



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2120999 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2013.01.14
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2012.08.29
(86)	Europeisk søknadsnr	08725055.1
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.02.01
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2009.11.25
(30)	Prioritet	2007.02.09, US, 900580 P 2007.05.31, US, 932762 P 2007.06.26, US, 937365 P 2007.10.25, US, 52807 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
	Utpekte samarbeidende stater	AL BA MK RS
(73)	Innehaver	Acceleron Pharma, Inc., 128 Sidney Street, Cambridge, MA 02139, US-USA
(72)	Oppfinner	KNOPF, John, 147 Robbins Drive, Carlisle, MA 01741, US-USA SEEHRA, Jasbir, 3 Lincoln Terrace, Lexington, MA 02421-6818, US-USA KUMAR, Ravindra, 421 Arlington Street, Acton, MA 01720, US-USA
(74)	Fullmektig	Plougmann & Vingtoft, Postboks 1003 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Farmasøytiske forbindelser omfattende Activin-ActRIIA-antagonister og anvendelse derav for forebygging eller behandling av multipel myelom
(56)	Anførte publikasjoner	US-A1- 2006 068 468 US-A1- 2007 249 022 WO-A-2005/094871 WO-A-2006/012627 WO-A-2007/062188 HAROUSSEAU JEAN-LUC ET AL: "Multiple myeloma.", HEMATOLOGY / THE EDUCATION PROGRAM OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY. AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY. EDUCATION PROGRAM 2004 LNKD- PUBMED:15561686, 2004, pages 237-256, ISSN: 1520-4391 MULIVOR A W ET AL: "RAP-011, a soluble activin receptor type IIA murine IgG-Fc fusion protein, is a novel bone anabolic agent that prevents bone loss and skeletal metastases in a mouse model of metastatic breast cancer", BONE, PERGAMON PRESS., OXFORD, GB, vol. 44, 1 June 2009 (2009-06-01), pages S221-S222, XP026136471, ISSN: 8756-3282, DOI: 10.1016/J.BONE.2009.03.066 [retrieved on 2009-05-23] N. RAJE ET AL: 'Advances in the Biology and Treatment of Bone Disease in Multiple Myeloma' CLINICAL CANCER RESEARCH vol. 17, no. 6, 15 March 2011, pages 1278 - 1286, XP055006243 ISSN: 1078-0432 PEARSALL, R. SCOOTET AL: "A soluble activin Type IIA receptor induces bone formation and

improves skeletal integrity" PNAS, vol. 105, no. 19, 13 May 2008 (2008-05-13), pages 7082-7087, XP002494788

S. VALLET ET AL: 'From the Cover: Activin A promotes multiple myeloma-induced osteolysis and is a promising target for myeloma bone disease' PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES vol. 107, no. 11, 16 March 2010, pages 5124 - 5129, XP055006239 ISSN: 0027-8424

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

SAKAI R ET AL: "Activin increases bone mass and mechanical strength of lumbar vertebrae in aged ovariectomized rats" BONE, PERGAMON PRESS., OXFORD, GB, vol. 27, no. 1, 1 July 2000 (2000-07-01), pages 91-96, XP002294252 ISSN: 8756-3282

Beskrivelse

OPPFINNELSENS BAKGRUNN

Forstyrrelser i ben, som spenner fra osteoporose til benbrudd, representerer et sett av patologiske tilstander for hvilke det finnes få effektive farmasøytiske midler.

5 Behandlingen fokuserer i stedet på fysisk og atferdsmessig intervensjon, deriblant immobilisering, trening og endret kosthold. Det ville være gunstig å ha terapeutiske midler som fremmer benvekst og øker bentettheten for det formål å behandle en rekke forskjellige benforstyrrelser.

Benvekst og mineralisering avhenger av aktiviteten til to celletyper, osteoklaster og osteoblaster, selv om kondrocytter og celler i kretsløpssystemet også deltar i avgjørende aspekter av disse prosessene. Utviklingsmessig skjer bendannelsen via to mekanismer: endokondral ossifikasjon og intramembranøs ossifikasjon, hvor den første er ansvarlig for longitudinal bendannelse og den siste er ansvarlig for dannelsen av topologisk flate ben, for eksempel skallebena. Endokondral ossifikasjon krever en sekvensiell dannelse og degradering av bruskstrukturer i vekstskivene som fungerer som templat for dannelsen av osteoblaster, osteoklaster, kretsløpssystemet og påfølgende mineralisering. Under intramembranøs ossifikasjon dannes ben direkte i bindevevene. Begge prosesser krever infiltrasjon av osteoblaster og påfølgende deponering av matriks.

