени, включая неалкогольный стеатогепатит, фиброз печени или цирроз, печеночной недостаточности, аутоиммунного гепатита и печеночно-клеточной карциномы.

Также здесь предложены способы трансплантации органа или ткани у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтических композиций по изобретению. В одном воплощении субъект представляет собой субъекта-человека. В различных воплощениях трансплантация выбрана из трансплантаций органов, таких как сердце, почки, печень, легкие, поджелудочная железа, кишечник и вилочковая железа, или из тканевых трансплантаций костей, сухожилий, роговицы, кожи, сердечных клапанов, нервов и кровеносных сосудов.

Кроме того, в настоящем изобретении предложены способы лечения анемии у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтических композиций по изобретению. В одном воплощении субъект представляет собой субъекта-человека. В различных воплощениях анемия выбрана из различных анемических расстройств, включая железодефицитную анемию, перенасыщение железом, талассемию, гемолитическую анемию, серповидноклеточную анемию, пернициозную анемию, анемию Фанкони и апластическую анемию (такую как ассоциированную с раком анемию и вызванную химиотерапией анемию).

Кроме того, в настоящем изобретении предложены способы лечения фиброза у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтических композиций по изобретению. В одном воплощении субъект представляет собой субъекта-человека. В различных воплощениях фиброз выбран из интерстициального заболевания легких, идиопатического фиброза легких, муковисцидоза, фиброза печени, цирроза, фиброза сердца, фиброза почек, миелофиброза, идиопатического ретроперитонеального фиброза, нефрогенной фиброзирующей дерматии, воспалительного заболевания кишечника, келоидного фиброза, склеродермии или артрофиброза.

Кроме того, в настоящем изобретении предложены способы лечения боли у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтических композиций по изобретению. В одном воплощении субъект представляет собой субъекта-человека. В различных воплощениях боль выбрана из невропатической боли, соматической боли, висцеральной боли, воспалительной

боли, боли при раке, боли в спине или суставной боли.

Кроме того, в настоящем изобретении предложены способы лечения заболевания костной системы у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтических композиций по изобретению. В одном воплощении субъект представляет собой субъекта-человека. В различных воплощениях заболевание костной системы выбрано из остеопороза, остеомалации, несовершенного остеогенеза, прогрессирующей оссифицирующей фибродисплазии, вызванной костикостероидами потери костной массы, перелома кости или костного метастаза.

Кроме того, в настоящем изобретении предложены способы лечения состояния, связанного со старением, у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтических композиций по изобретению. В одном воплощении субъект представляет собой субъекта-человека. В различных воплощениях состояние, связанное со старением, выбрано из хрупкости костей у пожилых, старческой саркопении или остеоартрита.

Также здесь предложены способы индуцирования роста стволовых клеток для восстановления ткани или регенерации органа у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтических композиций по изобретению. В одном воплощении субъект представляет собой субъекта-человека. В различных воплощениях стволовая клетка выбрана из мышечной стволовой (сателлитной) клетки, сердечной стволовой клетки, мезенхимальной стволовой клетки, происходящей из костного мозга, и плюрипотентной стволовой клетки.

В другом аспекте изобретения предложены применения гибридных ActRIIB белков-ловушек лигандов для изготовления лекарственного средства для лечения любого расстройства или состояния, как описано здесь.

Краткое описание графических материалов

На Фиг. 1 показаны две иллюстративные молекулярные конфигурации для гибридных ActRIIB белков-ловушек лигандов по настоящему изобретению.

На Фиг. 2 показаны линейные графики с результатами клеточных анализов, используемых для оценки миостатин-нейтрализующих (левые панели), активин А-нейтрализующих (средние панели) и BMP9-нейтрализующих (правые панели) способностей гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов, имеющего аминокислотную последовательность AG-0003 (SEQ ID NO: 5), и гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов, имеющего аминокислотную последовательность AG-0005 (SEQ ID NO: 7), в сравнении с таковыми для белка ActRIIB-Fc дикого типа в качестве эталона сравнения (WT).

На Фиг. 3 показаны линейные графики с результатами клеточных анализов нейтрализующих активностей в отношении миостатина (верхняя левая), активина А (правая верхняя), активина В (нижняя левая) и BMP9 (нижняя правая) для гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов, имеющего аминокислотную последовательность AG-0014 (SEQ ID NO: 16), и гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов, имеющего аминокислотную последовательность AG-0027 (SEQ ID NO: 29), в сравнении с таковыми для белка ActRIIB-Fc дикого типа в качестве контроля (WT). Миостатин-, активин А- и активин В-нейтрализующие активности проверяли с использованием C2C12-CAGA-luc репортерного анализа, и BMP9-нейтрализующие активности анализировали с использованием C2C12-BRE-luc репортерного анализа, как описано в Примерах.

На Фиг. 4 показаны линейные графики, отображающие эффекты в отношении массы

тела у 9-недельных самцов мышей C57Bl/6, которым подкожно инъецировали PBS (носитель), ActRIIB-Fc дикого типа (WT), AG-0014 (SEQ ID NO: 16) и AG-0027 (SEQ ID NO: 29), соответственно, в дозировке 10 мг/кг один раз в неделю. Массы тела записывали на сутки 0, сутки 5, сутки 12 и сутки 18. n=6/8 на группу. Excel Student T-TEST проводили для статистического анализа. ***: P<0,001 против группы носителя.

На Фиг. 5 показана диаграмма, отображающая эффекты в отношении мышечной массы у 9-недельных самцов мышей C57Bl/6, которым подкожно инъецировали PBS (носитель), ActRIIB-Fc дикого типа (WT), AG-0014 (SEQ ID NO: 16) и AG-0027 (SEQ ID NO: 29), соответственно, в дозировке 10 мг/кг один раз в неделю (n=6/8 на группу). Индивидуальные икроножные мышцы от каждого животного рассекали и взвешивали во время окончательной некропсии. Статистический анализ проводили с использованием Excel Student T-TEST. ***: P<0,001 против группы носителя.

На Фиг. 6 показаны изображения мышины абдоминальной полости в тесте проницаемости сосудов с окрашиванием красителем Evans blue. Иллюстративные изображения подвергнутой хирургическому вмешательству абдоминальной полости каждой группы отмечены на данной фигуре. 8-Недельных самцов мышей BalbC лечили PBS (носитель), ActRIIB-Fc дикого типа (WT), AG-0014 (SEQ ID NO: 16) и AG-0027 (SEQ ID NO: 29), соответственно, в дозировке 10 мг/кг один раз в неделю. Через две недели после лечения инъецировали 200 мкл красителя Evans blue (0,5% в PBS, pH 7,2) каждой группе животных (n=4) через хвостовую вену. Некропсию проводили через 90 мин после инъекции красителя Evans blue.

На Фиг. 7 показаны изображения мышинных яичек в тесте проницаемости сосудов с окрашиванием красителем Evans blue. Иллюстративные изображения подвергнутого иссечению органа яичек из каждой группы отмечены на данной фигуре. 8-Недельных самцов мышей BalbC лечили PBS (носитель), ActRIIB-Fc дикого типа (WT), AG-0014 (SEQ ID NO: 16) и AG-0027 (SEQ ID NO: 29), соответственно, в дозировке 10 мг/кг один раз в неделю. Через две недели после лечения инъецировали 200 мкл красителя Evans blue (0,5% в PBS, pH 7,2) каждой группе животных (n=4) через хвостовую вену. Некропсию проводили через 90 мин после инъекции красителя Evans blue.

На Фиг. 8 показаны изображения мышинных легких в тесте проницаемости сосудов с окрашиванием красителем Evans blue. Иллюстративные изображения подвергнутых иссечению тканей легких из каждой группы отмечены на данной фигуре. 8-Недельных самцов мышей BalbC лечили PBS (носитель), ActRIIB-Fc дикого типа (WT), AG-0014 (SEQ ID NO: 16) и AG-0027 (SEQ ID NO: 29), соответственно, в дозировке 10 мг/кг один раз в неделю. Через две недели после лечения инъецировали 200 мкл красителя Evans blue (0,5% в PBS, pH 7,2) каждой группе животных (n=4) через хвостовую вену. Некропсию проводили через 90 мин после инъекции красителя Evans blue.

На Фиг. 9 показаны диаграммы, отображающие количества экстравазированного красителя Evans blue на мг влажной легочной ткани (левая панель) и ткани яичек (правая панель) в различных группах, как отмечено на данной фигуре. 8-Недельных самцов мышей BalbC лечили PBS (носитель), ActRIIB-Fc дикого типа (WT), AG-0014 (SEQ ID NO: 16) и AG-0027 (SEQ ID NO: 29), соответственно, в дозировке 10 мг/кг один раз в неделю. Через две недели после лечения инъецировали 200 мкл красителя Evans blue (0,5% в PBS, pH 7,2) каждой группе животных (n=4) через хвостовую вену. Некропсию проводили через 90 мин после инъекции красителя Evans blue для сбора тканей яичек и легких. Ткани взвешивали и затем помещали индивидуально во флаконы, содержащие формамид для экстрагирования красителя Evans blue. После инкубации при 55°C в течение 24 часов образцы центрифугировали и поглощение водной фазы каждого

образца измеряли при длине волны 610 нм с использованием спектрофотометра. Статистический анализ проводили с использованием Excel Student T-TEST. *: $P < 0,05$.

На Фиг. 10 показаны линейные графики с результатами клеточных анализов в отношении BMP9-нейтрализующих активностей для ряда иллюстративных гибридных ActRIIB белков-ловушек лигандов, включая AG-0014 (SEQ ID NO: 16), AG-0023 (SEQ ID NO: 25), AG-0024 (SEQ ID NO: 26), AG-0025 (SEQ ID NO: 27), AG0027 (SEQ ID NO: 29), AG-0028 (SEQ ID NO: 30), AG-0029 (SEQ ID NO: 31) и AG-0035 (SEQ ID NO: 37), в сравнении с таковыми для ActRIIB-Fc белка дикого типа в качестве контроля (WT). BMP9-нейтрализующие активности анализировали с использованием C2C12-BRE-luc репортерного анализа.

На Фиг. 11 проиллюстрированы различия в миостатин-нейтрализующих показателях IC_{50} между некоторыми иллюстративными гибридными ActRIIB белками-ловушками лигандов относительно такового для WT ActRIIB-Fc белка. Миостатин-нейтрализующие активности индивидуальных белков проверяли с использованием C2C12-CAGA-luc репортерных культур и значения IC_{50} рассчитывали с использованием программного обеспечения Prism. График показывает разницу в процентах в миостатин-нейтрализующих значениях IC_{50} каждого из иллюстративных гибридных ActRIIB белков-ловушек лигандов, включая AG-0014 (SEQ ID NO: 16), AG-0023 (SEQ ID NO: 25), AG-0024 (SEQ ID NO: 26), AG0027 (SEQ ID NO: 29), AG-0028 (SEQ ID NO: 30) и AG-0029 (SEQ ID NO: 31), по сравнению с таковым для ActRIIB-Fc дикого типа.

На Фиг. 12 показаны результаты твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в отношении BMP9-связывания двух иллюстративных гибридных ActRIIB белков-ловушек лигандов AG-0014 (SEQ ID NO: 16) и AG0027 (SEQ ID NO: 29), соответственно, в сравнении с ActRIIB-Fc дикого типа, а также ActRIIA-Fc дикого типа, при возрастающих концентрациях. Автоматизированный ELISA осуществляли с использованием оборудования KinEXA (Sapidyne Instruments). 20 мкг/мл BMP9 связывали с гранулами NHS-активированной сефарозы 4 для быстрого потока (GE Healthcare) с использованием экспериментальной методики, рекомендованной Sapidyne Instruments. WT ActRIIB-Fc, WT ActRIIA-Fc и каждый гибридный ActRIIB белок-ловушку лигандов тестировали в отношении BMP9-связывания при концентрациях 100 пМ, 1 нМ и 10 нМ, как показано на данной фигуре. Белки дикого типа и гибридные белки иммобилизовали на BMP9-покрытых гранулах и детектировали с использованием козьего антитела против Fc человека, меченного Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.). Сигналы BMP9-связывания записывали с использованием программного обеспечения KinEXA Pro (Sapidyne Instruments).

Способ(ы) осуществления изобретения

Согласно настоящему изобретению предложены новые выделенные гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов, генетически сконструированные как слитые белки, которые функционируют в качестве мультицитокинового антагониста, разработанные так чтобы селективно блокировать действия множества кахектических (вызывающих атрофию) цитокинов без влияния на передачу сигналов цитокинов, не связанных с мышцами. В различных воплощениях гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов содержат выделенные гибридные растворимые ActRIIB-ECD полипептиды, которые способны связывать миостатин и активин А, но демонстрируют пониженную аффинность связывания с BMP9 (то есть, сохраняют миостатин- и активин А-нейтрализующие активности, но демонстрируют чрезвычайно сниженную BMP9-нейтрализацию) относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа. Настоящее

изобретение основано частично на уникальном обнаружении авторов, что гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов, сконструированные для проявления значительно сниженного связывания с BMP9 (тем самым имеющим пониженную BMP9-нейтрализацию), в то же время проявляя свои сильные нейтрализующие активности против миостатина и активина, будут давать ингибиторы миостатина, которые являются более безопасными и более эффективными молекулами по сравнению с имеющимися в настоящее время доступными ингибиторами миостатина. Конкретно, авторы изобретения предположили, что гибридный растворимый ActRIIB полипептид, сконструированный с селективной заменой аминокислотных остатков в пределах внеклеточного домена ActRIIB (ECD) на соответствующие аминокислотные остатки из ActRIIA ECD, может обеспечить новые гибридные растворимые ActRIIB полипептиды, которые преимущественно нейтрализуют миостатин и активин А (ключевые негативные регуляторы мышечного роста) в сравнении с BMP9. BMP9 играет важную роль в ряде физиологических процессов (см., например, Tillet E, et al., Front Genet. 8; 5: 456, 2015), и было показано, что передача сигнала BMP9 является существенной в сохранении нормальной сосудистой сети/проницаемости кровеносных сосудов (см., например, David L., et al., Circ Res. 25; 102(8): 914-22, 2008). Таким образом, постулируется, что субъекты, которых лечили новыми гибридными ActRIIB белками-ловушками лигандов, описанными здесь, могут избежать побочных эффектов в виде носового кровотечения и кровоточивости десен, наблюдаемых у субъектов, которых лечили существующими молекулами ActRIIB-Fc, которые связывают и нейтрализуют BMP9 в сильной степени. Терапевтические преимущества, обеспечиваемые этими новыми гибридными ActRIIB белками-ловушками лигандов, дают терапевтические средства нового поколения, которые являются безопасными и эффективными для инверсии сильной потери мышечной массы и кахексии, а также для лечения широкого ряда хронических катаболических заболеваний, в которые вовлечены мышечная атрофия, потеря костной массы, воспаление и фиброз.

Определения

Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используют в настоящем документе взаимозаменяемо по отношению к полимеру из аминокислотных остатков. В различных воплощениях изобретения «пептиды», «полипептиды» и «белки» представляют собой цепи из аминокислот, альфа-атомы углерода которых связаны посредством пептидных связей. Концевая аминокислота на одном конце цепи (амино-концевая), таким образом, имеет свободную аминогруппу, тогда как концевая аминокислота на другом конце цепи (карбокси-концевая) имеет свободную карбоксильную группу. При использовании в настоящем документе термин «амино-конец» (сокращенно N-конец) относится к свободной α -аминогруппе на аминокислоте при амино-конец пептида или к α -аминогруппе (иминогруппе при участии в пептидной связи) аминокислоты в любом другом положении внутри пептида. Аналогично, термин «карбокси-конец» относится к свободной карбоксильной группе на карбокси-конец пептида или к карбоксильной группе аминокислоты в любом другом положении внутри пептида. Пептиды также включают по существу любую полиаминокислоту, включая, без ограничений, пептидомиметики, такие как аминокислоты, соединенные эфирной связью в противоположность амидной.

Полипептиды по изобретению включают полипептиды, модифицированные любым путем и по любой причине, например, для: (1) снижения чувствительности к протеолизу, (2) снижения чувствительности к окислению, (3) изменения аффинности связывания для образования белковых комплексов, (4) изменения аффинностей связывания и (5)

придания или модификации других физико-химических или функциональных свойств. Например, одиночные или множественные аминокислотные замены (например, консервативные аминокислотные замены) могут быть осуществлены в любой природной последовательности (например, в участке полипептида снаружи от домена(ов),

5 образуемого(их) межмолекулярные контакты). «Консервативная аминокислотная замена» относится к замене в полипептиде аминокислоты функционально подобной аминокислотой. Каждая из приведенных ниже шести групп содержит аминокислоты, представляющие собой консервативные замены друг для друга:

- 1) Аланин (A), серин (S) и треонин (T)
- 10 2) Аспарагиновая кислота (D) и глутаминовая кислота (E)
- 3) Аспарагин (N) и глутамин (Q)
- 4) Аргинин (R) и лизин (K)
- 5) Изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M) и валин (V)
- 6) Фенилаланин (F), тирозин (Y) и триптофан (W).

15 «Неконсервативная аминокислотная замена» относится к замене члена одного из этих классов членом другого класса. При осуществлении таких замен в соответствии с различными воплощениями изобретения можно учитывать гидропатический индекс аминокислот. Каждой аминокислоте присвоен гидропатический индекс на основании характеристик ее гидрофобности и заряда. Эти индексы составляют: изолейцин (+4,5);

20 валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспартат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9) и аргинин (-4,5).

Значимость гидропатического индекса аминокислоты при придании белку

25 интерактивной биологической функции понятна в данной области техники (см., например, Kyte et al., 1982, J. Mol. Biol. 157: 105-131). Известно, что некоторые аминокислоты можно заменять другими аминокислотами, имеющими сходный гидропатический индекс или балл, и при этом сохранять сходную биологическую

30 активность. При создании изменений, основанных на гидропатическом индексе, в различных воплощениях изобретения включена замена аминокислот, гидропатические индексы которых находятся в пределах ± 2 . В различных воплощениях изобретения включены те аминокислоты, гидропатические индексы которых находятся в пределах ± 1 , и в различных воплощениях изобретения включены те аминокислоты, гидропатические индексы которых находятся в пределах $\pm 0,5$.

35 В данной области техники также понимают, что замену подобных аминокислот можно эффективно осуществлять на основе гидрофильности, в частности, где биологически функциональный белок или пептид, созданный таким образом, предназначен для применения в иммунологических воплощениях, как описано в настоящем документе. В различных воплощениях изобретения наибольшая локальная

40 средняя гидрофильность белка, которая определяется гидрофильностью примыкающих аминокислот, коррелирует с его иммуногенностью и антигенностью, то есть с биологическим свойством белка.

Этим аминокислотным остаткам присвоены следующие значения гидрофильности: аргинин (+3,0); лизин (+3,0); аспартат (+3,0, $\pm 0,1$); глутамат (+3,0, $\pm 0,1$); серин (+0,3);

45 аспарагин (+0,2); глутамин (+0,2); глицин (0); треонин (-0,4); пролин (-0,5, $\pm 0,1$); аланин (-0,5); гистидин (-0,5); цистеин (-1,0); метионин (-1,3); валин (-1,5); лейцин (-1,8); изолейцин (-1,8); тирозин (-2,3); фенилаланин (-2,5) и триптофан (-3,4). При создании изменений, основанных на значениях гидрофильности, в различных воплощениях изобретения

включена замена аминокислот, значения гидрофильности которых находятся в пределах ± 2 , в различных воплощениях изобретения включена замена аминокислот, значения гидрофильности которых находятся в пределах ± 1 , и в различных воплощениях изобретения включена замена аминокислот, значения гидрофильности которых находятся в пределах $\pm 0,5$.

Иллюстративные аминокислотные замены приведены в Таблице 1.

Таблица 1

Аминокислотные замены

	<u>Исходные остатки</u>	<u>Иллюстративные замены</u>	<u>Предпочтительные замены</u>
10	Ala	Val, Leu, Ile	Val
	Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
	Asn	Gln	
15	Asp	Glu	
	Cys	Ser, Ala	Ser
	Gln	Asn	Asn
20	Glu	Asp	Asp
	Gly	Pro, Ala	Ala
	His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
	Ile	Leu, Val, Met, Ala,	Leu
25		Phe, норлейцин	
	Leu	Норлейцин, Ile,	Ile
		Val, Met, Ala, Phe	
30	Lys	Arg, 1,4-диаминомасляная кислота, Gln, Asn	Arg
	Met	Leu, Phe, Ile	Leu
	Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
35	Pro	Ala	Gly
	Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
	Thr	Ser	
40	Trp	Tyr, Phe	Tyr
	Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
	Val	Ile, Met, Leu, Phe,	Leu
		Ala, норлейцин	

45 Специалист в данной области техники способен определить подходящие варианты полипептидов, представленные в настоящем документе, используя хорошо известные методики. В различных воплощениях изобретения специалист в данной области техники может идентифицировать подходящие области молекулы, которые могут быть изменены

без нарушения активности, путем нацеливания на участки, считающиеся незначимыми для активности. В других воплощениях изобретения специалист в данной области техники может идентифицировать остатки и участки молекул, которые являются консервативными между подобными полипептидами. В других воплощениях изобретения даже области, которые могут быть значимыми для биологической активности или для структуры, можно подвергать консервативным аминокислотным заменам, не нарушая биологическую активность или не оказывая нежелательное влияние на структуру полипептида.

Дополнительно специалист в данной области техники может провести обзор структурно-функциональных исследований, идентифицирующих остатки в подобных полипептидах, значимые для активности или структуры. В свете такого сравнения специалист в данной области техники может прогнозировать значимость аминокислотных остатков в полипептиде, соответствующих аминокислотным остаткам, значимым для активности или структуры, в подобных полипептидах. Для таких прогнозируемых значимых аминокислотных остатков специалист в данной области техники может выбрать химически подобные аминокислотные замены.

Специалист в данной области техники может также проанализировать трехмерную структуру и аминокислотную последовательность в отношении такой структуры в подобных полипептидах. В свете такой информации специалист в данной области техники может прогнозировать выравнивание аминокислотных остатков полипептида по отношению к его трехмерной структуре. В различных воплощениях изобретения специалист в данной области техники может сделать выбор в пользу отсутствия радикальных изменений аминокислотных остатков, расположение которых прогнозируется на поверхности пептида, поскольку такие остатки могут быть вовлечены в важные взаимодействия с другими молекулами. Кроме того, специалист в данной области техники может создать тестовые варианты, содержащие одиночную аминокислотную замену в каждом желаемом аминокислотном остатке. Затем эти варианты можно подвергать скринингу, используя методы определения активности, известные специалистам в данной области техники. Такие варианты можно использовать, чтобы собрать информацию о подходящих вариантах. Например, если обнаружено, что изменение определенного аминокислотного остатка приводит к нарушенной, нежелательно сниженной или неподходящей активности, вариантом с таким изменением можно избегать. Иными словами, на основании информации, собранной в таких стандартных экспериментах, специалист в данной области техники может легко определить аминокислоты, дальнейших замен которых следует избегать, как отдельно, так и в комбинации с другими мутациями.

Термин «полипептидный фрагмент» и «усеченный полипептид» при использовании в настоящем документе относится к полипептиду, имеющему амино-концевую и/или карбокси-концевую делецию по сравнению с соответствующим полноразмерным белком. В различных воплощениях изобретения длина фрагментов может составлять, например, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 25, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 150, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250, по меньшей мере 300, по меньшей мере 350, по меньшей мере 400, по меньшей мере 450, по меньшей мере 500, по меньшей мере 600, по меньшей мере 700, по меньшей мере 800, по меньшей мере 900 или по меньшей мере 1000 аминокислот. В различных воплощениях изобретения длина фрагментов может составлять, например, максимум 1000, максимум 900, максимум 800, максимум 700, максимум 600, максимум 500, максимум 450, максимум 400, максимум 350, максимум 300, максимум 250, максимум

200, максимум 150, максимум 100, максимум 50, максимум 25, максимум 10 или максимум 5 аминокислот. Фрагмент может дополнительно содержать на любом или на обоих концах одну или более дополнительных аминокислот, например последовательность аминокислот из любого встречающегося в природе белка (например, домен Fc или лейциновую молнию) или искусственную аминокислотную последовательность (например, искусственную линкерную последовательность).

Термины «вариант полипептида», «гибридный полипептид» и «мутант полипептида» при использовании в настоящем документе относятся к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность, в которой один или более аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности вставлен, делегирован и/или заменен относительно другой аминокислотной последовательности. В некоторых воплощениях число вставленных, делегированных или замененных аминокислотных остатков может составлять, например, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 25, по меньшей мере 50, по меньшей мере 75, по меньшей мере 100, по меньшей мере 125, по меньшей мере 150, по меньшей мере 175, по меньшей мере 200, по меньшей мере 225, по меньшей мере 250, по меньшей мере 275, по меньшей мере 300, по меньшей мере 350, по меньшей мере 400, по меньшей мере 450 или по меньшей мере 500 аминокислот в длину. Гибриды по настоящему изобретению включают слитые белки.

«Производное» полипептида представляет собой полипептид, который был химически модифицирован, например, путем конъюгирования с другой химической группировкой, такой как, например, полиэтиленгликоль, альбумин (например, человеческий сывороточный альбумин), фосфорилирования и гликозилирования.

Термин «% идентичности последовательности» в настоящем документе используют взаимозаменяемо с термином «% идентичности», и он относится к уровню идентичности аминокислотной последовательности между двумя или более пептидными последовательностями или к уровню идентичности нуклеотидной последовательности между двумя или более нуклеотидными последовательностями при выравнивании с использованием программы выравнивания последовательностей. Например, при использовании в настоящем документе 80% идентичности означает то же, что 80% идентичности последовательности, определенной с помощью заданного алгоритма, и означает, что данная последовательность по меньшей мере на 80% идентична другой длине другой последовательности. В различных воплощениях изобретения % идентичности выбран, например, из по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% или более идентичности последовательности по сравнению с данной последовательностью. В некоторых воплощениях % идентичности находится в диапазоне, например, от приблизительно 60% до приблизительно 70%, от приблизительно 70% до приблизительно 80%, от приблизительно 80% до приблизительно 85%, от приблизительно 85% до приблизительно 90%, от приблизительно 90% до приблизительно 95% или от приблизительно 95% до приблизительно 99%.

Термин «% гомологии последовательности» в настоящем документе используют взаимозаменяемо с термином «% гомологии», и он относится к уровню гомологии аминокислотной последовательности между двумя или более пептидными последовательностями или к уровню гомологии нуклеотидной последовательности между двумя или более нуклеотидными последовательностями при выравнивании с использованием программы выравнивания последовательностей. Например, при

использовании в настоящем документе 80% гомологии означает то же, что 80% гомологии последовательности, определенной с помощью заданного алгоритма, и соответственно гомолог данной последовательности имеет более 80% гомологии последовательности по всей длине данной последовательности. В различных воплощениях изобретения % гомологии выбран, например, из по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% или более гомологии последовательности по сравнению с данной последовательностью. В различных воплощениях изобретения % гомологии находится в диапазоне, например, от приблизительно 60% до приблизительно 70%, от приблизительно 70% до приблизительно 80%, от приблизительно 80% до приблизительно 85%, от приблизительно 85% до приблизительно 90%, от приблизительно 90% до приблизительно 95% или от приблизительно 95% до приблизительно 99%

Иллюстративные компьютерные программы, которые можно использовать для определения идентичности между двумя последовательностями, включают, без ограничения, пакет программ BLAST, например BLASTN, BLASTX и TBLASTX, BLASTP и TBLASTN, общедоступные в Интернете и на сайте NCBI (Национального центра биотехнологической информации). См. также статьи Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-10, 1990, (со специальной ссылкой на опубликованную установку параметров по умолчанию, то есть параметров $w=4$, $t=17$) и Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402, 1997. Поиск последовательностей, как правило, осуществляют с использованием программы BLASTP при оценке данной аминокислотной последовательности относительно аминокислотных последовательностей в базе данных белковых последовательностей GenBank и других общедоступных базах данных. Программа BLASTX предпочтительна для поиска нуклеиновокислотных последовательностей, транслированных во всех рамках считывания по сравнению с аминокислотными последовательностями в базе данных белковых последовательностей GenBank и других общедоступных базах данных. Обе программы BLASTP и BLASTX выполняют с использованием параметров по умолчанию: штраф на открытие пробела 11,0 и штраф на удлинение пробела 1,0, и применяют матрицу BLOSUM-62. См. те же источники.

Кроме вычисления процента идентичности последовательностей, алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ подобия между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5787, 1993). Одной из мер подобия, предложенных алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), обеспечивающая показатель вероятности того, что совпадение между двумя нуклеотидными или двумя аминокислотными последовательностями встречается случайно. Например, нуклеиновую кислоту считают подобной сравнительной последовательности, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении исследуемой нуклеиновой кислоты со сравнительной нуклеиновой кислотой составляет, например, менее чем примерно 0,1, менее чем примерно 0,01 или менее чем примерно 0,001.

Термин «гетерологичный», как используют здесь, относится к составу или состоянию, которые не являются нативными или обнаруживаемыми в природе, например, которые могут быть достигнуты путем замены существующего состава или состояния теми, которые имеют происхождение из другого источника. Подобным образом, экспрессия белка в организме, отличном от организма, в котором такой белок экспрессируется в природе, составляет гетерологичную систему экспрессии и гетерологичный белок.

Термин «антитело», как используют здесь, относится к белку, содержащему один

или более полипептидов, по существу или частично кодируемых генами иммуноглобулинов или фрагментами генов иммуноглобулинов, и имеющему специфичность к опухолевому антигену или специфичность к молекуле, сверхэкспрессирующейся в патологическом состоянии. Общеизвестные гены иммуноглобулинов включают гены константных областей каппа, лямбда, альфа, гамма, дельта, эpsilon и мю, а также подтипы этих генов и огромное количество генов переменных областей иммуноглобулинов. Легкие цепи (LC) классифицируют как либо каппа, либо лямбда. Тяжелые цепи (HC) классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эpsilon, которые в свою очередь определяют классы иммуноглобулинов IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно. Типичная структурная единица иммуноглобулина (например антитела) содержит тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, причем каждая пара имеет одну «легкую» (примерно 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (примерно 50-70 кДа). N-конец каждой цепи определяет переменную область примерно от 100 до 110 или более аминокислот, изначально ответственных за антигенное распознавание.

Термин «Fc область», как используют здесь, определяет C-концевую область тяжелой цепи иммуноглобулина, которая может быть генерирована расщеплением интактного антитела папаином. Fc область может представлять собой нативную последовательность Fc области или вариант Fc области. Fc область иммуноглобулина в целом содержит два константных домена, C_{H2} домен и C_{H3} домен, и возможно содержит C_{H4} домен. Fc часть антитела опосредует несколько важных эффекторных функций, например индукцию цитокинов, ADCC, фагоцитоз, комплементзависимую цитотоксичность (CDC) и время полужизни/скорость клиренса антитела и комплексов антиген-антитело (например, неонатальный FcR (FcRn) связывается с Fc областью IgG при кислом pH в эндосоме и защищает IgG от деградации, тем самым внося вклад в длительное время полужизни IgG в сыворотке). Замены аминокислотных остатков в Fc области для изменения эффекторной функции антитела известны в данной области техники (см., например, Winter et al., патент США No. 5648260 и 5624821).

«Полинуклеотид» относится к полимеру, состоящему из нуклеотидных звеньев. Полинуклеотиды включают природные нуклеиновые кислоты, такие как дезоксирибонуклеиновая кислота («ДНК») и рибонуклеиновая кислота («РНК»), а также аналоги нуклеиновых кислот. Аналоги нуклеиновых кислот включают нуклеиновые кислоты, в которые включены неприродные основания, нуклеотиды, задействованные в связях с другими нуклеотидами, отличающихся от природной фосфодиэфирной связи, или в которые включены основания, присоединенные посредством связей, отличающихся от фосфодиэфирных связей. Так, аналоги нуклеотидов включают, в качестве примера и без ограничения, фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, фосфоротриэфиры, фосфорамидаты, боранофосфаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2-О-метилрибонуклеотиды, пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК) и тому подобное. Такие полинуклеотиды можно синтезировать, например, с использованием автоматического синтезатора ДНК. Термин «нуклеиновая кислота», как правило, относится к полинуклеотидам большого размера. Термин «олигонуклеотид», как правило, относится к коротким полинуклеотидам, состоящим обычно не более чем из 50 нуклеотидов. Понятно, что, если нуклеотидная последовательность представлена последовательностью ДНК (то есть А, Т, G, C), она также включает последовательность РНК (то есть А, U, G, C), в которой «U» замещает «Т».

В данном документе для описания полинуклеотидных последовательностей

используют общепринятые условные обозначения: левый конец однонитевой полинуклеотидной последовательности представляет собой 5'-конец; направление двунитевой полинуклеотидной последовательности влево обозначают как 5'-направление. Направление присоединения нуклеотидов к вновь образующимся транскриптам РНК от 5' к 3' обозначают как направление транскрипции. Нить ДНК, имеющую ту же последовательность, что и мРНК, обозначают как «кодирующая нить»; последовательности в нити ДНК, имеющей ту же последовательность, что и мРНК, транскрибируемая с этой ДНК, расположенные в 5' положении по отношению к 5'-концу транскрипта РНК, обозначают как «расположенные против хода транскрипции последовательности»; последовательности в нити ДНК, имеющей ту же последовательность, что и мРНК, транскрибируемая с этой ДНК, расположенные в 3' положении по отношению к 3'-концу кодирующего транскрипта РНК, обозначают как «расположенные по ходу транскрипции последовательности».

«Комплементарный» относится к топологической совместимости или совпадению друг с другом взаимодействующих поверхностей двух полинуклеотидов. Таким образом, две молекулы могут быть описаны как комплементарные и, кроме того, характеристики поверхности контакта комплементарны друг другу. Первый полинуклеотид комплементарен второму полинуклеотиду, если нуклеотидная последовательность первого полинуклеотида по существу идентична нуклеотидной последовательности полинуклеотидного партнера связывания второго полинуклеотида, или если первый полинуклеотид может гибридизоваться со вторым полинуклеотидом в жестких условиях гибридизации.

«Специфично гибридизующийся с», или «специфичная гибридизация», или «селективно гибридизуется с» относится к связыванию, образованию дуплекса или гибридизации молекулы нуклеиновой кислоты преимущественно с определенной нуклеотидной последовательностью в жестких условиях при наличии этой последовательности в комплексной смеси (например, суммарной клеточной) ДНК или РНК. Термин «жесткие условия» относится к условиям, в которых зонд преимущественно гибридизуется с его подпоследовательностью-мишенью, и в меньшей степени или совсем не гибридизуется с другими последовательностями. «Жесткая гибридизация» или «жесткие условия отмывки при гибридизации» в контексте экспериментов по гибридизации нуклеиновых кислот, таких как саузерн- и нозерн-гибридизация, зависят от последовательности и различаются для разных параметров окружающей среды. Подробное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот можно найти в Tijssen, 1993, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, часть I, глава 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, N.Y.; Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 3.sup.rd ed., NY; и Ausubel et al., eds., Current Edition, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY.

Обычно условия гибридизации и отмывки высокой жесткости выбирают как температуру примерно на 5°C ниже температуры плавления (T_m) для конкретной последовательности при заданной ионной силе и рН. T_m представляет собой температуру (при заданной ионной силе и рН), при которой 50% последовательности-мишени гибридизуется с совершенно совпадающим зондом. Очень жесткие условия выбирают как равные T_m для конкретного зонда. Пример жестких условий гибридизации для гибридизации комплементарных нуклеиновых кислот, имеющих более чем приблизительно 100 комплементарных остатков, на фильтре при саузерн- или нозерн-блоттинге представляет собой: 50% формалин с 1 мг гепарина при 42°C, при этом

гибридизацию проводят в течение ночи. Пример условий отмывки высокой жесткости представляет собой 0,15 М NaCl при 72°C в течение приблизительно 15 минут. Пример жестких условий отмывки представляет собой отмывку в 0,2х SSC при 65°C в течение 15 минут. Описание буфера SSC см. в Sambrook et al. Отмывке высокой жесткости может предшествовать отмывка низкой жесткости для удаления фонового сигнала зонда. Иллюстративная отмывка средней жесткости для дуплекса длиной, например, более чем приблизительно 100 нуклеотидов, представляет собой 1х SSC при 45°C в течение 15 минут. Иллюстративная отмывка низкой жесткости для дуплекса длиной, например, более чем приблизительно 100 нуклеотидов, представляет собой 4-6х SSC при 40°C в течение 15 минут. Как правило, отношение сигнала к шуму 2х (или выше) по сравнению с наблюдаемым для постороннего зонда при конкретном анализе гибридизации указывает на выявление специфичной гибридизации.

«Праймер» относится к полинуклеотиду, способному к специфичной гибридизации с заданной полинуклеотидной матрицей и обеспечивающему точку инициации синтеза комплементарного полинуклеотида. Такой синтез происходит при помещении полинуклеотидного праймера в условия, при которых происходит индуцирование синтеза, то есть в присутствии нуклеотидов, комплементарной полинуклеотидной матрицы и агента для полимеризации, такого как ДНК-полимераза. Праймер, как правило, является односторонним, но может быть двусторонним. Как правило, праймеры представляют собой дезоксирибонуклеиновые кислоты, но для многих применений полезен широкий ряд синтетических и природных праймеров. Праймер комплементарен матрице, для гибридизации с которой он предназначен, и служит в качестве сайта инициации синтеза, но необязательно отражает точную последовательность матрицы. В таком случае специфичная гибридизация праймера с матрицей зависит от жесткости условий гибридизации. Праймеры могут быть мечеными, например, хромогенными, радиоактивными или флуоресцентными группировками, и используются в качестве выявляемых группировок.

«Зонд» при использовании по отношению к полинуклеотиду относится к полинуклеотиду, способному к специфичной гибридизации с предназначенной последовательностью другого полинуклеотида. Зонд специфично гибридизуется с комплементарным полинуклеотидом-мишенью, но необязательно отражает точную комплементарную последовательность матрицы. В таком случае специфичная гибридизация зонда с мишенью зависит от жесткости условий гибридизации. Зонды могут быть мечеными, например, хромогенными, радиоактивными или флуоресцентными группировками, и используются в качестве выявляемых группировок. В тех случаях, когда зонд обеспечивает точку инициации синтеза комплементарного полинуклеотида, зонд может также представлять собой праймер.

«Вектор» представляет собой полинуклеотид, который можно использовать для введения другой связанной с ним нуклеиновой кислоты в клетку. Одним из типов векторов является «плазмида», которая относится к линейной или кольцевой двусторонней молекуле ДНК, внутри которой можно лигировать дополнительные сегменты нуклеиновой кислоты. Другим типом вектора является вирусный вектор (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), где дополнительные сегменты ДНК можно вводить в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую их вводят (например, бактериальные векторы, содержащие бактериальную точку начала репликации, и эпизомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэпизомные векторы млекопитающих) после введения в клетку-хозяина интегрируются

в геном клетки-хозяина и, следовательно, реплицируются параллельно с геномом клетки-хозяина. «Экспрессионный вектор» представляет собой тип вектора, который может направлять экспрессию выбранного полинуклеотида.

5 «Регуляторная последовательность» представляет собой нуклеиновую кислоту, которая влияет на экспрессию (например, уровень, время или локализацию экспрессии) нуклеиновой кислоты, с которой она функционально связана. Регуляторная последовательность может, например, оказывать воздействие непосредственно на регулируемую нуклеиновую кислоту или посредством действия одной или более других молекул (например, полипептидов, которые связываются с регуляторной
10 последовательностью и/или с нуклеиновой кислотой). Примеры регуляторных последовательностей включают промоторы, энхансеры и другие контрольные элементы экспрессии (например, сигналы полиаденилирования). Дополнительные примеры регуляторных последовательностей описаны, например, в Goeddel, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif, и в статье Baron et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23: 3605-06. Нуклеотидная последовательность
15 «функционально связана» с регуляторной последовательностью, если эта регуляторная последовательность влияет на экспрессию (например, уровень, время или локализацию экспрессии) нуклеотидной последовательности.

«Клетка-хозяин» представляет собой клетку, которую можно использовать для
20 экспрессии полинуклеотида по изобретению. Клетка-хозяин может представлять собой клетку прокариот, например, E.coli, или может представлять собой клетку эукариот, например, одноклеточных эукариот (например, дрожжей или других грибов), растительную клетку (например, клетку растения табака или томата), животную клетку (например, клетку человека, клетку обезьяны, клетку хомяка, клетку крысы, клетку
25 мыши или клетку насекомого) или гибридому. Как правило, клетка-хозяин представляет собой культивируемую клетку, которую можно трансформировать или трансфицировать кодирующей полипептид нуклеиновой кислотой, которая может впоследствии экспрессироваться в клетке-хозяине. Выражение «рекомбинантная клетка-хозяин» можно использовать для обозначения клетки-хозяина, трансформированной или
30 трансфицированной нуклеиновой кислотой для ее экспрессии. Клетка-хозяин может также представлять собой клетку, содержащую нуклеиновую кислоту, но не экспрессирующую ее на желаемом уровне, если в клетку-хозяина не введена регуляторная последовательность так чтобы она была функционально связанной с нуклеиновой кислотой. Понятно, что термин «клетка-хозяин» относится не только к
35 конкретному субъекту, но к потомству или потенциальному потомству такой клетки. Поскольку в последующих поколениях могут происходить некоторые модификации вследствие, например, мутации или влияния окружающей среды, такое потомство фактически может не быть идентичным родительской клетке, но все же включено в объем термина, используемого в настоящем документе.

40 Термин «выделенная молекула» (где молекула представляет собой, например, полипептид или полинуклеотид) означает молекулу, которая в силу ее происхождения или источника получения: (1) не связана с компонентами, сопутствующими ей в ее нативном состоянии в природе, (2) по существу не содержит других молекул того же вида, (3) экспрессируется клеткой из другого вида или (4) не встречается в природе.
45 Таким образом, молекула, синтезированная химическим путем или экспрессированная в клеточной системе, отличающейся от клетки, из которой она имеет происхождение в природе, «выделена» от ее природных сопутствующих компонентов. Молекулу можно также сделать по существу свободной от природных сопутствующих компонентов

путем выделения с использованием методик очистки, хорошо известных в данной области техники. Молекулярную чистоту или гомогенность можно определять с помощью ряда средств, известных в данной области техники. Например, чистоту образца полипептида можно определять с использованием электрофореза в полиакриламидном геле и окрашивания геля для визуализации полипептида с использованием методик, хорошо известных в данной области техники. Для некоторых целей более высокую степень разделения можно обеспечить путем использования ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) или других средств очистки, хорошо известных в данной области техники.

Белок или полипептид является «по существу чистым», «по существу гомогенным» или «по существу очищенным», когда по меньшей мере примерно 60%-75% образца представляет собой только один вид полипептида. Полипептид или белок может быть мономерным или мультимерным. По существу чистый полипептид или белок, как правило, содержит приблизительно 50%, 60%, 70%, 80% или 90% масс./масс. образца белка, чаще всего приблизительно 95% и, например, имеет более 99% чистоты. Чистоту или гомогенность белка можно показать с помощью ряда средств, хорошо известных в данной области техники, таких как электрофорез в полиакриламидном геле образца белка с последующей визуализацией индивидуальной полосы полипептида после окрашивания геля красителем, хорошо известным в данной области техники. Для некоторых целей более высокую степень разделения можно обеспечить путем использования ВЭЖХ или других средств очистки, хорошо известных в данной области техники.

«Линкер» относится к молекуле, который соединяет две другие молекулы, либо ковалентно, либо посредством ионных, ван-дер-ваальсовых или водородных связей, например к молекуле нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется с одной комплементарной последовательностью на 5' конце и с другой комплементарной последовательностью на 3' конце, соединяя, таким образом, две некомплементарные последовательности. «Расщепляемый линкер» относится к линкеру, который может распадаться или иным путем разрываться с разделением двух компонентов, соединенных расщепляемым линкером. Расщепляемые линкеры обычно расщепляются ферментами, как правило, пептидазами, протеазами, нуклеазами, липазами и тому подобными ферментами. Расщепляемые линкеры могут также расщепляться за счет внешних стимулов, таких как, например, специфичные ферментативные активности, изменения температуры, pH, концентрации соли и так далее.