20 Brudd og andre strukturelle forstyrrelser i ben heles gjennom en prosess som i det minste overfladisk ligner sekvensen av utviklingsmessige hendelser i osteogenesen, deriblant dannelsen av bruskvev og påfølgende mineralisering. Bruddhelingsprosessen kan foregå på to måter, Direkte eller primær benheling skjer uten kallusdannelse. Indirekte eller sekundær benheling skjer via kallusdannelse som et mellomliggende trinn. Primær heling av brudd omfatter gjendanning av mekanisk kontinuitet over en kort splittelse. Under egnede betingelser viser benresorberende celler som omgir splittelsen en tunneldannende resorberende respons og etablerer baner for penetrering av blodkar og påfølgende heling. Sekundær heling av ben følger en prosess som omfatter betennelse, dannelse av myk kallus, mineralisering av kallus og remodellering av kallus. I betennelsesstadiet opptrer hematom og blødning som en følge av forstyrrelsen av periostale og endostale blodkar på skadestedet. Inflammatoriske celler invaderer området. I stadiet med dannelse av myk kallus danner cellene nye kar, fibroblaster, intracellulært materiale og støtteceller, slik at det dannes granulasjonsvev i rommet mellom bruddfragmentene. Klinisk forening over bruddet etableres av fibervev og bruskvev (myk kallus). Osteoblaster dannes og formidler mineraliseringen av myk kallus, som så erstattes med lamellært ben og gjennomgår de normale remodelleringsprosesser.

I tillegg til brudd og andre fysiske forstyrrelser av benstrukturen kan tap av benets mineralinnhold og benmasse være en følge av et bredt utvalg av tilstander og

kan føre til betydelige medisinske problemer. Endring av benmassen opptrer på en relativt forutsigbar måte gjennom livsløpet til et individ. Opp til tilnærmet trettiårsalderen vokser ben hos både menn og kvinner til en maksimal masse via lineær vekst av de endokondrale vekstskivene og radial vekst. Etter tilnærmet trettiårsalderen (for 5 trabekulært ben, f. eks. flate ben som ribben og bekken) og førtiårsalderen (for kortikale ben, f. eks. lange ben som foreligger i lemmene) opptrer et langsomt tap av ben hos både menn og kvinner. Hos kvinner opptrer også et sluttstadium med omfattende bentap, trolig grunnet postklimakteriell østrogenmangel. I denne fasen kan kvinner tape ytterligere 10 % av benmassen fra kortikalt ben og 25 % fra den 10 trabekulære seksjonen. Hvorvidt progressivt tap av ben fører til en patologisk tilstand, for eksempel osteoporose, avhenger i det vesentlige av individets initiale benmasse og om det foreligger forverrende forhold.

Bentap beskrives noen ganger som en ubalanse i den normale benremodel- 15 leringsprosessen. Friskt ben gjennomgår kontinuerlig en remodel- leringen begynner med at osteoklaster resorberer ben. Det resorberte ben erstattes så med nytt benvev, noe som er karakterisert ved at osteoblastene danner kollagen, fulgt av en forkalkning. I friske individer er det balanse mellom resorbsjons- og dannelses- hastigheten. Osteoporose er en kronisk, progressiv tilstand som særpreges av en forskyvning mot resorbsjon, noe som fører til en total reduksjon av benmassen og 20 mineraliseringen av ben. Hos mennesker opptrer klinisk osteopeni (en mineraltetthet i ben som ligger mer enn ett standardavvik, men mindre enn 2,5 standardavvik under gjennomsnittsverdien for ben hos unge voksne) før osteoporose. Verden over står tilnærmet 75 millioner mennesker i fare for å utvikle osteoporose.

Det å kontrollere balansen mellom aktiviteten av osteoklaster og osteoblaster 25 kan følgelig være nyttig for å fremme healing av brudd og annen skade på ben, så vel som for behandling av forstyrrelser, for eksempel osteoporose, som er forbundet med tap av benmasse og redusert mineralisering av ben.

Når det gjelder osteoporose anvendes både østrogen, kalsitonin, osteokalsin med vitamin K eller høye doser av kalsium i kosten som terapeutiske tiltak. Andre tera- 30 peutiske tilnærminger til osteoporose omfatter bisfosfonater, parathormon, kalsi- mimetika, statiner, anabole steroider, lantan- og strontiumsalter og natriumfluorid. Slike terapeutiske midler er imidlertid ofte forbundet med uønskede bivirkninger.