Термины «метка» или «меченый», как используют здесь, относятся к включению другой молекулы в антитело. В одном воплощении метка представляет собой обнаружимый маркер, например, включение меченой радиоизотопом аминокислоты или присоединение к полипептиду биотинил-группировки, которая может быть выявлена маркерным авидином (например, стрептавидин, содержащий флуоресцентный маркер или ферментативную активность, которые могут быть выявлены оптическими или калориметрическими методами). В другом воплощении метка или маркер могут быть терапевтическими, например, конъюгат с лекарственным средством или токсин. Различные методы введения меток в полипептиды и гликопротеины известны в данной области техники и могут быть использованы. Примеры меток для полипептидов включают, без ограничения, следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, люминофор на основе комплексов лантанидов), ферментативные метки (например, пероксидаза хрена, β -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза),

хемилюминесцентные маркеры, биотинил-группы, predeterminedенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновой молнии, сайты связывания для вторичных антител, металл-связывающие домены, эпитопные метки), магнетики, такие как хелаты гадолиния, токсины, такие как коклюшный токсин, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидия бромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрациндон, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромидин и их аналоги или гомологи. В некоторых воплощениях метки присоединены с помощью спейсерных групп различной длины для снижения потенциальных стерических препятствий.

«Фармацевтическая композиция» относится к композиции, подходящей для фармацевтического применения у животного. Фармацевтическая композиция содержит фармакологически эффективное количество активного агента и фармацевтически приемлемый носитель. «Фармакологически эффективное количество» относится к количеству агента, эффективному для обеспечения предполагаемого фармакологического результата. «Фармацевтически приемлемый носитель» относится к любому из стандартных фармацевтических носителей, наполнителей, буферов и эксципиентов, таких как забуференный фосфатом физиологический раствор, 5% водный раствор декстрозы и эмульсии, такие как эмульсия масло-в-воде или вода-в-масле, и различных типов увлажняющих агентов и/или адъювантов. Подходящие фармацевтические носители и композиции описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 21st Ed. 2005, Mack Publishing Co, Easton. «Фармацевтически приемлемая соль» представляет собой соль, которую можно включать в композицию соединения для фармацевтического применения, включая, например, соли металлов (натрия, калия, магния, кальция и так далее) и соли аммония или органических аминов.

Термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к способу облегчения или подавления биологического расстройства и/или по меньшей мере одного из сопровождающих его симптомов. При использовании в настоящем документе «облегчение» заболевания, расстройства или состояния означает уменьшение тяжести и/или частоты встречаемости симптомов заболевания, расстройства или состояния. Кроме того, в настоящем документе ссылки на «лечение» включают ссылки на терапевтическое, паллиативное и профилактическое лечение.

Следует понимать, что аспекты и воплощения изобретения, описанные здесь, включают «состоящие» и/или «состоящие по существу из» аспектов и воплощений.

Ссылка на «примерно» в контексте значения или параметра, упомянутого здесь, включает (и описывает) отклонения, которые относятся к этому значению или параметру как таковому. Например, описание со ссылкой на «примерно X» включает описание «X».

Как используют в данном описании и в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают формы множественного числа, если в контексте ясно не указано иное. Следует понимать, что аспекты и вариации описанного здесь изобретения включают «состоящие» и/или «состоящие по существу из» аспектов и вариаций.

Полипептиды рецептора активина

Как используют здесь, термин «рецепторы активина типа II В (ActRIIB)» относится к рецепторам человеческого активина, имеющим номер доступа NP_001097.2 (SEQ ID NO: 45 здесь), и его вариантам. Термин «ActRIIB-ECD дикого типа» относится к

внеклеточному домену ActRIIB, аминокислоты с 1 по 134 (с сигнальной последовательностью) или аминокислоты 19-134 SEQ ID NO: 45 (без сигнальной последовательности) (обозначено здесь как SEQ ID NO: 46). Термин «рецепторы активина типа II A (ActRIIA)» относится к рецепторам человеческого активина, имеющим номер доступа UniProtKB/Swiss-Prot P27037.1 (SEQ ID NO: 47 здесь), и его вариантам. Термин «ActRIIA-ECD дикого типа» относится к внеклеточному домену ActRIIA, аминокислоты с 1 по 135 (с сигнальной последовательностью) или аминокислоты 20-135 SEQ ID NO: 46 (без сигнальной последовательности) (обозначено здесь как SEQ ID NO: 48).

Растворимые гибридные ActRIIB полипептиды

Согласно настоящему изобретению предложены новые гибридные растворимые ActRIIB-ECD полипептиды, которые имеют происхождение из ActRIIB-ECD дикого типа и ActRIIA-ECD дикого типа. Гибридные растворимые ActRIIB полипептиды специально сконструированы путем замены одной или более аминокислот усеченного ActRIIB-ECD дикого типа аминокислотами из усеченного ActRIIA-ECD дикого типа в соответствующих положениях на основе выравнивания последовательностей между двумя усеченными ActRII ECD доменами на уровне аминокислот. Указанные одна или более аминокислотных замен специфически выбраны для целей предложения гибридных растворимых ActRIIB-ECD полипептидов, которые демонстрируют значительное снижение BMP9-нейтрализации по сравнению с полипептидом ActRIIB-ECD, в то же время полностью сохраняя эффективную миостатин- и активин А-нейтрализацию.

В различных воплощениях усеченный внеклеточный домен ActRIIB, используемый для получения новых гибридных растворимых ActRIIB-ECD полипептидов, имеет последовательность из 110 аминокислот, изложенную в SEQ ID NO: 1:

**ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGC
WLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYERPP
TAPT (SEQ ID NO: 1)**

В различных воплощениях усеченный внеклеточный домен ActRIIA, используемый для получения новых гибридных растворимых ActRIIB-ECD полипептидов, имеет последовательность из 110 аминокислот, изложенную в SEQ ID NO: 2:

**ETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCW
LDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKP
P (SEQ ID NO: 2)**

В различных воплощениях гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов содержат гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где по меньшей мере один из аминокислотных остатков R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, L48, Y36, S38, R40, S42, T45, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, F84, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108 или T110 замещен аминокислотой по соответствующему положению последовательности ActRIIA-ECD дикого типа (SEQ ID NO: 2), и где гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа.

В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, где аминокислотные остатки E26, E28, Q29, L33, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72 и Q74 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными остатками в соответствующих положениях SEQ ID

соответствующих положениях SEQ ID NO: 2.

В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, где аминокислотные остатки E28, Q29, F58 и E70 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными остатками

5 в соответствующих положениях SEQ ID NO: 2.

В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, где аминокислотные остатки E28, F58 и E70 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными остатками в

соответствующих положениях SEQ ID NO: 2.

В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, где аминокислотные остатки E28 и E70 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными остатками в

10 соответствующих положениях SEQ ID NO: 2.

В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, где аминокислотный остаток E28 SEQ ID NO: 1 был заменен аминокислотными остатками в соответствующих

15 положениях SEQ ID NO: 2.

В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, где аминокислотные

20 остатки E26, E28, Q29, L33, A68, T69, E70, E71, N72 и Q74 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными остатками в соответствующих положениях SEQ ID NO: 2.

В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, где аминокислотные

25 остатки Y7, Y8, L14, E15, S20, L22 и R24 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными

В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, где аминокислотные

30 остатки Y36, S38, R40, S42, T45 и K51 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными

В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, где аминокислотные

остатки Q64 и E65 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными остатками в

35 соответствующих положениях SEQ ID NO: 2.

В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, где аминокислотный

остаток F84 SEQ ID NO: 1 был заменен аминокислотным остатком в соответствующем

40 положении SEQ ID NO: 2.

В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, где аминокислотные

45 остатки R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, L22, R24, E26, E28, Q29, L33 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными остатками в соответствующих положениях SEQ ID NO: 2.

В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, где аминокислотные

остатки R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, L22, R24 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными

остатки E26, E28, Q29, L33, Q64, E65 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными остатками в соответствующих положениях SEQ ID NO: 2.

5 В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, где аминокислотные остатки E26, E28, Q29, L33, K51, Q64, E65 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными остатками в соответствующих положениях SEQ ID NO: 2.

10 В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, где аминокислотные остатки E26, E28, Q29, L33, L48, Q64, E65 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными остатками в соответствующих положениях SEQ ID NO: 2.

В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, где аминокислотные остатки E26, E28, Q29, L33, T45, Q64, E65 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными остатками в соответствующих положениях SEQ ID NO: 2.

15 В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, где аминокислотные остатки E26, E28, Q29, L33, T45, L48, Q64, E65 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными остатками в соответствующих положениях SEQ ID NO: 2.

20 В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78, где аминокислотные остатки E26, E28, Q29, L33, T45, L48, K51, Q64, E65 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными остатками в соответствующих положениях SEQ ID NO: 2.

25 В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, где аминокислотные остатки Q64, E65, F84 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными остатками в соответствующих положениях SEQ ID NO: 2.

30 В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, где аминокислотные остатки R88, T90, H91, L92, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными остатками в соответствующих положениях SEQ ID NO: 2.

35 В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, где аминокислотные остатки R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными остатками в соответствующих положениях SEQ ID NO: 2.

40 В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82, где аминокислотные остатки E26, E28, Q29, L33, F58, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, R88, T90, H91, L92, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными остатками в соответствующих положениях SEQ ID NO: 2.

45 В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, где аминокислотные остатки E26, E28, Q29, L33, Q64, E65, A68, T69, E70, E71, N72, Q74, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными остатками в соответствующих положениях SEQ ID NO: 2.

в соответствующих положениях SEQ ID NO: 2.

В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113, где аминокислотные остатки L48, E70, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными остатками в соответствующих положениях SEQ ID NO: 2.

В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114, где аминокислотные остатки E70, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными остатками в соответствующих положениях SEQ ID NO: 2.

В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115, где аминокислотные остатки E28, L48, T79, E70, R88, T90, H91, L92, E94, A95, G96, G97, P98, E99, V100, Y102, E103, P105, P106, T107, A108, T110 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными остатками в соответствующих положениях SEQ ID NO: 2.

В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116, где аминокислотные остатки R3, I6, Y7, Y8, L14, E15, S20, L22, R24, E26, E28, Q29, L33, Y36, S38, R40, S42, T45, L48, K51, F58, Q64, E65, A68, T69, E71, N72, Q74, F84 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными остатками в соответствующих положениях SEQ ID NO: 2.

В различных воплощениях гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117, где аминокислотные остатки E26, E28, Q29, L33, F56, E68 SEQ ID NO: 1 были заменены аминокислотными остатками в соответствующих положениях SEQ ID NO: 2.

Гетерологичные белки - Fc домены

В другом аспекте гибридные ActRII белки-ловушки лигандов содержат гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид и по меньшей мере один гетерологичный белок, присоединенный к ActRIIB-ECD полипептиду либо непосредственно, либо через линкерную последовательность с образованием слитого белка, обозначенного здесь как гибридный ActRIIB белок-ловушка лигандов. Как используют здесь, термин «слитый белок», относится к белку, имеющему гетерологичный полипептид, присоединенный посредством методик рекомбинантных ДНК. В различных воплощениях гетерологичный белок выбран, без ограничения, из полигистидинового метки, Glu-Glu, глутатион-S-трансферазы (GST), тиоредоксина, белка А, белка G, флуоресцентного белка, мальтоза-связывающего белка (МВР), человеческого сывороточного альбумина или Fc полипептида или Fc домена. В различных воплощениях Fc домен представляет собой Fc домен человеческого IgG. В различных воплощениях Fc домен имеет происхождение из последовательности константного домена тяжелой цепи человеческого IgG1, изложенной в SEQ ID NO: 38. В различных воплощениях Fc домен представляет собой Fc домен, имеющий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 39. В различных воплощениях Fc домен имеет происхождение из последовательности константного домена тяжелой цепи человеческого IgG2, изложенной в SEQ ID NO: 40. В различных воплощениях Fc домен представляет собой Fc домен, имеющий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 41. В различных воплощениях Fc домен имеет происхождение из последовательности константного домена тяжелой цепи человеческого IgG4, изложенной в SEQ ID NO: 42. В различных воплощениях Fc домен представляет собой Fc домен, имеющий аминокислотную

последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 43.

Линкеры

Гибридные ActRIIB белки-ловушки могут возможно дополнительно содержать «линкерную» или «шарнирную линкерную» последовательность. Линкер служит главным образом в качестве спейсера между гибридным растворимым ActRIIB-ECD полипептидом, гетерологичным белком или другим типом слияния или между двумя или более гибридными растворимыми ActRIIB-ECD полипептидами. В различных воплощениях гетерологичный белок присоединен к гибриднему растворимому ActRIIB-ECD полипептиду посредством линкерного или шарнирного линкерного пептида. Линкер и/или шарнирный линкер может представлять собой искусственную последовательность между 5, 10, 15, 20, 30, 40 или более аминокислотами, которые относительно свободны от вторичной структуры. В различных воплощениях линкеры содержат аминокислоты, выбранные из глицина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина и лизина. В различных воплощениях линкер создан из большинства аминокислот, которые не создают стерического затруднения, таких как глицин и аланин, и представляют собой полиглицины (в частности (Gly)₅, (Gly)₈, поли(Gly-Ala) и полиаланины. В различных воплощениях линкер является обогащенным по содержанию G/S (например, по меньшей мере примерно 60%, 70%, 80%, 90% или более аминокислот в линкере представляют собой G или S). В различных воплощениях линкер имеет мотив (GGGGS (SEQ ID NO: 44))_n, где n равно 1-6. Такие линкеры и шарнирные линкеры широко описаны в данной области техники (см., например, патент США 8410043 (Sun et al), включенный в данное описание путем ссылки для целей раскрытия таких линкеров). В различных воплощениях линкер, имеющий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 44, и шарнирный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 118, используют для присоединения человеческого IgG1 Fc (SEQ ID NO: 39) или человеческого IgG4 Fc (SEQ ID NO: 43) к гибриднему растворимому ActRIIB-ECD полипептиду по настоящему изобретению.

Линкеры также могут представлять собой непептидные линкеры. Например, могут быть использованы алкильные линкеры, такие как -NH-(CH₂)_s-C(O)-, где s равно 2-20. Такие алкильные линкеры могут быть дополнительно замещены группой, не оказывающей стерических затруднений, такой как низший алкил (например C₁-C₆), низший ацил, галоген (например Cl, Br), CN, NH₂, фенил и так далее.

Молекулярные конфигурации гибридных ActRIIB белков-ловушек лигандов
Следует понимать, что разные элементы гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов могут быть расположены в любом порядке, который согласуется с желаемой функциональностью. Например, гетерологичный белок может быть расположен на C-конце в гибридном растворимом ActRIIB-ECD полипептиде, или альтернативно, гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид может быть расположен на C-конце гетерологичного домена. Гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептидный домен и гетерологичный домен необязательно должны быть смежными, и могут быть включены дополнительные домены или аминокислотные последовательности на C- или N-конце либо в домен, либо между доменами (то есть, включают описанный здесь линкер). Примерные молекулярные конфигурации новых ActRIIB белков-ловушек лигандов изображены на Фиг. 1.

Примерная конфигурация синтетической ДНК кассеты, кодирующей гибридный ActRIIB белок-ловушку лигандов, может быть в общем описана как содержащая

следующие элементы: 1) сигнальный пептид (или лидерная последовательность), расположенный на N-конце, который может представлять собой либо нативный сигнальный пептид ActRIIB (например, SEQ ID NO: 49), либо заменяющий сигнальный пептид, способный опосредовать процессинг и секрецию секретируемых белков (например, путем использования лидерной последовательности легкой цепи человеческого иммуноглобулина (SEQ ID NO: 50) в качестве заменяющего сигнального пептида может быть достигнута эффективная секреция гибридных ActRIIB белков-ловушек лигандов в клетках CHO); 2) последовательность гибридного растворимого ActRIIB-ECD полипептида (например, любая последовательность из SEQ ID NO: 3-37 или 51-117), слитая с последовательностью сигнального пептида; 3) пептидная линкерная последовательность (например, SEQ ID NO: 44) и шарнирная линкерная последовательность (SEQ ID NO: 118) и 4) Fc домен (например, SEQ ID NO: 39, 41 или 43), слитый с последовательностью гибридного растворимого ActRIIB-ECD полипептида посредством пептидного/шарнирного линкера.

Примеры различных воплощений по настоящему изобретению включают, без ограничения, гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов, описанные в Таблице 2.

Таблица 2

Гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид (SEQ ID NO)	Линкер и шарнирный линкер (SEQ ID NO)	Гетерологичный белок (SEQ ID NO)	Лидерная последовательность (SEQ ID NO)
SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50

	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
5	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
10	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
15	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
20	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
25	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
30	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
35	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
40	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
45	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50

	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
5	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
10	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
15	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
20	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
25	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
30	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
35	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
40	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
45	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50

	SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
5	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 63	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
10	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
15	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
20	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
25	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
30	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
35	SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
40	SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
45	SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50

5

10

15

20

25

30

35

40

45

SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 84	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 85	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 86	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 88	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 90	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 91	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 92	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 96	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50

	SEQ ID NO: 97	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
5	SEQ ID NO: 98	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 99	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
10	SEQ ID NO: 100	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 101	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
15	SEQ ID NO: 102	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 103	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
20	SEQ ID NO: 104	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 105	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
25	SEQ ID NO: 106	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 107	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
30	SEQ ID NO: 108	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 109	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
35	SEQ ID NO: 110	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 111	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
40	SEQ ID NO: 112	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
45	SEQ ID NO: 114	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50

SEQ ID NO: 115	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 116	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50
SEQ ID NO: 117	SEQ ID NO: 44 и 118	SEQ ID NO: 39 или 41 или 43	SEQ ID NO: 49 или 50

Полинуклеотиды

В другом аспекте настоящего изобретения предложены выделенные молекулы нуклеиновых кислот, содержащие полинуклеотид, кодирующий гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид по настоящему изобретению. Рассматриваемые нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными. Такие нуклеиновые кислоты могут представлять собой молекулы ДНК или РНК. ДНК включает, например, кДНК, геномную ДНК, синтетическую ДНК, амплифицированную посредством ПЦР ДНК и их комбинации. Геномную ДНК, кодирующую ActRIIB полипептиды, получают из геномных библиотек, которые доступны для множества видов. Синтетическая ДНК доступна в результате химического синтеза перекрывающихся олигонуклеотидных фрагментов с последующей сборкой этих фрагментов для воссоздания части или всех кодирующих участков и фланкирующих последовательностей. РНК может быть получена из прокариотических экспрессионных векторов, которые направляют синтез мРНК на высоком уровне, таких как векторы, использующие T7 промоторы и РНК-полимеразу. кДНК получают из библиотек, получаемых на основе мРНК, выделенных из различных тканей, которые экспрессируют ActRIIB. Молекулы ДНК по изобретению включают полноразмерные гены, а также полинуклеотиды и их фрагменты. Полноразмерный ген может также включать последовательности, кодирующие N-концевую сигнальную последовательность.

Такие нуклеиновые кислоты могут быть использованы, например, в способах получения новых гибридных растворимых ActRIIB-ECD полипептидов. В различных воплощениях полинуклеотиды кодируют любые из полипептидных последовательностей, изложенных в SEQ ID NO: 3-37 или 51-117, где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа. В различных воплощениях полинуклеотиды кодируют полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична любой из полипептидных последовательностей, изложенных в SEQ ID NO: 3-37 или 51-117, где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа. В различных воплощениях полинуклеотиды кодируют полипептид, имеющий по меньшей мере 90%-ную идентичность любой из полипептидных последовательностей, изложенных в SEQ ID NO: 3-37 или 51-117, где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа. В различных воплощениях полинуклеотиды кодируют полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична любой из полипептидных последовательностей, изложенных в SEQ ID NO: 3-37 или 51-117, где гибридный ActRIIB-ECD полипептид способен к связыванию с миостатином и активином

А, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа. В различных воплощениях последовательности нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут быть выделенными, рекомбинантными и/или слитыми с гетерологичной нуклеотидной последовательностью, или из библиотеки ДНК.

В различных воплощениях настоящего изобретения предложены молекулы нуклеиновой кислоты, которые гибридизуются в строгих или умеренно строгих условиях с кодирующими полипептид участками описанных здесь полинуклеотидов, где кодируемый полипептид содержит аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO: 3-37 или 51-117, и где кодируемый полипептид способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с BMP9 относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа. Специалисту в данной области техники легко понятно, что условия подходящей строгости, которые стимулируют гибридизацию ДНК, могут варьировать. Например, гибридизация может быть осуществлена при 6,0 X хлорида натрия/цитрата натрия (SSC) при примерно 45°C, с последующей отмывкой при 2,0 X SSC при 50°C. Например, концентрация соли на стадии отмывки может быть выбрана от низкой строгости при примерно 2,0 X SSC при 50°C до высокой строгости при примерно 0,2 X SSC при 50°C. В дополнение, температура на стадии отмывки может быть увеличена от условий низкой строгости при комнатной температуре, примерно 22°C, до условий высокой строгости при примерно 65°C. И температура, и соль могут варьироваться, либо температуру или концентрацию соли можно поддерживать постоянной при изменении другой переменной. В одном воплощении изобретения предложены нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются в условиях низкой строгости при 6 X SSC при комнатной температуре с последующей отмывкой при 2 X SSC при комнатной температуре.

В различных воплощениях выделенные молекулы нуклеиновой кислоты содержат описанные здесь полинуклеотиды и дополнительно содержат полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один описанный здесь гетерологичный белок. В различных воплощениях молекулы нуклеиновой кислоты дополнительно содержат полинуклеотиды, кодирующие описанные здесь линкеры или шарнирные линкеры.

В различных воплощениях рекомбинантные нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут быть функционально связаны с одной или более регуляторными нуклеотидными последовательностями в экспрессионной конструкции. Регуляторные последовательности известны в данной области техники и выбираются для направления экспрессии гибридного растворимого ActRIIB-ECD полипептида. Соответственно, термин «регуляторная последовательность» включает промоторы, энхансеры и другие элементы для регуляции экспрессии. Иллюстративные регуляторные последовательности описаны в Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Как правило, указанные одна или более регуляторных нуклеотидных последовательностей могут включать, без ограничения, промоторные последовательности, лидерные и сигнальные последовательности, сайты связывания с рибосомой, последовательности инициации и окончания транскрипции и последовательности энхансера или активатора. Конститутивные и индуцибельные промоторы как известные в данной области техники предусмотрены настоящим изобретением. Промоторы могут представлять собой существующие в природе промоторы или гибридные промоторы, которые объединяют элементы более чем одного промотора. Экспрессионная конструкция может присутствовать в клетке на эписоме, такой как плазида, или экспрессионная конструкция может быть встроена

в хромосому. В различных воплощениях экспрессионный вектор содержит селектируемый маркерный ген для обеспечения отбора трансформированных клеток-хозяев. Селектируемые маркерные гены хорошо известны в данной области техники и переменны в зависимости от используемой клетки-хозяина.

5 В другом аспекте по настоящему изобретению рассматриваемая нуклеиновая кислота предложена в экспрессионном векторе, содержащем нуклеотидную последовательность, кодирующую гибридный растворимый ActRIB-ECD полипептид, и функционально связанную с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью. Термин «экспрессионный вектор» относится к плазмиде, фагу, вирусу или вектору для
10 экспрессирования полипептида с полинуклеотидной последовательности. Векторы, подходящие для экспрессии в клетках-хозяевах, легко доступны, и молекулы нуклеиновых кислот встраивают в векторы с использованием стандартных технологий рекомбинантных ДНК. Такие векторы могут включать широкий ряд экспрессионных контрольных последовательностей, которые регулируют экспрессию последовательности
15 ДНК, когда они функционально связаны с ней и могут быть использованы в этих векторах для экспрессии ДНК последовательностей, кодирующих гибридный растворимый ActRIB-ECD полипептид. Такие полезные экспрессионные контрольные последовательности включают, например, ранние и поздние промоторы SV40, тет-промотор, аденовирусные или цитомегаловирусные непосредственные ранние
20 промоторы, RSV промоторы, lac систему, trp систему, TAC или TRC систему, T7 промотор, экспрессия которого направляется T7 РНК-полимеразой, основным оператор и промоторные участки фага лямбда, контрольные участки для fd оболочечного белка, промотор для 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, промоторы кислой фосфатазы, например, PhoS, промоторы α -mating факторов дрожжей,
25 полиэдриновый промотор бакуловирусной системы и другие последовательности, известные для регуляции экспрессии генов прокариотических или эукариотических клеток или их вирусов и различных их комбинаций. Следует понимать, что конструкция экспрессионного вектора может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, и/или типа белка, который желательно экспрессировать.
30 Кроме того, следует также принимать во внимание число копий вектора, способность контролировать это число копий, и экспрессию любого другого белка, кодируемого вектором, такого как антибиотические маркеры. Примерный экспрессионный вектор, подходящий для экспрессии vActRIB представляет собой pDSRa (описанный в WO 90/14363, включенной в данное описание посредством ссылки) и его производные,
35 содержащие vActRIB полинуклеотиды, а также любые дополнительные подходящие векторы, известные в данной области техники или описанные ниже.

Рекомбинантная нуклеиновая кислота по настоящему изобретению может быть продуцирована путем лигирования клонированного гена или его части в вектор, подходящий для экспрессии в прокариотических клетках, эукариотических клетках
40 (дрожжей, птиц, насекомых или млекопитающих), или и тех, и других. Экспрессионные носители для продуцирования рекомбинантного ActRIB полипептида включают плазмиды и другие векторы. Например, подходящие векторы включают плазмиды следующих типов: плазмиды на основе pBR322, плазмиды на основе pEMBL, плазмиды на основе pEX, плазмиды на основе pVtas и плазмиды на основе pUC, для экспрессии
45 в прокариотических клетках, таких как E.coli.

Некоторые экспрессионные векторы млекопитающих содержат как прокариотические последовательности для облегчения размножения вектора в бактериях, так и одну или более эукариотических транскрипционных единиц, которые экспрессируются в

эукариотических клетках. Векторы на основе pcDNAI/amp, pcDNAI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo и pNyg являются примерами экспрессионных векторов млекопитающих, подходящих для трансфекции эукариотических клеток. Некоторые из этих векторов модифицируют последовательностями из бактериальных плазмид, таких как pBR322, для облегчения репликации и отбора по лекарственной устойчивости как в прокариотических, так и в эукариотических клетках. Альтернативно, производные вирусов, таких как бычий вирус папилломы (BPV-1) или вирус Эпштейна-Барр (pHEBo, pREP-производное и p205), могут быть использованы для временной экспрессии белков в эукариотических клетках. Примеры других вирусных (в том числе ретровирусных) экспрессионных систем могут быть найдены ниже в описании систем доставки для генной терапии. Различные методы, используемые в получении плазмид и в трансформации организмов-хозяев, хорошо известны в данной области техники. В отношении других подходящих экспрессионных систем для прокариотических и эукариотических клеток, а также общих рекомбинантных методик см. Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) Chapters 16-17. В некоторых случаях может быть желательно экспрессировать рекомбинантные полипептиды путем использования бакуловирусной экспрессионной системы. Примеры таких бакуловирусных экспрессионных систем включают векторы на основе pVL (такие как pVL1392, pVL1393 и pVL941), векторы на основе pAcUW (такие как pAcUW1) и векторы на основе pBlueBac (такие как B-gal, содержащий pBlueBac III).

В различных воплощениях вектор конструируют для продуцирования рассматриваемых гибридных растворимых ActRIIB-ECD полипептидов в клетках яичника китайского хомячка (CHO), например, вектор Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), векторы pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) и векторы pCI-neo (Promega, Madison, Wis.). Как будет очевидно, рассматриваемые генетические конструкции могут быть использованы для индукции экспрессии рассматриваемых гибридных растворимых ActRIIB-ECD полипептидов в клетках, размножающихся в культуре, например, для продуцирования белков, включая слитые белки и варианты белков, для очистки.

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, трансфицированной рекомбинантным геном, включающим нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность (например, SEQ ID NO: 3-37 или 51-117) для одного или более рассматриваемых гибридных растворимых ActRIIB-ECD полипептидов. Клетка-хозяин может представлять собой любую прокариотическую или эукариотическую клетку. Например, гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид по настоящему изобретению может экспрессироваться в бактериальных клетках, таких как E.coli, клетках насекомых (например, с использованием бакуловирусной экспрессионной системы), клетках дрожжей или клетках млекопитающих. Другие подходящие клетки-хозяева известны специалистам в данной области техники.

Соответственно, настоящее изобретение дополнительно относится к способам получения рассматриваемых гибридных растворимых ActRIIB-ECD полипептидов. Например, клетка-хозяин, трансфицированная экспрессионным вектором, кодирующим гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид, может быть культивирована в условиях, подходящих для осуществления экспрессии гибридного растворимого ActRIIB-ECD полипептида. Гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид может секретироваться, и его можно выделить из смеси клеток и среды, содержащей гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид. Альтернативно, гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид может оставаться в цитоплазме или в мембранной фракции,

и клетки могут быть собраны и подвергнуты лизису с выделением белка. Культура клеток включает клетки-хозяева, среды и другие побочные продукты. Подходящие среды для клеточной культуры хорошо известны в данной области техники.

Полипептиды и белки по настоящему изобретению могут быть очищены согласно методикам очистки белков, которые хорошо известны специалистам в данной области техники. Эти методики включают, на первом уровне, грубое фракционирование на белковые и небелковые фракции. После отделения пептидов и полипептидов от других белков интересующие пептид или полипептид могут быть дополнительно очищены с использованием хроматографических и электрофоретических методик для достижения частичной или полной очистки (или очистки до однородности). Термин «выделенный полипептид» или «очищенный полипептид», как используют здесь, предназначен для ссылки на состав, отделяемый от других компонентов, где полипептид очищен до любой степени относительно его состояния, получаемого в природе. Таким образом, очищенный полипептид также относится к полипептиду, который свободен от окружения, в котором он может существовать в природе. В общем, «очищенный» относится к полипептидному составу, который был подвергнут фракционированию с удалением различных других компонентов и состав которого по существу сохраняет его экспрессируемую биологическую активность. Когда используют термин «по существу очищенный», это обозначение относится к пептидному или полипептидному составу, в котором полипептид или пептид образуют главный компонент этого состава, например, составляя примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 85% или примерно 90% или более от белков в данном составе.

Различные методики, подходящие для использования в очистке, хорошо известны специалистам в данной области техники. Они включают, например, осаждение сульфатом аммония, полиэтиленгликолем (PEG), антителами (иммунопреципитация) и тому подобное, или посредством денатурации нагреванием с последующим центрифугированием; хроматографию, такую как аффинная хроматография (колонки с белком-А), ионообменная хроматография, гель-хроматография, обращенно-фазовая хроматография, хроматография на гидроксипатите, хроматография гидрофобных взаимодействий; изоэлектрическое фокусирование; гель-электрофорез; и комбинации этих методик. Как хорошо известно в данной области техники, полагают, что порядок проведения различных стадий очистки может быть изменен, или что некоторые стадии могут быть опущены и все еще будут обеспечивать подходящий способ получения по существу очищенного полипептида.

35 Фармацевтические композиции

В другом аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая выделенные гибридные растворимые ActRIIB полипептиды или гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов в смеси с фармацевтически приемлемым носителем. Такие фармацевтически приемлемые носители хорошо известны и понятны специалистам в данной области техники и широко описаны (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990). Фармацевтически приемлемые носители могут быть включены для целей модифицирования, поддержания или сохранения, например, значения pH, осмоляльности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникновения композиции. Такие фармацевтические композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость клиренса *in vivo* полипептида. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают, без ограничения, аминокислоты

(такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин); антимикробные агенты; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия); буферы (такие как борат, бикарбонат, Трис-НСI, цитраты, фосфаты, другие органические кислоты);

5 хелатообразующие агенты (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)); комплексообразующие агенты (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); красители;

10 корригенты и разбавители; эмульгаторы; гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты (такие как хлорид бензалкония, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенетиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или пероксид водорода);

15 растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбит); суспендирующие агенты; поверхностно-активные агенты или увлажняющие агенты (такие как плуроники, PEG, сорбитановые сложные эфиры, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат 80, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапал); усиливающие стабильность агенты (сахароза или

20 сорбит); усиливающие тоничность агенты (такие как галогениды щелочных металлов (предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит); носители для доставки; разбавители; эксципиенты и/или фармацевтические адъюванты.

Основной наполнитель или носитель в фармацевтической композиции может быть водным или неводным по природе. Например, подходящий носитель или наполнитель

25 может представлять собой воду для инъекций, физиологический солевой раствор или искусственную цереброспинальную жидкость, возможно дополненную другими материалами, обычно используемыми в композициях для парентерального введения. Нейтральный забуференный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с сывороточным альбумином, являются дополнительными иллюстративными носителями.

30 Другие иллюстративные фармацевтические композиции содержат Трио-буфер с рН примерно 7,0-8,5 или ацетатный буфер с рН примерно 4,0-5,5, которые могут дополнительно включать сорбит или его подходящую замену. В одном воплощении по настоящему изобретению композиции могут быть получены для хранения путем смешивания выбранной композиции, имеющей желаемую степень чистоты, с

35 возможными агентами препарата (Remington's Pharmaceutical Sciences, выше) в форме лиофилизированного осадка или водного раствора. Кроме того, терапевтическая композиция может быть изготовлена в виде лиофилизата с использованием подходящих эксципиентов, таких как сахароза. Оптимальная фармацевтическая композиция будет определяться специалистом в данной области техники в зависимости от, например,

40 намеченного пути введения, формата доставки и требуемой дозировки.

Когда предусмотрено парентеральное введение, терапевтические фармацевтические композиции могут быть представлены в форме апирогенного парентерально приемлемого водного раствора, содержащего требуемый ActRIPB полипептид в фармацевтически приемлемом носителе. Особенно подходящий носитель для

45 парентеральной инъекции представляет собой стерильную дистиллированную воду, в которой полипептид готовят в виде стерильного изотонического раствора с подходящими консервантами. В различных воплощениях фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного введения, могут быть изготовлены в водных растворах,

предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический буферный раствор. Водные инъекционные суспензии могут содержать вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, сорбит или декстран. Дополнительно, суспензии 5 активных соединений могут быть получены в виде подходящих масляных инъекционных суспензий. Возможно, суспензия может также содержать подходящие стабилизаторы или агенты для повышения растворимости соединений и обеспечения возможности получения высококонцентрированных растворов.

В различных воплощениях терапевтические фармацевтические композиции могут 10 быть изготовлены для направленной доставки с использованием коллоидной дисперсной системы. Коллоидные дисперсные системы включают макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросферы, шарики и системы на основе липидов, включая эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Примеры липидов, полезных в получении липосом, включают фосфатидильные соединения, такие как 15 фосфатидилглицерин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, сфинголипиды, цереброзиды и ганглиозиды. Иллюстративные фосфолипиды включают яичный фосфатидилхолин, дипальмитоилфосфатидилхолин и дистеароилфосфатидилхолин. Нацеливание липосом также возможно на основе, например, органной специфичности, клеточной специфичности и специфичности к 20 органеллам и известно в данной области техники.

В различных воплощениях предусмотрено пероральное введение фармацевтических композиций. Фармацевтические композиции, которые вводят таким образом, могут быть изготовлены с использованием или без использования тех носителей, которые 25 обычно используются в приготовлении твердых лекарственных форм, таких как таблетки и капсулы. В твердых лекарственных формах для перорального введения (капсулы, таблетки, пилюли, драже, порошки, гранулы и тому подобное), одно или более терапевтических соединений по настоящему изобретению могут быть смешаны с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, такими как цитрат 30 натрия или гидрофосфат кальция, и/или любыми из следующих: (1) наполнители или объемообразующие агенты, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; (2) связывающие вещества, 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 или маниоковый крахмал, альгиновая 35 кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия; (5) замедляющие растворение агенты, такие как парафин; (6) ускорители абсорбции, такие как соединения четвертичного аммония; (7) увлажняющие агенты, такие как, например, цетиловый спирт и глицеролмоностеарат; (8) абсорбенты, такие как каолин и бентонитовый клей; (9) смазывающие агенты, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые 40 полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси; и (10) красители. В случае капсул, таблеток и пилюль, фармацевтические композиции могут также содержать буферные агенты. Твердые композиции подобного типа также могут быть использованы в качестве наполнителей в мягких и твердых желатиновых капсулах с использованием таких эксципиентов, как лактоза или молочные сахара, а также высокомолекулярные 45 полиэтиленгликоли и тому подобное. Жидкие лекарственные формы для перорального введения включают фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активному ингредиенту жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно используемые

в данной области техники, такие как вода и другие растворители, солюбилизаторы и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, масло ростков пшеницы, 5 оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры сорбитана с жирными кислотами и их смеси. Помимо инертных разбавителей, пероральные композиции могут также включать адьюванты, такие как увлажнители, эмульгаторы и суспендирующие агенты, подсластители, корригенты, красители, отдушки и консерванты.

10 В различных воплощениях предусмотрено местное введение фармацевтических композиций, либо на кожу, либо на слизистые оболочки. Местные композиции могут дополнительно содержать один или более из широкого ряда агентов, про которые известно, что они являются эффективными в качестве усилителей проникновения в кожу или эпидермис. Примеры таких агентов представляют собой 2-пирролидон, N- 15 метил-2-пирролидон, диметилацетамид, диметилформаид, пропиленгликоль, метиловый или изопропиловый спирт, диметилсульфоксид и азон. Дополнительные агенты могут дополнительно быть включены, для того чтобы сделать препарат косметически приемлемым. Примеры таких агентов представляют собой жиры, воски, масла, красители, отдушки, консерванты, стабилизаторы и поверхностно-активные агенты.

20 Также могут быть включены кератолитические агенты, такие как те, которые известны в данной области техники. Примерами являются салициловая кислота и сера.

Лекарственные формы для местного и трансдермального введения включают порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и ингаляторы. Активное 25 соединение может быть смешано в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми консервантами, буферами или пропеллентами, которые могут потребоваться. Мази, пасты, кремы и гели могут содержать, в дополнение к соединению по изобретению (например, гибриднему ActRIPB белку-ловушке лигандов), эксципиенты, такие как животные и растительные жиры, масла, воски, парафины, крахмал, трагакантовая камедь, производные целлюлозы, полиэтиленгликоли, силиконы, 30 бентониты, кремниевая кислота, тальк и оксид цинка, или их смеси.

Дополнительные фармацевтические композиции, предусмотренные для использования в настоящем изобретении, включают препараты, включающие полипептиды в виде 35 препаратов непрерывной или контролируемой доставки. Методики для изготовления разнообразных других средств непрерывной или контролируемой доставки, таких как липосомные носители, биоразлагаемые микрочастицы или пористые шарики и инъекционные депо-препараты, также известны специалистам в данной области техники.

Эффективное количество фармацевтической композиции для терапевтического использования будет зависеть, например, от терапевтических целей и задач. Специалист 40 в данной области техники понимает, что уровни подходящих дозировок для лечения будут таким образом варьировать в зависимости, отчасти, от доставляемой молекулы, показания, для которого полипептид следует использовать, пути введения и размеров (масса тела, поверхность тела или размер органа) и состояния (возраст и общее состояние здоровья) пациента. Соответственно, врач может титровать дозировку и модифицировать путь введения для получения оптимального терапевтического эффекта.

45 Типичная дозировка может находиться в диапазоне от примерно 0,1 мг/кг вплоть до примерно 100 мг/кг или более, в зависимости от факторов, упомянутых выше. Полипептидные композиции могут быть предпочтительно инъецированы или введены внутривенно. Фармацевтические композиции длительного действия могут быть введены

каждые три-четыре дня, каждую неделю или раз в две недели, в зависимости от периода полувыведения и скорости клиренса конкретного препарата. Частота дозирования будет зависеть от фармакокинетических параметров полипептида в используемом препарате. Как правило, композицию вводят до тех пор, пока не будет достигнута дозировка, обеспечивающая желаемый эффект. Композиция таким образом может быть введена в однократной дозе или в многократных дозах (при одних и тех же или разных концентрациях/дозировках) с течением времени или в виде непрерывной инфузии. Дополнительную коррекцию подходящей дозировки осуществляют обычными методами. Подходящие дозировки могут быть оценены через использование соответствующих данных доза-ответ.

Путь введения фармацевтической композиции соответствует известным методам, например, перорально, посредством инъекции внутривенным, внутривнутрибрюшинным, интрацеребральным (интра-паренхимальным), интрацеребровентрикулярным, внутримышечным, внутриглазным, внутриартериальным, интрапортальным, внутриочаговым путями, интрамедуллярно, интратекально, интравентрикулярно, трансдермально, подкожно или внутривнутрибрюшинно; а также интраназальными, энтеральными, местными, сублингвальными, уретральными, вагинальными или ректальными средствами, с помощью систем пролонгированного высвобождения или устройств имплантации. Когда желательно, композиции могут быть введены болюсной инъекцией или непрерывно путем инфузии или посредством устройства имплантации. Альтернативно или дополнительно, композиция может быть введена местно посредством имплантации мембраны, губки или другого подходящего материала, на котором желаемая молекула была адсорбирована или инкапсулирована. При использовании имплантационного устройства, это устройство может быть имплантировано в любую подходящую ткань или орган, и доставка желаемой молекулы может быть осуществлена посредством диффузии, болюса с высвобождением по времени или непрерывного введения.

Терапевтические применения

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения расстройств, связанных с миостатином или связанных с активинином А, у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества (либо в виде монотерапии, либо в схеме комбинированной терапии) гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов по настоящему изобретению в фармацевтически приемлемом носителе. Важным является то, что фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть использованы для увеличения сухой мышечной массы в процентах от массы тела и уменьшения жировой массы в процентах от массы тела, в то же время избегая проблем безопасности, о которых сообщалось для существующих терапевтических средств на основе слитого белка ActRIIB-Fc.

В настоящем изобретении предложен способ лечения заболевания, связанного с мышечной атрофией, у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества (либо в виде монотерапии, либо в схеме комбинированной терапии) гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов по настоящему изобретению в фармацевтически приемлемом носителе, где такое введение ослабляет потерю мышечной массы и/или потерю мышечной функции. Конкретно, гибридный ActRIIB белок-ловушка лигандов по настоящему изобретению является полезным в лечении различных мышечных заболеваний, включая, без ограничения, мышечные дистрофии (такие как миодистрофия Дюшенна (DMD), мышечная дистрофия Беккера, дистрофия Лейдена-Мебиуса, миотоническая MD и плече-лопаточно-лицевая миопатия

(FSHD)), миозит, миопатии (включая врожденную миопатию и приобретенную миопатию), заболевания двигательных нейронов (такие как болезнь Лу Герига или боковой амиотрофический склероз (ALS)), нейродегенеративные заболевания (такие как болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона и болезнь Альцгеймера), мышечную атрофию, ассоциированную со злокачественными новообразованиями (такими как рак поджелудочной железы, рак легких, рак желудка, рак яичников, колоректальный рак, меланома, лейкоз, рак легкого, рак предстательной железы, рак головного мозга, рак мочевого пузыря и рак головы и шеи), мышечную атрофию, ассоциированную с хронической сердечной недостаточностью, хронической почечной недостаточностью (СКД), диабетом, хронической обструктивной болезнью легких (COPD), инфекциями (такими как СПИД, туберкулез и сепсис), ревматоидным артритом, травмой (такой как ожоги и травма при мотоциклетной аварии), критическим состоянием в отделении интенсивной терапии (ICU), денервацией (такой как удар или повреждение спинного мозга), продолжительным постельным режимом, саркопеническим ожирением и возрастной саркопенией.

В настоящем изобретении предложен способ лечения сердечнососудистого заболевания у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества (либо в виде монотерапии, либо в схеме комбинированной терапии) гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов по настоящему изобретению в фармацевтически приемлемом носителе, где такое введение ослабляет потерю мышечной массы и/или мышечной функции. Конкретно, гибридный ActRIIB белок-ловушка лигандов по настоящему изобретению является полезным в лечении сердечной недостаточности, сердечной атрофии, гипертензии, миокардита, ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда, сердечных аритмий, заболевания сердечного клапана, кардиомиопатии, перикардального заболевания, болезни аорты и синдрома Марфана.

В настоящем изобретении предложен способ лечения сердечной дисфункции или сердечной недостаточности у субъекта, включающий введение эффективного количества гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов субъекту. Такая модуляция может улучшить сердечную функцию указанного субъекта на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%. Улучшение сердечной функции можно оценить посредством эхокардиографии для измерения: 1) функций сердечного насоса, фокусирующихся на объеме выбрасываемой крови и эффективности выбрасывания и 2) функций миокарда, фокусирующихся на силе сокращения миокарда.

В настоящем изобретении предложены способы лечения метаболических расстройств у субъекта, включающие введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества (либо в виде монотерапии, либо в схеме комбинированной терапии) гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов по настоящему изобретению в фармацевтически приемлемом носителе. Конкретно, гибридный ActRIIB белок-ловушка лигандов по настоящему изобретению является полезным в лечении метаболического заболевания, выбранного из ожирения, дислипидемии, диабета, инсулинорезистентности, саркопенического ожирения, стеатоза и метаболического синдрома, а также диабетической миопатии, нефропатии, нейропатии, ретинопатии, потери костной массы, нарушения толерантности глюкозы, гипергликемии и андрогенной депривации.

В настоящем изобретении предложен способ лечения раковых клеток у субъекта,

включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества (либо в виде монотерапии, либо в схеме комбинированной терапии) гибридного ActR11В белка-ловушки лигандов по настоящему изобретению в фармацевтически приемлемом носителе, где такое введение ингибирует рост и/или пролиферацию раковой клетки.

5 Конкретно, гибридный ActR11В белок-ловушка лигандов по настоящему изобретению является полезным в лечении расстройств, характеризующихся как рак. Такие расстройства включают, без ограничения твердыми опухолями, такие как злокачественные новообразования молочной железы, дыхательных путей, головного мозга, репродуктивных органов, желудочно-кишечного тракта, мочеполовой системы, глаз, 10 печени, кожи, головы и шеи, щитовидной железы, паращитовидной железы, а также их отдаленные метастазы, лимфомы, саркомы, множественную миелому и лейкоз. Примеры рака молочной железы включают, без ограничения инфильтративным протоковым раком, инвазивный дольковый рак, неинвазивный протоковый рак и неинвазивный дольковый рак. Примеры видов рака дыхательных путей включают, без ограничения 15 мелкоклеточным и немелкоклеточным раком легких, также бронхиальную аденому и плевропульмональную бластому. Примеры видов рака головного мозга, без ограничения раком стволовой части мозга и гипоталамической глиомой, астроцитому мозжечка и церебральную астроцитому, медуллобластому, эпендимому, а также нейроэктодермальную опухоль и опухоль шишковидной железы. Опухоли мужских репродуктивных органов включают, без ограничения, рак предстательной железы и яичек. Опухоли женских репродуктивных органов включают, без ограничения, рак 20 эндометрия, шейки матки, яичников, влагалища и вульвы, а также саркому матки. Опухоли желудочно-кишечного тракта включают, без ограничения, злокачественные новообразования ануса, толстой кишки, толстой и прямой кишки, пищевода, желчного пузыря, желудка, поджелудочной железы, прямой кишки, тонкого кишечника и слюнной железы. Опухоли мочевыводящей системы включают, без ограничения, злокачественные новообразования мочевого пузыря, пениса, почки, почечной лоханки, уретры и мочеточника. Раковые опухоли глаз включают, без ограничения, внутриглазную меланому и ретинобластому. Примеры злокачественных новообразований печени 25 включают, без ограничения, гепатоцеллюлярную карциному (карциномы клеток печени с фиброламеллярным вариантом и без него), холангиокарциному (карцинома внутрипеченочных желчных протоков) и смешанную гепатоцеллюлярную холангиокарциному. Злокачественные новообразования кожи включают, без ограничения, плоскоклеточный рак, саркому Капоши, злокачественную меланому, рак 30 кожи из клеток Меркеля и немелкоклеточный рак кожи. Злокачественные новообразования головы и шеи включают, без ограничения, назофарингиальный рак и рак губ и полости рта. Лимфомы включают, без ограничения, СПИД-ассоциированную лимфому, неходжкинскую лимфому, кожную Т-клеточную лимфому, болезнь Ходжкина и лимфому центральной нервной системы. Саркомы включают, без ограничения, 35 саркому мягких тканей, остеосаркому, злокачественную фиброзную гистиоцитому, лимфосаркому и рабдомиосаркому. Лейкоз включает, без ограничения, острый миелогенный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз и волосатоклеточный лейкоз. В некоторых воплощениях рак представляет собой рак с высокой экспрессией члена семейства TGF-β, такого как активин А, миостатин, TGF-β и GDF15, например, рак поджелудочной 45 железы, рак желудка, рак яичников, колоректальный рак, меланому, лейкоз, рак легких, рак предстательной железы, рак головного мозга, рак мочевого пузыря и рак головы и шеи.

В настоящем изобретении предложен способ лечения хронической почечной недостаточности (СКД) у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества (либо в виде монотерапии, либо в схеме комбинированной терапии) гибридного ActR11В белка-ловушки лигандов по настоящему изобретению в фармацевтически приемлемом носителе, где такое введение ослабляет потерю мышечной массы и/или мышечной функции или ингибирует фиброз почки. Конкретно, гибридный ActR11В белок-ловушка лигандов по настоящему изобретению является полезным в лечении СКД, включая почечную недостаточность, интерстициальный фиброз и почечный диализ, а также белково-энергетическую недостаточность (PEW), ассоциированную с СКД. Такое модулирование может улучшить СКД или PEW указанного субъекта на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%. Улучшение почечной функции можно оценить путем измерения индекса белок/креатинин (PCR) в моче и скорости клубочковой фильтрации (GFR). Улучшение PEW можно оценить путем измерения сывороточных уровней альбумина и воспалительных цитокинов, скорости синтеза и распада белка, массы тела, мышечной массы, физической активности и результатов питания.

В настоящем изобретении предложены способы лечения аутоиммунного заболевания у субъекта, включающие введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества (либо в виде монотерапии, либо в схеме комбинированной терапии) гибридного ActR11В белка-ловушки лигандов по настоящему изобретению в фармацевтически приемлемом носителе. Конкретно, гибридный ActR11В белок-ловушка лигандов по настоящему изобретению является полезным в лечении аутоиммунного расстройства, выбранного из рассеянного склероза, диабета (типа-1), гломерулонефрита, тяжелой миастении, псориаза, системного склероза и системной красной волчанки, полимиозита и первичного билиарного цирроза.

В настоящем изобретении предложены способы лечения артрита у субъекта, включающие введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества (либо в виде монотерапии, либо в схеме комбинированной терапии) гибридного ActR11В белка-ловушки лигандов по настоящему изобретению в фармацевтически приемлемом носителе. Конкретно, гибридный ActR11В белок-ловушка лигандов по настоящему изобретению является полезным в лечении артрита, выбранного из ревматоидного артрита и остеоартрита.

В настоящем изобретении предложены способы лечения анорексии у субъекта, включающие введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества (либо в виде монотерапии, либо в схеме комбинированной терапии) гибридного ActR11В белка-ловушки лигандов по настоящему изобретению в фармацевтически приемлемом носителе. Конкретно, гибридный ActR11В белок-ловушка лигандов по настоящему изобретению является полезным в лечении анорексии, выбранной из нервной анорексии и синдрома анорексии/кахексии.

В настоящем изобретении предложены способы заболевания печени у субъекта, включающие введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества (либо в виде монотерапии, либо в схеме комбинированной терапии) гибридного ActR11В белка-ловушки лигандов по настоящему изобретению в фармацевтически приемлемом носителе. Конкретно, гибридный ActR11В белок-ловушка лигандов по настоящему

изобретению является полезным в лечении заболевания печени, выбранного из неалкогольной жировой болезни печени, неалкогольного стеатогепатита, алкогольной жировой болезни печени, цирроза печени, печеночной недостаточности, аутоиммунного гепатита и гепатоцеллюлярной карциномы.

5 В настоящем изобретении предложены способы для трансплантации органа и ткани у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества (либо в виде монотерапии, либо в схеме комбинированной терапии) гибридного ActR11B белка-ловушки лигандов по настоящему изобретению в фармацевтически приемлемом носителе. Конкретно, гибридный ActR11B белок-ловушка
10 лигандов по настоящему изобретению является полезным в лечении при трансплантации, выбранной из трансплантации органов сердца, почек, печени, легких, поджелудочной железы, тонкого кишечника и вилочковой железы или из тканевых трансплантаций костей, сухожилий, роговицы, кожи, сердечных клапанов, нервов и кровеносных сосудов.

В настоящем изобретении предложены способы лечения анемии у субъекта,
15 включающие введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества (либо в виде монотерапии, либо в схеме комбинированной терапии) гибридного ActR11B белка-ловушки лигандов по настоящему изобретению в фармацевтически приемлемом носителе. В различных воплощениях анемия выбрана из различных анемических расстройств, включая ассоциированную с раком анемию и вызванную химиотерапией
20 анемию, ассоциированную с хронической почечной недостаточностью анемию, железодефицитную анемию, талассемию, серповидноклеточную анемию, апластическую анемию и миелодиспластические синдромы.

В настоящем изобретении предложены способы лечения фиброза у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного
25 количества фармацевтических композиций по изобретению. В одном воплощении субъект представляет собой субъекта-человека. В различных воплощениях фиброз выбран из легочного фиброза (такого как идиопатический легочный фиброз и муковисцидоз), печеночного фиброза (такого как неалкогольный стеатогепатит и цирроз печени), сердечного фиброза (такого как инфаркт миокарда, диастолическая
30 дисфункция или болезнь сердечного клапана), почечного фиброза (такого как интерстициальный фиброз), миелофиброза, идиопатического ретроперитонеального фиброза, нефрогенной фиброзирующей дермопатии, болезни Крона, келоидных рубцов, склеродермии, системного склероза и артрофиброза.

В настоящем изобретении предложены способы лечения боли у субъекта, включающие
35 введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтических композиций по изобретению. В одном воплощении субъект представляет собой субъекта-человека. В различных воплощениях боль выбрана из нейропатической боли, воспалительной боли и боли при раке.

В настоящем изобретении предложены способы лечения заболевания костной системы
40 у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтических композиций по изобретению. В одном воплощении субъект представляет собой субъекта-человека. В различных воплощениях заболевание костной системы выбрано из остеомалации, остеопороза, несовершенного остеогенеза, прогрессирующей оссифицирующей фибродисплазии, вызванной
45 кортикостероидами потери костной массы, перелома кости и костных метастазов.

В настоящем изобретении предложен способ ингибирования потери мышечной массы и/или мышечной функции у субъекта, включающий введение эффективного количества гибридного ActR11B белка-ловушки лигандов указанному субъекту. Такое

модулирование может ослаблять потерю мышечной массы и/или мышечной функции указанного субъекта на по меньшей мере 5%, 10%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 75% или по меньшей мере 90%. Ингибирование потери мышечной массы и функции можно оценить с использованием техник визуализации и тестов на физическую силу. Примеры техник визуализации для оценки мышечной массы включают двухэнергетическую рентгеновскую абсорбциометрию (DEXA), магнитно-резонансную томографию (MRI) и компьютерную томографию (СТ). Примеры тестирования мышечной функции включают измерение силы захвата, тест ходьбы по лестнице, краткий набор тестов по оценке физической производительности (SPPB) и 6-минутная ходьба, а также максимальное давление вдоха (MIP) и максимальное давление выдоха (MEP), которые используют для измерения мышечной силы дыхательных путей.

«Терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» относится к такому количеству терапевтического агента, подлежащего введению, которое будет облегчать до некоторой степени один или более симптомов расстройства, подлежащего лечению.

Терапевтически эффективную дозу можно оценить исходя из анализов на клеточной культуре путем определения IC_{50} . Дозу затем можно пересчитать для животных моделей для достижения диапазона концентраций циркулирующих в плазме, который включает это значение IC_{50} , как определено в клеточной культуре. Такую информацию можно использовать для более точного определения полезных доз у людей. Уровни в плазме можно измерить, например, посредством ВЭЖХ. Точный состав, путь введения и дозировку может выбрать индивидуально врач с учетом состояния субъекта.

Режимы дозирования можно регулировать для достижения оптимального желаемого ответа (например терапевтического или профилактического ответа). Например, может быть введен один болюс, могут быть введены несколько отдельных доз (множество, или повторных, или поддерживающих) с течением времени, и доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена в соответствии с потребностями терапевтической ситуации. Особенно предпочтительно изготавливать парентеральные композиции в стандартной лекарственной форме для легкости введения и однородности дозирования. Стандартная лекарственная форма, как используют здесь, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве универсальных дозировок для млекопитающих субъектов, подлежащих лечению, причем каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для проявления желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация для стандартных лекарственных форм по настоящему изобретению будет диктоваться главным образом уникальными характеристиками антитела и конкретного терапевтического или профилактического эффекта, который требуется достичь.

Таким образом, лечащий специалист понимает, основываясь на представленном здесь раскрытии, что дозу и режим дозирования корректируют в соответствии со способами, хорошо известными в терапевтических областях. То есть, максимальная переносимая доза может быть легко установлена, и эффективное количество, обеспечивающее обнаружимую терапевтическую пользу субъекту, также можно определить, насколько могут временные потребности для введения каждого агента обеспечить обнаружимую терапевтическую пользу субъекту. Соответственно, хотя здесь проиллюстрированы определенные дозы и режимы введения, эти примеры никоим образом не ограничивают дозу и режим введения, который может быть предложен субъекту при практическом применении настоящего изобретения.

Следует понимать, что значения дозировок могут варьировать в зависимости от типа и тяжести состояния, подлежащего лечению, и могут включать однократные или многократные дозы. Следует дополнительно понимать, что любой конкретный субъект, конкретные режимы дозировок должны подводиться со временем к индивидуальным потребностям и в соответствии с профессиональной подготовкой персонала, вводящего или контролирующего введение композиций, и что интервалы дозировок, изложенные в данном описании, являются лишь иллюстративными и не должны восприниматься как ограничивающие объем или применение на практике заявленной композиции. Кроме того, режим дозировок композиций по данному изобретению может основываться на ряде факторов, включая тип заболевания, возраст, массу тела, пол, медицинское состояние субъекта, тяжесть состояния, путь введения и конкретное используемое антитело. Таким образом, режим дозировок может варьировать широко, но может быть определен рутинным образом стандартными методами. Например, дозы могут быть подведены на основании фармакокинетических или фармакокинетических параметров, которые могут включать клинические эффекты, такие как токсические эффекты и/или лабораторные показатели. Таким образом, настоящее изобретение охватывает эскалацию доз у субъекта, как определяется специалистом врачом. Определение подходящих дозировок и режимов хорошо известно в релевантной области техники и будет понятно, что оно осуществимо специалистом-врачом при ознакомлении с раскрытыми здесь идеями.

Иллюстративный неограничивающий интервал дозирования для терапевтически или профилактически эффективного количества гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов по изобретению может составлять от 0,001 до 100 мг/кг, от 0,001 до 90 мг/кг, от 0,001 до 80 мг/кг, от 0,001 до 70 мг/кг, от 0,001 до 60 мг/кг, от 0,001 до 50 мг/кг, от 0,001 до 40 мг/кг, от 0,001 до 30 мг/кг, от 0,001 до 20 мг/кг, от 0,001 до 10 мг/кг, от 0,001 до 5 мг/кг, от 0,001 до 4 мг/кг, от 0,001 до 3 мг/кг, от 0,001 до 2 мг/кг, от 0,001 до 1 мг/кг, от 0,010 до 50 мг/кг, от 0,010 до 40 мг/кг, от 0,010 до 30 мг/кг, от 0,010 до 20 мг/кг, от 0,010 до 10 мг/кг, от 0,010 до 5 мг/кг, от 0,010 до 4 мг/кг, от 0,010 до 3 мг/кг, от 0,010 до 2 мг/кг, от 0,010 до 1 мг/кг, от 0,1 до 50 мг/кг, от 0,1 до 40 мг/кг, от 0,1 до 30 мг/кг, от 0,1 до 20 мг/кг, от 0,1 до 10 мг/кг, от 0,1 до 5 мг/кг, от 0,1 до 4 мг/кг, от 0,1 до 3 мг/кг, от 0,1 до 2 мг/кг, от 0,1 до 1 мг/кг, от 1 до 50 мг/кг, от 1 до 40 мг/кг, от 1 до 30 мг/кг, от 1 до 20 мг/кг, от 1 до 10 мг/кг, от 1 до 5 мг/кг, от 1 до 4 мг/кг, от 1 до 3 мг/кг, от 1 до 2 мг/кг или от 1 до 1 мг/кг массы тела. Следует отметить, что значения дозировок могут варьировать в зависимости от типа и тяжести состояний, подлежащих лечению. Следует дополнительно понимать, что любой конкретный субъект, конкретные режимы дозировок должны подводиться со временем к индивидуальным потребностям и в соответствии с профессиональной подготовкой персонала, вводящего или контролирующего введение композиций, и что интервалы дозировок, изложенные в данном описании, являются лишь иллюстративными и не должны восприниматься как ограничивающие объем или применение на практике заявленной композиции.

В различных воплощениях суммарная вводимая доза будет достигать концентрации антитела в плазме крови в диапазоне, например, примерно 1-1000 мкг/мл, примерно 1-750 мкг/мл, примерно 1-500 мкг/мл, примерно 1-250 мкг/мл, примерно 10-1000 мкг/мл, примерно 10-750 мкг/мл, примерно 10-500 мкг/мл, примерно 10-250 мкг/мл, примерно 20-1000 мкг/мл, примерно 20-750 мкг/мл, примерно 20-500 мкг/мл, примерно 20-250 мкг/мл, примерно 30-1000 мкг/мл, примерно 30-750 мкг/мл, примерно 30-500 мкг/мл, примерно 30-250 мкг/мл.

Токсичность и терапевтический индекс фармацевтических композиций по изобретению

можно определить стандартными фармацевтическими методиками в клеточных культурах или на экспериментальных животных, например, для определения LD₅₀ (доза, летальная для 50% популяции) и ED₅₀ (доза, терапевтически эффективная у 50% популяции). Соотношение доз между токсической и терапевтически эффективной дозой представляет собой терапевтический индекс, и оно может быть выражено в виде соотношения LD₅₀/ED₅₀. Композиции, которые проявляют большие терапевтические индексы, как правило являются предпочтительными.

Частота дозирования при введении фармацевтической композиции гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов зависит от природы терапии и конкретного заболевания, подлежащего лечению. Субъекта можно лечить с регулярными интервалами, например еженедельно или ежемесячно, до достижения желаемого терапевтического результата. Репрезентативные примеры частоты дозирования включают, без ограничения: раз в неделю без перерыва; один раз в неделю через неделю; один раз в 2 недели; один раз в 3 недели; еженедельно без перерыва в течение 2 недель, затем ежемесячно; еженедельно без перерыва в течение 3 недель, затем ежемесячно; ежемесячно; один раз через месяц; один раз каждые три месяца; один раз каждые четыре месяца; один раз каждые пять месяцев; или один раз каждые шесть месяцев, или раз в год.

Комбинированная терапия

Как используют здесь, термины «совместное введение», «совместно введенные» и «в комбинации с», со ссылкой на гибридный ActRIIB белок-ловушку лигандов по изобретению и один или более других терапевтических агентов, предназначен для обозначения и действительно ссылается и включает следующее: одновременное введение такой комбинации гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов по изобретению и терапевтического(их) агента(ов) субъекту, нуждающемуся в лечении, где такие компоненты изготовлены вместе в виде одной лекарственной формы, которая высвобождает указанные компоненты по существу в одно и то же время в указанном субъекте; по существу одновременное введение такой комбинации гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов по изобретению и терапевтического(их) агента(ов) субъекту, нуждающемуся в лечении, где такие компоненты изготовлены отдельно друг от друга в отдельных лекарственных формах, которые принимаются по существу в одно и то же время указанным субъектом, причем указанные компоненты высвобождаются по существу в одно и то же время в указанном субъекте; последовательное введение такой комбинации гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов по изобретению и терапевтического(их) агента(ов) субъекту, нуждающемуся в лечении, где такие компоненты изготовлены отдельно друг от друга в отдельных лекарственных формах, которые принимаются друг за другом указанным субъектом со значительным интервалом времени между каждым введением, где указанные компоненты высвобождаются по существу в разные моменты времени в указанном субъекте; и последовательное введение такой комбинации гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов по изобретению и терапевтического(их) агента(ов) субъекту, нуждающемуся в лечении, где такие компоненты изготовлены вместе в одной лекарственной форме, которая высвобождает указанные компоненты контролируемым образом, где они одновременно, последовательно и/или перекрывающимся образом высвобождаются в одно и то же время и/или разные моменты времени в указанном субъекте, где каждая часть может быть введена либо одним и тем же путем, либо разными путями.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения заболеваний,

связанных с мышечной атрофией, у субъекта, включающим введение комбинации а) терапевтически эффективного количества гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов по настоящему изобретению; и б) второго агента. Эта комбинированная терапия может быть особенно эффективной против заболевания, связанного с мышечной атрофией, которое резистентно или не поддается лечению с использованием второго агента в 5 отдельности. В различных воплощениях второй агент выбран из гормона роста, грелина, IGF1, антагонистов воспалительных цитокинов, таких как TNF-альфа и TNF-альфа, IL-6, IL-1 и их рецепторы, и других антагонистов миостатина и активина А и их рецепторов.

В различных воплощениях комбинированная терапия включает введение композиции 10 гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов и второго агента одновременно, либо в одной и той же фармацевтической композиции, либо в отдельных фармацевтических композициях. В различных воплощениях композицию гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов и композицию второго агента вводят последовательно, то есть композицию гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов вводят либо до, либо после 15 введения композиции второго агента.

В различных воплощениях введения композиции гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов и композиции второго агента проводят одновременно, то есть периоды введения композиции гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов и композиции второго агента перекрываются друг с другом.

В различных воплощениях введения композиции гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов и композиции второго агента проводят не одновременно. Например, в различных воплощениях введение композиции гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов заканчивают до того как ввести композицию второго агента. В различных воплощениях введение композиции второго агента заканчивают до того как ввести 25 композицию гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов.

Следующие примеры предназначены для более полной иллюстрации изобретения, а не для ограничения его объема.

Пример 1

Полипептиды по настоящему изобретению могут быть получены в соответствии с 30 рекомбинантными ДНК-технологиями, которые хорошо известны специалистам в данной области техники. В этом примере в общем описано получение гибридных растворимых ActRIIB-ECD полипептидов.

Различные гибридные ActRIIB-ECD полипептиды конструировали путем замещения 35 нескольких аминокислотных остатков по выбранным положениям в пределах внеклеточного домена человеческого ActRIIB аминокислотными остатками, имеющими происхождение из внеклеточного домена человеческого ActRIA в соответствующих положениях на основании выравнивания последовательностей на уровне аминокислот. Экспрессионные кассеты ДНК, кодирующие гибридные ActRIIB-ECD полипептиды, генерировали с использованием сайт-направленного мутагенеза и затем конструировали 40 в виде Fc слитых белковых конструкций путем размещения в рамке считывания кДНК-фрагмента, кодирующего на 5'-конце сигнальный пептид легкой цепи человеческого иммуноглобулина и на 3'-конце ДНК-фрагмент, кодирующий пептидный линкер с последующим человеческим Fc.

Пример 2

В этом примере в общем описано получение гибридных ActRIIB белков-ловушек лигандов с конфигурацией, как она показана на Фиг. 1.

Синтетические ДНК кассеты, кодирующие различные гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов, каждый из которых содержит сигнальную пептидную лидерную

последовательность (SEQ ID NO: 49 или 50), гибридный растворимый ActRIIB-ECD полипептид из Примера 1 (или последовательность ActRIIB-ECD дикого типа), пептидную линкерную последовательность (SEQ ID NO: 44), шарнирную линкерную последовательность (SEQ ID NO: 118) и последовательность Fc домена (SEQ ID NO: 39, или 41, или 43), клонировали в векторы экспрессии Freedom рCHO 1.0 и рcDNA3.1 (Life Technologies).

Для стабильной трансфекции векторы экспрессии рCHO 1.0, кодирующие различные гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов, трансфицировали каждый в клетки CHO-S с использованием FreeStyle MAX Reagent (Life Technologies). Через 48 часов после трансфекции клетки выращивали в бессывороточной среде CD FortiCHO, содержащей пуромицин и метотрексат (MTX) для отбора, в течение 3-7 недель при 37°C в CO₂ инкубаторе со встряхиванием. Стабильный пул генерировали до тех пор, пока клетки не превысили 90% жизнеспособность в среде, содержащей 30 М пуромицин и 500 нМ метотрексат. Стабильные клоны генерировали путем клонирования с разбавлением согласно протоколам, рекомендованным изготовителем (Life Technologies). Для временной трансфекции экспрессионные плазмиды рcDNA3.1, кодирующие различные гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов, трансфицировали каждый в клетки Expi293 с использованием реагента трансфекции ExpiFectamine293 (Life Technologies).

После трансфекции стабильно трансфицированные клетки CHO-S выращивали в полной бессывороточной среде CD FortiCHO, дополненной глюкозой, при 37°C в CO₂ инкубаторе со встряхиванием в течение вплоть до 14 суток. Кондиционированную среду собирали для очистки белка. Временно трансфицированные клетки Expi293 культивировали в экспрессионной среде Expi293 при 37°C в CO₂ инкубаторе со встряхиванием в течение вплоть до 7 суток и среду собирали для очистки белка.

Для очистки кондиционную среду, содержащую гибридный ActRIIB белок-ловушку лигандов, очищали посредством высокоэффективной колонки Hitrap с белком А с использованием АКТА FPLC (GE Healthcare). Гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов элюировали уксуснокислым буфером (рН 3,6), нейтрализовали с использованием 1 М Tris-HCl (рН 8,0) и затем подвергали замене буфера. Концентрации белка определяли с использованием спектрофотометра (Beckman).

Пример 3

В этом примере оценивали миостатин- и BMP9-связывающие активности семи гибридных ActRIIB белков-ловушек лигандов.

Миостатин- и BMP9-связывающие активности различных гибридных ActRIIB белков-ловушек лигандов сначала анализировали с использованием Octect Red (ForteBio). Очищенные белки или кондиционированные среды отдельно загружали в биосенсоры АНС с максимальной нагрузкой. После исходной фазы промывки сенсоры подвергали воздействию 10 нМ миостатина или BMP9, соответственно, для стадии ассоциации с последующей стадией диссоциации. Все эксперименты осуществляли при встряхивании при 1000 об/мин. Связывающую активность анализировали с использованием программного обеспечения ForteBio, при этом значения KD рассчитывали с использованием соотношения Kd/Ka.

Результаты

Гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов исследовали в сравнении с слитым белком ActRIIB-ECD-Fc дикого типа в отношении связывающих активностей против миостатина и BMP9. Результаты показывают, что гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов проявляют заметное снижение в связывающей аффинности с BMP9 по

сравнению с слитым белком ActRIIB-ECD-Fc дикого типа. Ряд гибридных ActRIIB белков-ловушек лигандов показали чрезвычайно сниженные аффинности связывания с BMP9, которые более чем в 100 раз слабее таковой для белка ActRIIB-ECD-Fc дикого типа, и в то же время они сохраняли сильную аффинность связывания с миостатином, которая была аналогична таковой для белка ActRIIB-ECD-Fc дикого типа. Резюме предварительных данных по связыванию, полученных анализом Octet Red, приведено в Таблице 3.

Таблица 3

ActRIIB-ECD-полипептид	Связывание с миостатином	Связывание с BMP9
Дикого типа	+++	+++
AG-0003 (SEQ ID NO: 5)	+++	++
AG-0005 (SEQ ID NO: 7)	+++	+
AG-0006 (SEQ ID NO: 8)	+++	+
AG-0007 (SEQ ID NO: 9)	+++	+
AG-0008 (SEQ ID NO: 10)	+++	++
AG-0011 (SEQ ID NO: 13)	+++	N.D.
AG-0027 (SEQ ID NO: 29)	+++	N.D.

+++ KD $<10^{-8}$ M

++ KD: 10^{-6} - 10^{-7} M

+ KD 10^{-4} - 10^{-6} M

N.D. нет обнаружимого связывания

AG-0014 и AG-0027 анализировали в анализе кинетического исключения (KinExA) (Sapidyne Instruments, Inc.). 20-30 мкг/мл миостатина, активина А или BMP-9 отдельно связывали с гранулами NHS-активированной сефарозы 4 для быстрого потока (GE Healthcare) с использованием экспериментальных методик, рекомендованных Sapidyne Instruments. Концентрацию для каждого гибридного ActRIIB белка-ловушки лигандов поддерживали постоянной по мере титрования лиганда в 2,5-кратном серийном разведении. Растворы оставляли достигать равновесия путем инкубации при комнатной температуре вплоть до 24 часов и затем пропускали через проточную ячейку, предварительно упакованную покрытыми лигандом гранулами сефарозы, на приборе KinExA 3000 (Sapidyne Instruments). Свободные гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов, захваченные на гранулах, детектировали с помощью козьего антитела против человеческого Fc, меченного Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.). Значения аффинности связывания лиганда (K_D) рассчитывали с использованием программного обеспечения KinExA Pro (Sapidyne Instruments).

Результаты

Резюме предварительных данных по связыванию, полученных анализом KinExA, приведено в Таблице 4. Эти данные показывают, что аналогично ActRIIB-Fc дикого типа, два репрезентативных гибридных ActRIIB белка-ловушки лигандов имели высокую

аффинность в отношении как миостатина, так и активина А в одноразрядном пМ диапазоне. Однако, эти два гибридных ActRIIB белка-ловушки лигандов не показали никакого обнаружимого связывания с BMP9, в противоположность ActRIIB-Fc дикого типа, который проявил сильную аффинность связывания с BMP9 в одноразрядном пМ диапазоне.

Таблица 4

Молекула	Миостатин	Активин А	BMP9
	K _D (пМ)	K _D (пМ)	K _D (пМ)
WT ActRIIB-Fc	5,06 пМ	1,38 пМ	4,25 пМ
AG-0014 (SEQ ID NO: 16)	8,75 пМ	0,357 пМ	Нет связывания
AG-0027 (SEQ ID NO: 29)	7,87 пМ	1,09 пМ	Нет связывания

Пример 4

В этом примере описан анализ передачи сигнала миостатина/активина А и анализ передачи сигнала BMP9, которые использовали для количественного определения миостатин/активин А-блокирующих активностей и BMP9-блокирующей активности, соответственно, гибридных ActRIIB белков-ловушек лигандов.

Для оценки передачи сигнала миостатина/активина А, репортерный конструкт с 12 повторами последовательности CAGA (Dennler et al, EMBO 17: 3091-3100, 1998) клонировали в репортерный вектор pGL3-luc (Promega). Сконструированный вектор pGL3-CAGA₁₂-luc стабильно трансфицировали в клетки C2C12 для генерации клеточной линии с люциферазным репортером, C2C12-CAGA-luc, способной воспринимать передачу сигнала Smad3/4, опосредованную миостатином или активином А. Для измерения миостатин- и активин А-нейтрализующих активностей 4 нМ рекомбинантного миостатина или активина А предварительно инкубировали с различными гибридными ActRIIB белками-ловушками лигандов в повышающихся концентрациях, а также слитым белком ActRIIB-ECD-Fc дикого типа (в качестве контроля) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем реакционные смеси добавляли в клеточные культуры C2C12-CAGA-luc. Через 5 часов в CO₂ инкубаторе при 37°C измеряли люциферазные активности репортерных культур C2C12-CAGA-luc с использованием LumiNOkan Ascent (Thermo Scientific).

Передачу сигнала BMP9 тестировали в клетках C2C12, которые были стабильно трансфицированы люциферазным репортером, содержащим BMP чувствительный элемент (BRE), который воспринимает передачу сигнала Smad1/5/8 (Korchynski et al, J. Biol. Chem. 277: 4883-4891, 2002). Конкретно, двухповторный BMP-чувствительный элемент (Briter et al, PLoS One, 2012) синтезировали и клонировали в вектор pGL3-luc (Promega). Вектор pGL3-2XBRE-luc затем стабильно трансфицировали в клетки C2C12. Стабильно трансфицированную репортерную клеточную линию C2C12-BRE-luc использовали для количественного определения BMP9-опосредованной передачи сигнала Smad1/5/8. Для измерения BMP-нейтрализующей активности 4 нМ BMP9 предварительно инкубировали с различными гибридными ActRIIB белками-ловушками лигандов в повышающихся концентрациях, а также слитым белком ActRIIB-ECD-Fc дикого типа (в качестве контроля) в течение 1 часа при комнатной температуре. Реакционные смеси затем добавляли к клеточным культурам C2C12-BRE-luc. Через 5

часов инкубации при 37°C в CO₂ инкубаторе измеряли люциферазные активности репортерных культур C2C12 BRE-luc с использованием LumiNOkan Ascent (Thermo Scientific).

Результаты

5 Результаты показали, что в сравнении с слитым белком ActRIIB-ECD-Fc дикого типа два репрезентативных гибридных ActRIIB белка-ловушки лигандов сохраняли сильные миостатин- и активин А-нейтрализующие активности, но имели значимые снижения в BMP9-нейтрализующей активности (см. Фиг. 2). На Фиг. 2 показаны клеточные
10 нейтрализующие активности против миостатина, активина А и BMP9 для двух репрезентативных гибридных ActRIIB белков-ловушек лигандов, AG-0003 (SEQ ID NO: 5) и AG-0005 (SEQ ID NO: 7), в сравнении с таковыми для контрольного слитого белка ActRIIB-ECD-Fc дикого типа.

Пример 5

15 В этом Примере использовали анализ передачи сигнала миостатина/активина А и анализ передачи сигнала BMP9, описанный в Примере 4, для количественного определения миостатин/активин А-блокирующих активностей и BMP9-блокирующей активности, соответственно, следующих гибридных ActRIIB белков-ловушек лигандов: AG-0003 (SEQ ID NO: 5), AG-0014 (SEQ ID NO: 16), AG-0023 (SEQ ID NO: 25), AG-0024 (SEQ ID NO: 26), AG-0025 (SEQ ID NO: 27), AG-0027 (SEQ ID NO: 29), AG-0028 (SEQ ID
20 NO: 30), AG-0029 (SEQ ID NO: 31) и AG-0035 (SEQ ID NO: 37).

Результаты

Результаты показали, что в сравнении с слитым белком ActRIIB-ECD-Fc дикого типа несколько из этих гибридных ActRIIB белков-ловушек лигандов сохраняли сильные миостатин- и активин А-нейтрализующие активности, но имели значимые снижения в
25 BMP9-нейтрализующей активности. На Фиг. 3 показаны клеточные нейтрализующие активности против миостатина, активина А и BMP9 для двух репрезентативных гибридных ActRIIB белков-ловушек лигандов, AG-0014 и AG-0027, в сравнении с таковыми для контрольного слитого белка ActRIIB-ECD-Fc дикого типа.

И как показано в Таблицах 5 и 6, в сравнении с слитым белком ActRIIB-ECD-Fc дикого типа (WT ActRIIB-Fc), различные репрезентативные гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов показали чрезвычайно сниженную BMP9-нейтрализующую
30 активность в клеточном репортерном анализе Smad1/5/8 BRE-luc, в то же время сохраняя сильные нейтрализующие активности против миостатина, активина А и активина В в клеточном репортерном анализе Smad2/3 CAGA-luc. В Таблице 5 показаны значения IC₅₀ для клеточной нейтрализации против миостатина, активина А, активина В и BMP9
35 двух репрезентативных гибридных ActRIIB белков-ловушек лигандов AG-0014 (SEQ ID NO: 16) и AG-0027 (SEQ ID NO: 29), соответственно, в сравнении с таковыми для WT ActRIIB-Fc. В Таблице 6 показаны BMP9- и миостатин-нейтрализующие активности нескольких репрезентативных гибридных ActRIIB белков-ловушек лигандов в сравнении
40 с таковыми для WT ActRIIB-Fc. В сравнении с WT ActRIIB-Fc, гибридные белки AG-0003 (SEQ ID NO: 5), AG-0004 (SEQ ID NO: 6), AG-0005 (SEQ ID NO: 7), AG-0014 (SEQ ID NO: 16), AG-0023 (SEQ ID NO: 25), AG-0024 (SEQ ID NO: 26), AG-0025 (SEQ ID NO: 27), AG-0027 (SEQ ID NO: 29) и AG-0028 (SEQ ID NO: 30) показали чрезвычайно сниженную или практически нулевую BMP9-нейтрализующую активность (также см.
45 Фиг. 10); AG-0003 (SEQ ID NO: 5), AG-0005 (SEQ ID NO: 7), AG-0014 (SEQ ID NO: 16) и AG-0027 (SEQ ID NO: 29) сохраняли полную миостатин-нейтрализующую активность, в то время как AG-0004 (SEQ ID NO: 6), AG-0023 (SEQ ID NO: 25), AG-0024 (SEQ ID NO: 26), AG-0025 (SEQ ID NO: 27) и AG-0028 (SEQ ID NO: 30) продемонстрировали потерю

миостатин-нейтрализующей активности (также см. Фиг. 11). В общем, эти результаты демонстрируют способность различных гибридных ActRIIB белков-ловушек лигандов к преимущественной блокаде миостатин/активин-опосредованной Smad2/3 передачи сигнала при минимальном влиянии или отсутствии влияния на BMP9-опосредованную Smad1/5/8 передачу сигнала.

Таблица 5

	<u>IC₅₀ (нМ) в клеточном анализе</u>			
	против миостатина	против активина А	против активина В	против BMP9
WT ActRIIB-Fc (SEQ ID NO: 1)	1,24	1,27	1,04	3,40
AG-0014 (SEQ ID NO: 16)	0,95	1,15	2,10	N.D.
AG-0027 (SEQ ID NO: 29)	1,14	1,62	1,30	N.D.

N.D.: нет обнаружимой нейтрализующей активности

Таблица 6

	Мутация внеклеточного домена ActRIIB	BMP9-нейтрализующая активность	Миостатин-нейтрализующая активность
WT ActRIIB-Fc (SEQ ID NO: 1)	Дикого типа	++++	++++
AG-0003 (SEQ ID NO: 5)	F58I+Q64T+E65D +A68E+T69K+E70K +E71D+N72S+Q74E	+/-	++++
AG-0004 (SEQ ID NO: 6)	F58I+Q64T+E65D +A68E+T69K+E70K	+/-	++

		+E71D+N72S		
5	AG-0005 (SEQ ID NO: 7)	Q64T+E65D +A68E+T69K+E70K +E71D+N72S	-	++++
	AG-0007 (SEQ ID NO: 9)	A68E+T69K+E70K +E71D+N72S+Q74E	+++	++
10	AG-0008 (SEQ ID NO: 10)	A68E+T69K+E70K +E71D+N72S	+++	+++
	AG-0014 (SEQ ID NO: 16)	E26Y+E28D+Q29K +L33R	-/+	++++
15	AG-0027 (SEQ ID NO: 29)	E28D+F58I+E70K	-	++++
	AG-0029 (SEQ ID NO: 31)	E28D	+++	++
20	AG-0024 (SEQ ID NO: 26)	F58I	+++	++++
	AG-0023 (SEQ ID NO: 25)	E70K	-	+
25	AG-0028 (SEQ ID NO: 30)	E28D+E70K	-	+
	AG-0025 (SEQ ID NO: 27)	F58I+E70K	-	+++
30	AG-0035 (SEQ ID NO: 37)	E28D+F58I	+++	+++

35 +++++: полная нейтрализующая активность; +++: частичная нейтрализующая активность; ++: слабая нейтрализующая активность; +: очень слабая нейтрализующая активность; +/-: маленькая активность или нет активности; -: нет нейтрализующей активности.

Пример 6

40 В данном Примере изучали эффекты в отношении массы тела и мышечной массы у 9-недельных самцов мышей линии C57Bl/6, которым подкожно инъецировали PBS (носитель), ActRIIB-Fc (WT) дикого типа, AG-0014 (SEQ ID NO: 16) и AG-0027 (SEQ ID NO: 29), соответственно, в дозировке 10 мг/кг один раз в неделю. Массу тела записывали на сутки 0, сутки 5, сутки 12 и сутки 18, n=6/8 на группу. Показатели изменения массы тела рассчитывали в виде процента повышения массы от исходного уровня на сутки 0.

45 Индивидуальные икроножные мышцы от каждого животного иссекали и взвешивали во время окончательной некропии. Показатели выражали в виде процента повышения средней массы икроножной мышцы в каждой группе лечения по сравнению с таковой для группы носителя. Как показано на Фиг. 4 и в Таблице 7, введение каждого из двух

репрезентативных гибридных белков-ловушек лигандов способно заметно увеличивать прирост массы тела у мышей подобным образом, как и белок ActRIIB-Fc дикого типа.

Таблица 7

Повышение массы тела от исходной

Группы	Сутки 5	Сутки 12	Сутки 18
Носитель	1,5 %	3,9 %	5,6 %
WT ActRIIB-Fc	9,4 %	20,1 %	25,8 %
AG-0014	9,0 %	16,8 %	25,2 %
AG-0027	7,1 %	18,1 %	24,3 %

Как показано на Фиг. 5 и в Таблице 8, введение двух репрезентативных гибридных белков-ловушек лигандов AG-0014 (SEQ ID NO: 16) и AG-0027 (SEQ ID NO: 29), соответственно, способно заметно увеличивать мышечную массу у мышей подобным образом, как и белок ActRIIB-Fc дикого типа.

Таблица 8

Мышечная масса увеличивается по сравнению с носителем

Группы	Повышение массы икроножной мышцы по сравнению с носителем
WT ActRIIB-Fc	31,3 %
AG-0014	30,0 %
AG-0027	30,7 %

Пример 7

В данном Примере изучали эффекты воздействия на мышечную брюшную полость, мышечные яички и мышечные легочные ткани у 8-недельных самцов мышей линии BalbC, которым вводили PBS (носитель), ActRIIB-Fc (WT) дикого типа, AG-0014 (SEQ ID NO: 16) и AG-0027 (SEQ ID NO: 29), соответственно, в дозировке 10 мг/кг один раз в неделю. Через две недели после обработки каждой группе животных (n=4) инъецировали через хвостовую вену 200 мкл красителя Evans blue (0,5% в PBS, pH 7,2). Некропсию осуществляли в момент времени 90 мин после инъекции красителя Evans blue. Репрезентативные изображения подвергнутой хирургической резекции абдоминальной полости, иссеченного органа яичек и иссеченной легочной ткани каждой группы отмечены на Фиг. 6-8, соответственно. Синее окрашивание указывает на просачивание из кровеносного сосуда. Ткани яичек и легких взвешивали и затем помещали по отдельности во флаконы, содержащие формамид, для экстрагирования красителя Evans blue. После инкубации при 55°C в течение 24 часов образцы центрифугировали. Поглощение водной фазы каждого образца измеряли при длине волны 610 нм с использованием спектрофотометра. Количества проникшего из сосудов в ткани красителя Evans blue на мг влажной легочной ткани (левая панель) и ткани яичек (правая панель) в разных группах лечения показаны на Фиг. 9.

Важным является то, что, как показано на Фиг. 6-9, введение двух репрезентативных гибридных белков-ловушек лигандов существенно снижает уровень просачивания из кровеносного сосуда по сравнению с белком ActRIIB-Fc дикого типа во всех тканях, оцененных у леченых животных.

Пример 8

Автоматизированный анализ ELISA осуществляли для дополнительной характеристики BMP9-связывания гибридных ActRIIB белков-ловушек лигандов в различных концентрациях в сравнении как с ActRIIB ECD-Fc дикого типа (WT ActRIIB-Fc), так и ActRIIA ECD-Fc дикого типа (WT ActRIIA-Fc). Как показано на Фиг. 12, данные выявили, что два репрезентативных гибридных белка AG-0014 (SEQ ID NO: 16) и AG-0027 (SEQ ID NO: 29), соответственно, продемонстрировали значительно сниженное BMP9-связывание по сравнению с WT ActRIIB-Fc или WT ActRIIA-Fc. Эти данные указывают на то, что гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов имеют значительную селективность BMP9-связывания, которая отличается от WT ActRIIB-Fc и WT ActRIIA-Fc.

Эти данные демонстрируют, что гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов, описанные здесь, эффективно связывают и нейтрализуют цитокины, индуцирующие мышечную атрофию. И важным является то, что гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов имеют чрезвычайно повышенную селективность для мышц, то есть, при одновременном эффективном блокировании действий цитокинов, индуцирующих мышечную атрофию, они оставляют интактной передачу сигналов цитокинов, не связанных с мышцами, тем самым сохраняя нормальное физиологическое функционирование немышечных клеток. Как изложено выше, BMP играет важную роль в ряде физиологических процессов, и было показано, что передача сигналов BMP9 важна в сохранении нормальной кровеносной сосудистой сети/проницаемости. Сохраняя передачу сигналов BMP9 и преимущественно антагонизируя передачу сигналов миостатина и активина, гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов по настоящему изобретению обеспечивают более эффективное и более безопасное лечение по сравнению с существующими растворимыми ActRIIB белками, которые в сильной степени нейтрализуют BMP-9, то есть, путем селективного нацеливания на цитокины, индуцирующие мышечную атрофию и параллельно избегая вмешательства в передачу сигналов цитокинов, не связанных с мышцами, эти гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов представляют класс клинических кандидатов с превосходной эффективностью мышечного роста и улучшенным профилем безопасности, и тем самым обеспечивая потенциал стать лучшим в классе лечением для борьбы с мышечной атрофией, кахексией и хрупкостью. Как таковые, эти новые гибридные ActRIIB белки-ловушки лигандов, как полагают, имеют широкий ряд клинических показаний, включая возрастную саркопению, кахексию при раке, мышечную атрофию, ассоциированную с хроническими заболеваниями (CHF, CKD, COPD, диабет и другие), мышечную атрофию вследствие бездействия или денервации, вызванную приемом лекарств миопатию, различные формы миозита, нейромышечные заболевания и нейродегенеративные заболевания.

Все продукты и способы, раскрытые и заявленные здесь, могут быть созданы и выполнены без излишнего экспериментирования в свете настоящего раскрытия. Хотя продукты и способы по данному изобретению были описаны в контексте предпочтительных воплощений, специалистам в данной области техники очевидно, что вариации могут быть применимы к продуктам и способам, не отходя от идеи и объема раскрытия. Все такие вариации и эквиваленты, очевидные специалистам в данной области техники, независимо от того имеются ли они в настоящем или будут разработаны позднее, предусмотрены находиться в пределах сущности и объема данного изобретения, как определено прилагаемой формулой изобретения. Все патенты, патентные заявки и публикации, упомянутые в описании, отражают уровни специалистов в области техники, к которой относится данное изобретение. Все патенты, патентные

заявки и публикации включены в данное описание путем ссылки во всей полноте для всех целей и до той же степени, как если бы каждая индивидуальная публикация была конкретно и индивидуально указана как включенная путем ссылки во всей своей полноте и для всех целей. Изобретение, иллюстративно описанное здесь, подходящим образом может быть использовано на практике в отсутствие какого-либо элемента(ов), не раскрытого конкретно здесь. Таким образом, следует понимать, что хотя настоящее изобретение было конкретно раскрыто посредством предпочтительных воплощений и возможных признаков, специалисты в данной области техники могут прибегнуть к модификации и вариации раскрытых здесь концепций, и такие модификации и вариации предусмотрены входить в объем данного изобретения, как определено прилагаемой формулой изобретения.

Перечни последовательностей

Последовательности нуклеиновых кислот и аминокислот, перечисленные в прилагаемом перечне последовательностей, показаны с использованием стандартных буквенных обозначений для нуклеотидных оснований и трехбуквенных кодов для аминокислот, как определено в 37 C.F.R. 1.822.

SEQ ID NO: 1 представляет собой аминокислотную последовательность усеченного человеческого полипептида ActRIIB-ECD дикого типа.

SEQ ID NO: 2 представляет собой аминокислотную последовательность усеченного человеческого полипептида ActRIIA-ECD дикого типа.

SEQ ID NO: 3-37 представляют собой аминокислотные последовательности различных гибридных растворимых ActRIIB-ECD полипептидов.

SEQ ID NO: 38 представляет собой аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина гамма-1 (IgG1).

SEQ ID NO: 39 представляет собой аминокислотную последовательность Fc домена IgG1.

SEQ ID NO: 40 представляет собой аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина гамма-2.

SEQ ID NO: 41 представляет собой аминокислотную последовательность Fc домена IgG2.

SEQ ID NO: 42 представляет собой аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина гамма-4.

SEQ ID NO: 43 представляет собой аминокислотную последовательность Fc домена IgG4.

SEQ ID NO: 44 представляет собой аминокислотную последовательность пептидного линкера.

SEQ ID NO: 45 представляет собой полноразмерную аминокислотную последовательность человеческого ActRIIB полипептида.

SEQ ID NO: 46 представляет собой аминокислотную последовательность внеклеточного домена человеческого ActRIIB дикого типа (19-134 SEQ ID NO: 45).

SEQ ID NO: 47 представляет собой полноразмерную аминокислотную последовательность человеческого ActRIIA полипептида.

SEQ ID NO: 48 представляет собой аминокислотную последовательность внеклеточного домена человеческого ActRIIA дикого типа (20-135 SEQ ID NO: 47).

SEQ ID NO: 49 представляет собой аминокислотную последовательность сигнального пептида нативного ActRIIB.

SEQ ID NO: 50 представляет собой аминокислотную последовательность сигнального пептида легкой цепи иммуноглобулина.

SEQ ID NO: 51-117 представляют собой аминокислотные последовательности различных гибридных растворимых ActRIIB-ECD полипептидов.

SEQ ID NO: 118 представляет собой аминокислотную последовательность пептидного линкера.

5 ПЕРЕЧНИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Усеченный ActRIIB-ECD дикого типа

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
10 (SEQ ID NO: 1)

Усеченный ActRIIA-ECD дикого типа

ETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCW
LDDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKP
15 P (SEQ ID NO: 2)

Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AO-0001)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
20 (SEQ ID NO: 3)

Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0002)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
25 (SEQ ID NO: 4)

Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0003)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
30 (SEQ ID NO: 5)

Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0004)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDINCYDRDTCVEKKDSPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
35 (SEQ ID NO: 6)

Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0005)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRDTCVEKKDSPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
40 (SEQ ID NO: 7)

Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0006)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
45 (SEQ ID NO: 8)

Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0007)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 9)

5 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0008)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVEKKDSPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 10)

10 Гибридный человеческий ActRIIA-ECD (AG-0009)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDINCYDRQECVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 11)

15 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0010)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 12)

20 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0011)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 13)

25 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0012)

ETQECIYYNANWEKDRTNQTVGVEPCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCW
LDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAP
T (SEQ ID NO: 14)

30 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0013)

ETQECIYYNANWEKDRTNQTVGVEPCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 15)

35 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0014)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 16)

40 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0015)

ETRECIYYNANWEKDRTNQTVGVEPCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 17)

45 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0016)

ETQECIYYNANWEKDRTNQTGVEPCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 18)

5 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0017)

ETQECIYYNANWEKDRTNQTGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 19)

10 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0018)

ETQECIYYNANWEKDRTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 20)

15 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0019)

ETRECIYYNANWEKDRTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 21)

20 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0020)

ETQECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 22)

25 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0021)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCFATWRNSSGTIELVKQGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 23)

30 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0022)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDINCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 24)

35 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0023)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATKENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 25)

40 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0024)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDINCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 26)

45 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0025)

ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDINCYDRQECVATKENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 27)

5 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0026)

ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDINCYDRQECVATKENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 28)

10 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0027)

ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDINCYDRQECVATKENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 29)

15 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0028)

ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATKENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 30)

20 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0029)

ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 31)

25 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0030)

ETRECIYYNANWELERTNQSLERCYGDQDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDINCYDRQECVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 32)

30 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0031)

ETRECIFFNANWEKDRTNQTGVEPCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 33)

35 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0032)

ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCFATWKNISGSIELVKQGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 34)

40 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0033)

ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRTDCVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 35)

45 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0034)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
 DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNMCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
 (SEQ ID NO: 36)

5 Гибридный hu-ActRIIB-ECD (AG-0035)

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
 DDINCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
 (SEQ ID NO: 37)

10 Константная область тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина гамма-1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 15 STYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
 TKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 38)

Fc домен IgG1

20 VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 39)

25 Константная область тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина гамма-2

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
 LQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECP
 PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
 30 KPREEQFNSTFRVWSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE
 PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

35 Fc домен IgG2

VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 FNSTFRVWSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
 PSREEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYS
 40 KLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

Константная область тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина гамма-4

45

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
 LQSSGLYSLSSVWTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAP
 EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
 5 TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR
 EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
 SVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 42)

10 Fc домен IgG4

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
 15 DSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID
 NO: 43)

Последовательность пептидного линкера

GGGGS (SEQ ID NO: 44)

20 Полноразмерная аминокислотная последовательность человеческого ActRIIB
 полипептида

MTAPWVALALLWGSLCAGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQD
 KRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDNFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNF
 25 CNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTLTLLVLAISLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPP
 YGHVDIHEDPGPPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCVWKAQLMNDFFVAVKIFPLQD
 KQSWQSEREIFSTPGMKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGKN
 IITWNECHVAETMSRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVL
 30 ADFGLAVRFEPGKPPGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVL
 WELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEELQEVVHKKMRPTIKDHWLKH
 GLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTSDCLVSLVTSVTNVDL
 PPKESSI (SEQ ID NO: 45)

35 Внеклеточный домен человеческого ActRIIB дикого типа (19-134 SEQ ID NO: 45)

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELV
 KKGCVLDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEP
 PPTAPT (SEQ ID NO: 46)

40 Полноразмерная аминокислотная последовательность человеческого полипептида
 ActRIIA

45

MGAATKLFAVFLISSGAILGRSETQECIYYNANWEKDKTNRSGIEPCYGDKDKR
 RHC FATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRND CIEKKDSPEVFFCCCEGNMCNER
 FFYFPEMEVTQPTSNPVTPKPLFNTLLYSLVPIMGIAVIVLFSFWMYRHHKLAYPPV
 5 LVPTQDPGPPPPSPLMGLKPLQLLEIKARGRFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQS
 WQNEYEISLPGMKHDNILQFIGAEKRGTSIDVDLWLITAFHEKGS LTDFLKANVVS
 WNELCHIAQTMARGLAYLHEDIPGLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFG
 10 ALKFEAGKSAGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELAS
 RCTASDGPVDEYMLPFEEEEIGQHPSLEDMQEVVHKKR PVLRECWQKHSGMAM
 LCETIEECWDHDAEARLSAGC VEERIIQMQLTNIITTEDIVTVVTMVTNVDFPPKES
 SL (SEQ ID NO: 47)

Внеклеточный домен человеческого ActRIIA дикого типа (20-135 SEQ ID NO: 47)

15 AILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHC FATWKNISGSIEIVK
 QGCWLDDINCYDR TDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNP
 VTPKPP (SEQ ID NO: 48)

Сигнальный пептид нативного ActRIIB:

20 MTA PWVALALLWGSLCAG (SEQ ID NO: 49)

Сигнальный пептид легкой цепи иммуноглобулина:

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC (SEQ ID NO: 50)

Гибридный hu-ActRIIB-ECD

25 ETQECLFFNANWEKDRTNQSGVEPCYGDKDKRRHCYASWRN SSGTIELVKKGCW
 LDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAP
 T (SEQ ID NO: 51)

Гибридный hu-ActRIIB-ECD

30 TQECLFFNANWEKDRTNQSGVEPCEGEQDKRLHCYASWRN SSGTIELVKKGCWL
 DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
 (SEQ ID NO: 52)

Гибридный hu-ActRIIB-ECD

35 ETRECLFFNANWEKDRTNQSGVEPCEGEQDKRLHCYASWRN SSGTIELVKKGCW
 LDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAP
 T (SEQ ID NO: 53)

Гибридный hu-ActRIIB-ECD

40 ETQECLFFNANWEKDRTNQSGVEPCYGEQDKRLHCYASWRN SSGTIELVKKGCW
 LDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAP
 T (SEQ ID NO: 54)

Гибридный hu-ActRIIB-ECD

45 ETRECLFFNANWEKDRTNQSGVEPCYGDKDKRRHCYASWRN SSGTIELVKKGCW
 LDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAP
 T (SEQ ID NO: 55)

Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 56)

5

Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWL
DDINCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 57)

10

Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWL
DDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 58)

15

Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETQECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD
DINCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 59)

20

Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD
DINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 60)

25

Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD
DINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 61)

30

Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD
DINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 62)

35

Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD
DINCYDRTDCVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 63)

40

Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD
DFNCYDRTDCVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 64)

45

Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD
DFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 65)

5 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETQECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 66)

10 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETQECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 67)

15 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETQECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD
DINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 68)

20 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETQECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLD
DINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 69)

25 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCEGEQDKRLHCFATWKNISGSIEIVKQGCWL
DDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 70)

30 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECLFFNANWEKDRTNQSGVEPCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCW
LDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 71)

35 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECLFFNANWEKDRTNQSGVEPCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCW
LDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 72)

40 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRTDCVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 73)

45 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRTDCVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 74)

5 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIEIVKKGCWL
DDFNCYDRTDCVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 75)

10 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGSIELVKKGCWL
DDFNCYDRTDCVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 76)

15 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGSIEIVKKGCWL
DDFNCYDRTDCVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 77)

20 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGSIEIVKQGCWL
DDFNCYDRTDCVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 78)

25 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRTDCVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
(SEQ ID NO: 79)

30 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 80)

35 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 81)

40 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNEKFSYFPMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 82)

45 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 83)

5 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 84)

10 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKQGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 85)

15 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIEIVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 86)

20 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGSIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 87)

25 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGSIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 88)

30 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIEIVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 89)

35 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKQGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 90)

40 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVETEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 91)

45 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVAKEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 92)

5 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 93)

10 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEDNPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 94)

15 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEESPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 95)

20 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPEVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 96)

25 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGDKDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVETEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 97)

30 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEKDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVAKEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 98)

35 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 99)

40 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGDKDKRLHCYASWRNSSGTIELVKQGCWL
DDFNCYDRQECVAKKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 100)

45 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGDKDKRLHCYASWRNSSGTIEIVKQGCWL
DDFNCYDRQECVAEKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 101)

5 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSLERCYGDQDKRLHCYASWRNSSGSIEIVKQGCWL
DDFNCYDRQECVAKKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 102)

10 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEKDKRRHCYASWRNSSGTIEIVKKG CWL
DDFNCYDRQECVATKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 103)

15 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSLERCYGDQDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPEVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 104)

20 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 105)

25 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSLERCYGEQDKRLHCYASWRNSSGSIEIVKKG CWL
DDFNCYDRDTCVATEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 106)

30 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRRHCYASWRNSSGSIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVAKEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 107)

35 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRRHCYASWRNSSGTIEIVKKG CWL
DDFNCYDRQECVAKEENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 108)

40 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRRHCYASWRNSSGSIEIVKKG CWL
DDFNCYDRQECVATKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
(SEQ ID NO: 109)

45 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIEIVKKG CWL
 DDFNCYDRQECVATKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
 (SEQ ID NO: 110)

5 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGDQDKRLHCYASWRNSSGSIELVKKG CWL
 DDFNCYDRQECVATKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
 (SEQ ID NO: 111)

10 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
 DDFNCYDRQECVATKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
 (SEQ ID NO: 112)

15 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIEIVKKG CWL
 DDFNCYDRQECVATKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
 (SEQ ID NO: 113)

20 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
 DDFNCYDRQECVATKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
 (SEQ ID NO: 114)

25 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGDQDKRLHCYASWRNSSGTIEIVKKG CWL
 DDFNCYDRQECVAKKENPQVYFCCCEGNFCNEKFSYFPQMEVTQPTSNPVTPKPP
 (SEQ ID NO: 115)

30 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWL
 DDINCYDRTDCEVKKDSPEVYFCCCEGNMCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
 (SEQ ID NO: 116)

35 Гибридный hu-ActRIIB-ECD

ETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRRHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
 DDINCYDRQECVATKENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT
 (SEQ ID NO: 117)

40 Последовательность пептидного линкера

ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 118)

(57) Формула изобретения

1. Выделенный белок, представляющий собой мутантный растворимый ActRIIB-ECD
 45 (рецептор активина IIВ-внеклеточный домен) полипептид, который содержит
 аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID
 NO: 5-10, 13, 16, 25-27, 29, 30, 31 и 37, где указанный мутантный ActRIIB-ECD полипептид
 способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную

аффинность связывания с костным морфогенетическим белком 9 (BMP9) относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа.

2. Слитый белок, содержащий мутантный растворимый ActRIIB-ECD полипептид по п. 1 и Fc домен человеческого иммуноглобулина, где указанный белок способен к связыванию с миостатином и активином А, но демонстрирует пониженную аффинность связывания с костным морфогенетическим белком 9 (BMP9) относительно ActRIIB-ECD полипептида дикого типа.

3. Слитый белок по п. 2, где Fc домен выбран из группы, состоящей из Fc домена человеческого IgG1 (иммуноглобулина G1), Fc домена человеческого IgG2 и Fc домена человеческого IgG4.

4. Слитый белок по п. 2, где мутантный растворимый ActRIIB-ECD полипептид является слитым с Fc доменом человеческого иммуноглобулина посредством пептидной линкерной последовательности.

5. Слитый белок по п. 4, где Fc домен человеческого иммуноглобулина содержит Fc домен человека, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 43.

6. Слитый белок по п. 5, где для связывания Fc домена человека с мутантным растворимым ActRIIB-ECD полипептидом использован линкер, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 44, вместе с шарнирным линкером, содержащим аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 118.

7. Слитый белок по п. 4, где мутантный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 29, и Fc домен человека содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 43.

8. Слитый белок по п. 7, где мутантный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и Fc домен человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43.

9. Слитый белок по п. 7, где мутантный растворимый ActRIIB-ECD полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и Fc домен человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43.

10. Слитый белок по п. 5, где указанный мутантный растворимый ActRIIB-ECD полипептид присоединен к указанному Fc домену человека посредством линкера, содержащего аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 44.

11. Слитый белок по п. 5, где указанный мутантный растворимый ActRIIB-ECD полипептид присоединен к указанному Fc домену человека посредством линкера, содержащего аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 118.

12. Слитый белок по п. 8, где указанный мутантный растворимый ActRIIB-ECD полипептид присоединен к указанному Fc домену человека посредством линкера, содержащего аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 44.

13. Слитый белок по п. 8, где указанный мутантный растворимый ActRIIB-ECD полипептид присоединен к указанному Fc домену человека посредством линкера, содержащего аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 118.

14. Слитый белок по п. 9, где указанный мутантный растворимый ActRIIB-ECD полипептид присоединен к указанному Fc домену человека посредством линкера, содержащего аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 44.

15. Слитый белок по п. 9, где указанный мутантный растворимый ActRIIB-ECD

полипептид присоединен к указанному Fc домену человека посредством линкера, содержащего аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 118.

16. Слитый белок по п. 6, где указанный мутантный растворимый ActRIIB-ECD полипептид состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, где
5 указанный мутантный растворимый ActRIIB-ECD полипептид является слитым с пептидным линкером, состоящим из аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 44, где указанный пептидный линкер является слитым с шарнирным линкером, состоящим из аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 118, и где указанный шарнирный линкер является слитым с Fc доменом, состоящим
10 из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 43.

17. Слитый белок по п. 6, где указанный мутантный растворимый ActRIIB-ECD полипептид состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29, где
указанный мутантный растворимый ActRIIB-ECD полипептид является слитым с пептидным линкером, состоящим из аминокислотной последовательности, изложенной
15 в SEQ ID NO: 44, где указанный пептидный линкер является слитым с шарнирным линкером, состоящим из аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 118, и где указанный шарнирный линкер является слитым с Fc доменом, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 43.

18. Фармацевтическая композиция для лечения связанных с мышечной атрофией
20 заболеваний или заболеваний костной системы, содержащая терапевтически эффективное количество выделенного белка по п. 1 или слитого белка по любому из пп. 2-17 в смеси с фармацевтически приемлемым носителем.

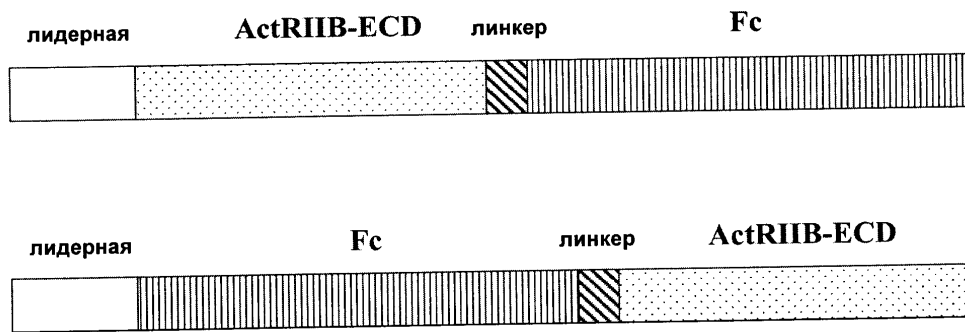
19. Фармацевтическая композиция по п. 18, где композиция пригодна для введения
путем, выбранным из группы, состоящей из подкожного, внутримышечного,
25 внутривенного и интратекального путей введения.

30

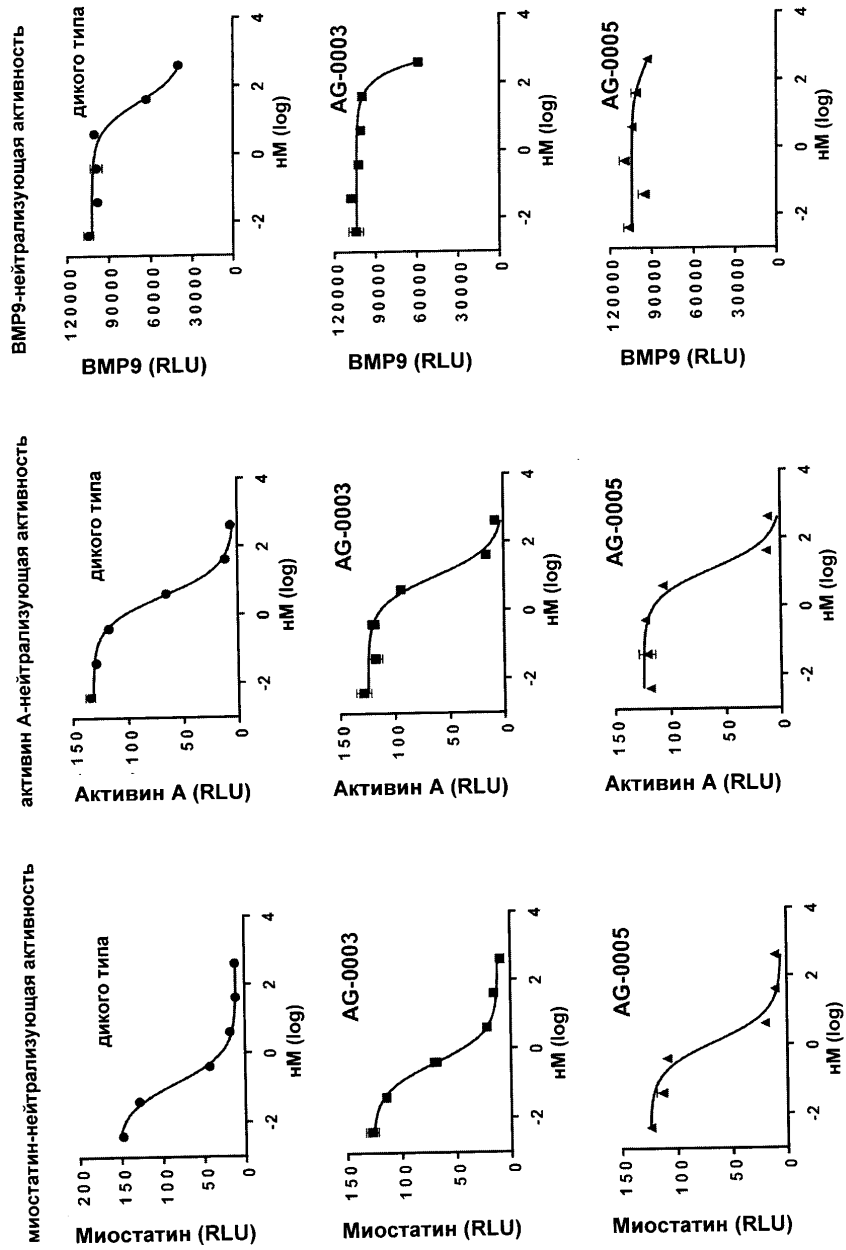
35

40

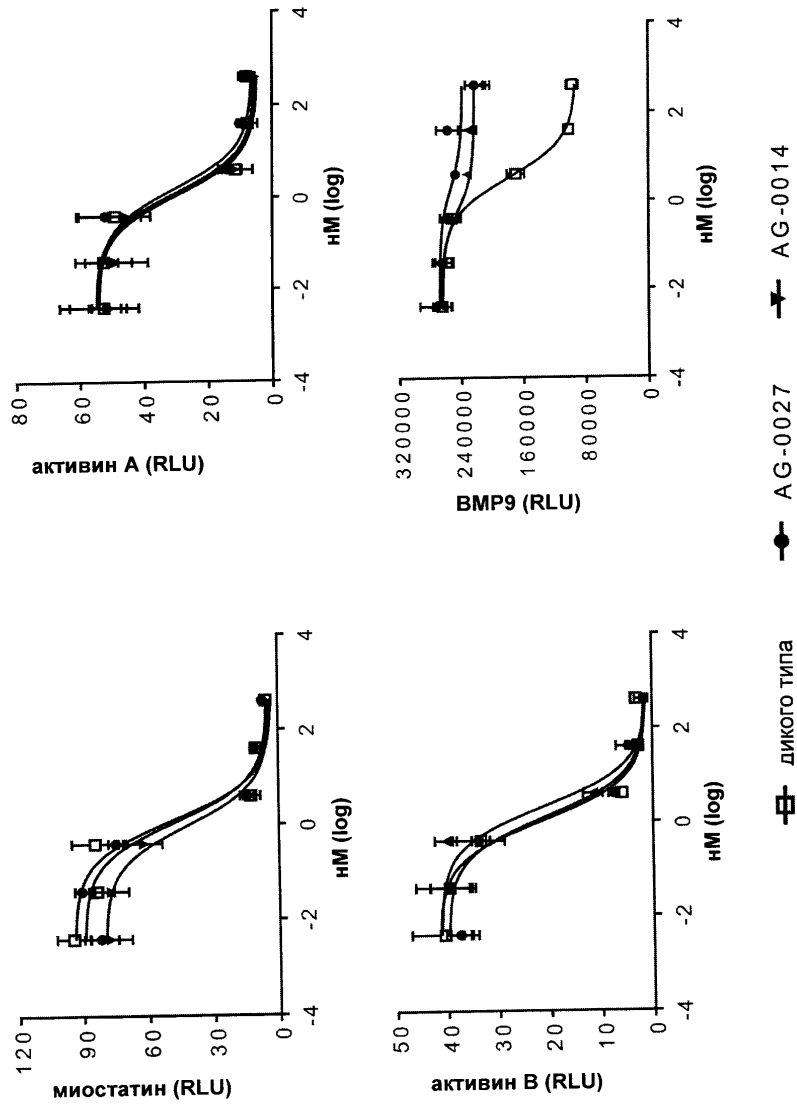
45



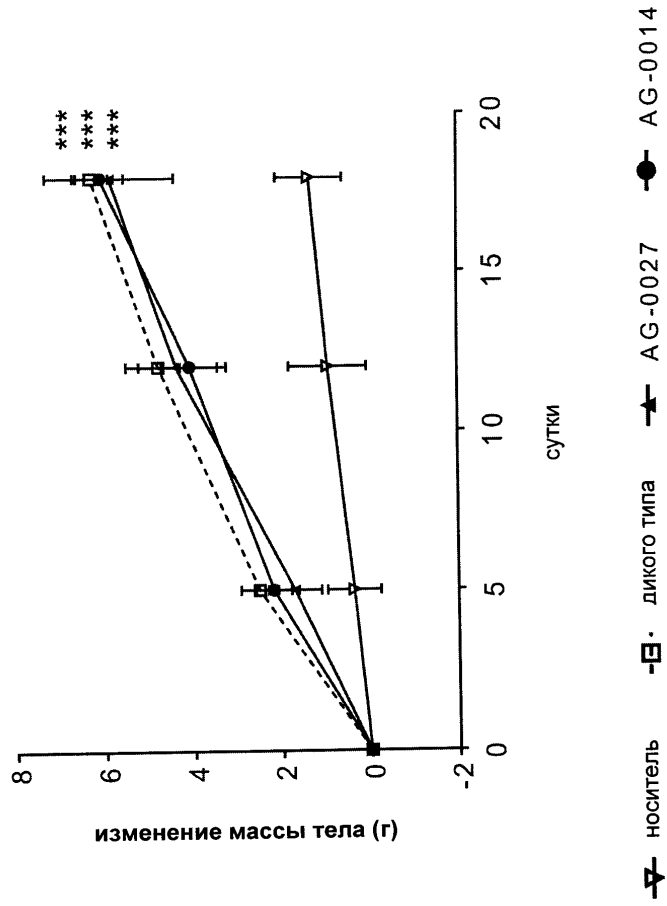
Фиг. 1



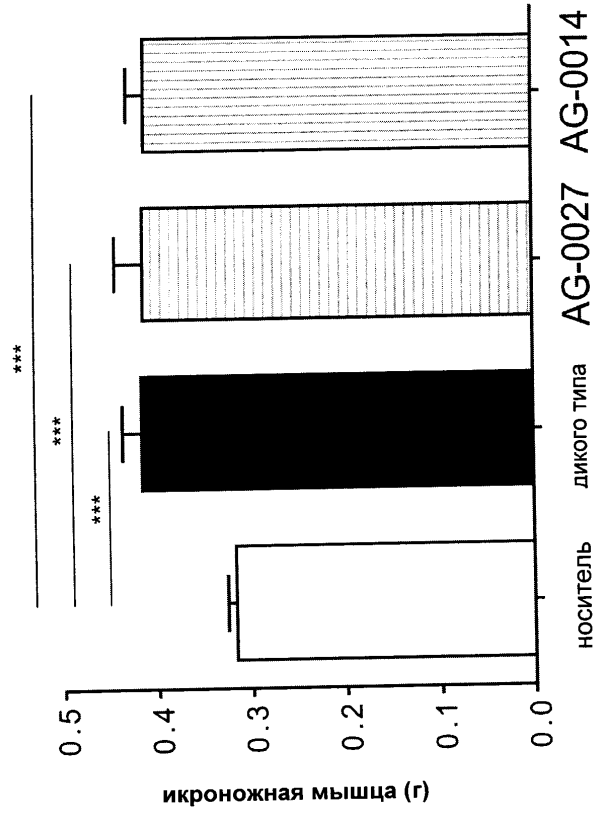
Фиг. 2



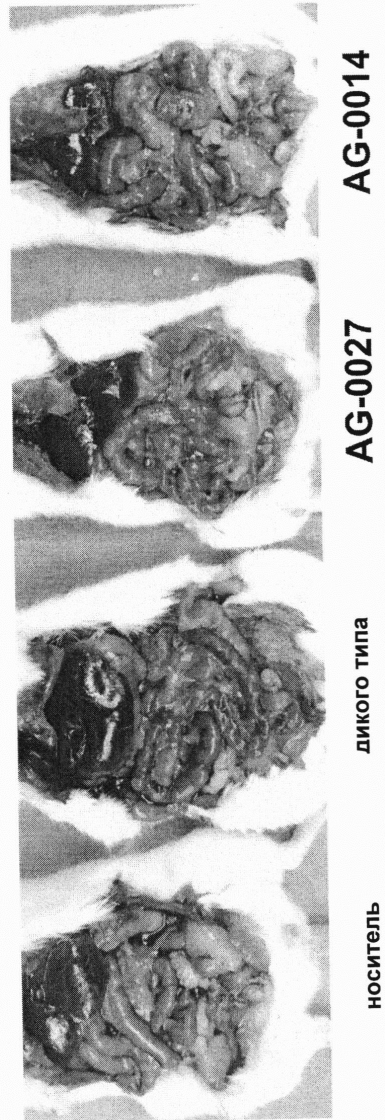
Фиг. 3



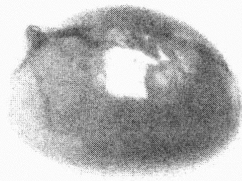
Фиг. 4



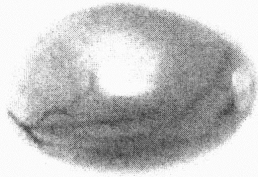
Фиг. 5



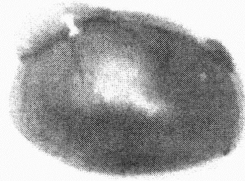
Фиг. 6



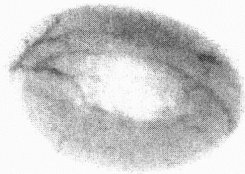
AG-0014



AG-0027

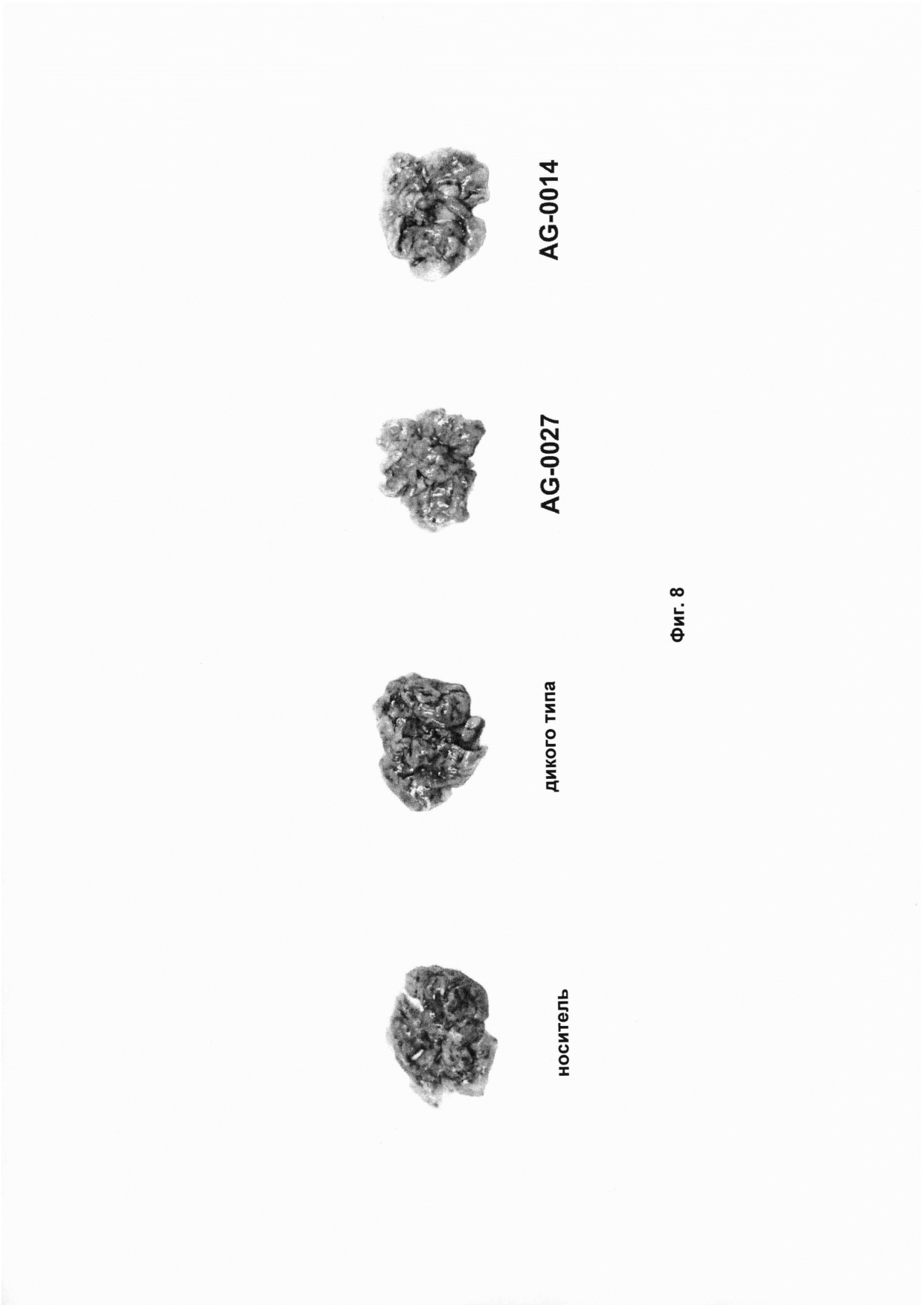


ДИКОГО ТИПА

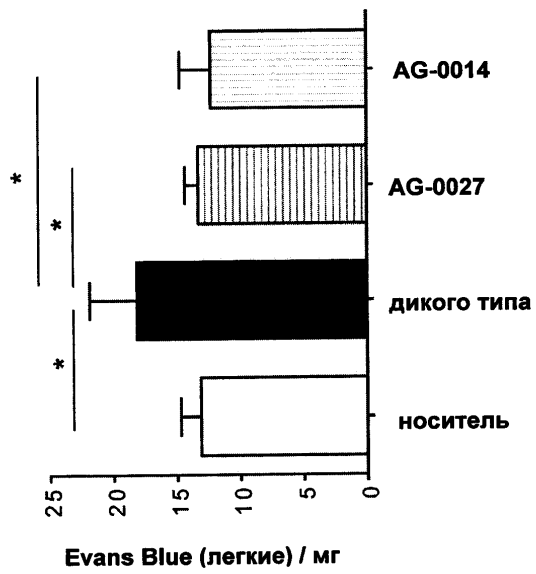
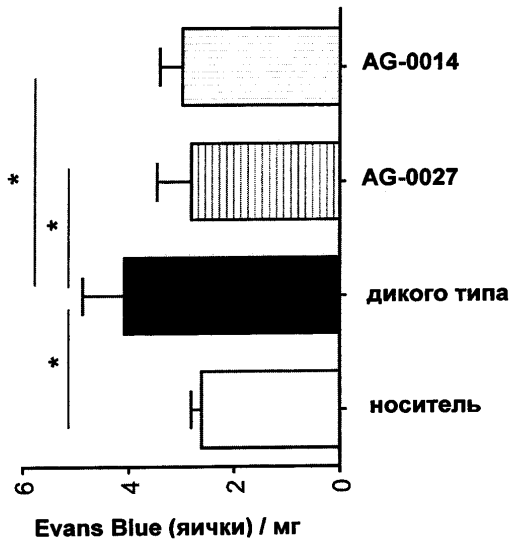


НОСИТЕЛЬ

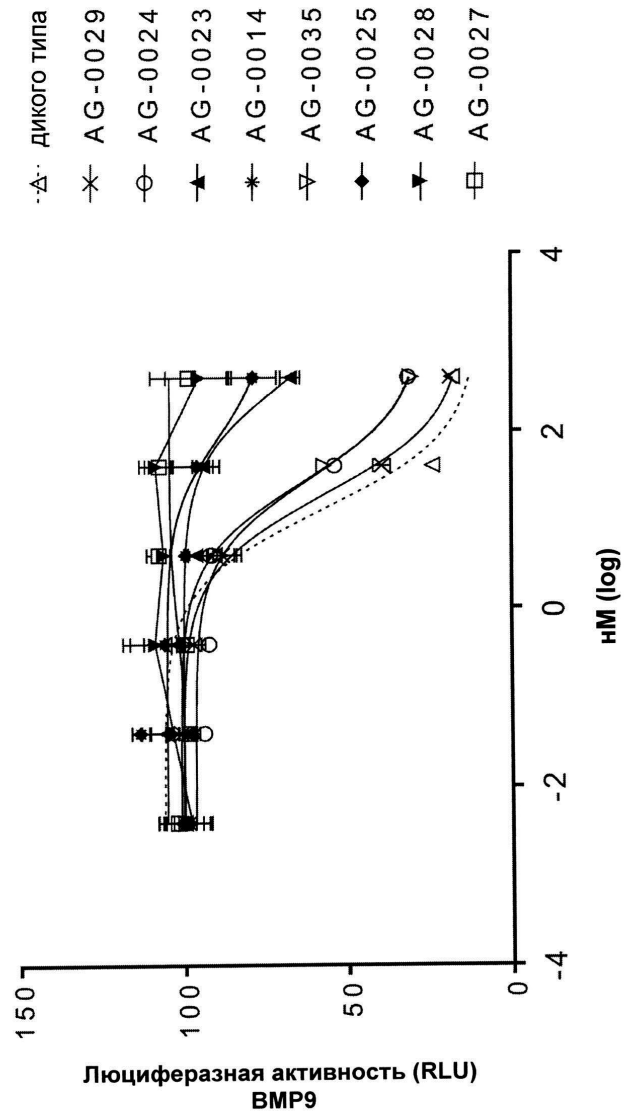
Фиг. 7



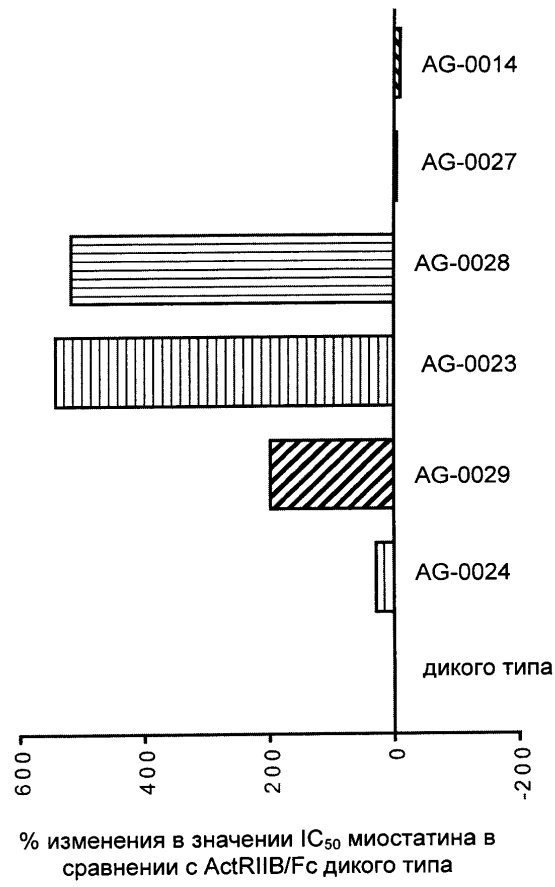
Фиг. 8



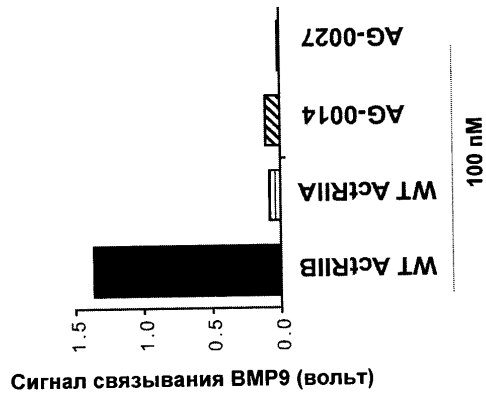
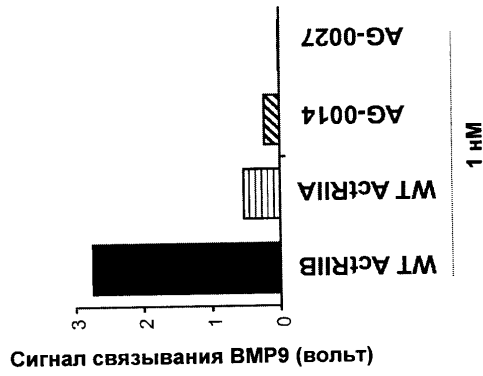
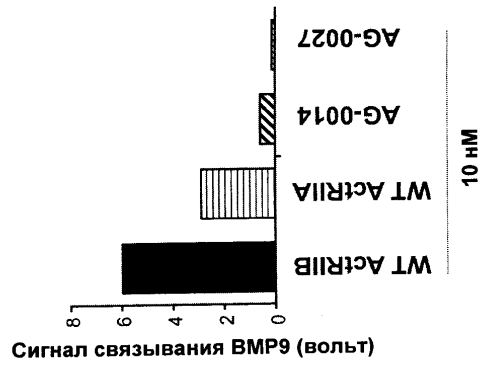
ФИГ. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12