Det er således et formål med den foreliggende beskrivelse å tilveiebringe sammensetninger for forebyggelse og behandling av multiple myelomer, som indikert i 35 kravene 1-12.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

I et første aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse en farmasøytisk sammensetning som omfatter et ActRIIa-FC-fusjonsprotein uttrykt fra CHO-celler,

hvor et ActRIIA-Fc-fusjonsprotein er en dimer dannet av to polypeptider som begge har en aminosyresekvens som er minst 90 % eller 95 % identisk med aminosyresekvensen ifølge SEKV. ID. NR. 7, sammenbundet ved disulfidbinding, og hvor dimeren har mellom 3 og 5 sialinsyregrupper.

ActRIIa-Fc-fusjonsproteinet kan være en dimer dannet av to polypeptider av SEKV. ID. NR. 7, og et eller begge polypeptider kan om ønskelig ha en aminosyre mindre i amino- eller karboksyenden enn hva som vises i SEKV. ID. NR. 7. ActRIIA-Fc-fusjonsproteinet kan uttrykkes rekombinant i CHO-celler ved anvendelse av TPA-leadersekvensen ifølge SEKV. ID. NR. 9. Dimeren kan ha 4 sialinsyregrupper.

I noen utførelser har ActRIIA-Fc-fusjonsproteinet en halveringstid i serum på gjennomsnittlig 25 til 32 dager i normale, friske mennesker og ekvivalent biotilgjengelighet enten det tilføres intravenøst eller subkutan. Den farmasøytiske sammensetningen ifølge det første aspekt kan være egnet for subkutan tilførsel. Fortrinnsvis er ActRIIA-Fc-fusjonsproteinet minst 90 % rent når det gjelder andre proteinbestanddeler. ActRIIa-Fc-fusjonsproteinet kan omfatte en eller flere modifiserte aminosyrerester utvalgt blant: en glykosylert aminosyre, en PEGylert aminosyre, en farnesylert aminosyre, en acetyllert aminosyre, en biotinyllert aminosyre, en aminosyre konjugert til en lipidgruppe og en aminosyre konjugert til et organisk derivatiseringsmiddel. Den farmasøytiske sammensetningen ifølge det første aspekt kan videre omfatte et bisfosfonatmiddel, som kan være utvalgt blant alendronat, ibandronat og risedronat.

I et andre aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse en farmasøytisk sammensetning som omfatter et ActRIIa-Fc-fusjonsprotein for anvendelse i behandling og forebyggelse av multiple myelomer i et menneske, hvor den farmasøytiske sammensetningen er en farmasøytisk sammensetning ifølge det første aspekt av oppfinnelsen.

I et tredje aspekt tilveiebringer oppfinnelsen anvendelse av et ActRIIa-Fc-fusjonsprotein for fremstilling av et medikament for behandling eller forebyggelse av multiple myelomer i et menneske, hvor ActRIIa-Fc-proteinet er et ActRIIa-Fc-fusjonsprotein som definert i det første aspekt av oppfinnelsen.

Delvis beskrives det heri at molekyler med aktivin- eller ActRIIa-antagonistisk aktivitet ("aktivinantagonister" og "ActRIIa-antagonister", under ett betegnet "aktivin-ActRIIa-antagonister") kan anvendes for å øke bentettheten, fremme benveksten og/eller øke benstyrken. Nærmere bestemt beskrives det heri at en løselig form av ActRIIa virker som en inhibitor av aktivin-ActRIIa-signalisering og fremmer økt bentetthet, benvekst og benstyrke *in vivo*. Mens de fleste farmasøytiske midler som fremmer benvekst eller inhiberer tap av ben virker som enten antikatabole midler (også ofte betegnet "katabole midler") (f. eks. bisfosfonater) eller anabole midler (f. eks. parathormon, PTH, når dette doseres på en passende måte), viser det løselige ActRIIa-protein en dobbelt aktivitet, med både antikatabolske og anabole virkninger. Det beskrives følgelig heri at antagonister av aktivin-ActRIIa-signalveien kan anvendes for

å øke bentettheten og fremme benveksten. Selv om løselig ActRIIa kan påvirke ben via en mekanisme som er en annen enn aktivinantagonisme, kan det være ønskelig at terapeutiske midler utvelges basert på en aktivin-ActRIIa-antagonistisk aktivitet. Som beskrevet heri er aktivin-ActRIIa-antagonister effektive for forebyggelse og/eller reparasjon av benskade grunnet multippelt myelom-tumorer og brysttumorer, og i tillegg at aktivin-ActRIIa-antagonister reduserer tumorbelastningen i multiple myelomer. Løselig ActRIIa-polypeptid fremmer benveksten uten å gi en konsistent målbar økning av muskelmassen.

Heri beskrives fremgangsmåter for anvendelse av aktivin-ActRIIa-antagonister, deriblant for eksempel aktivinbindende ActRIIa-polypeptider, anti-aktivinantistoffer, anti-ActRIIa-antistoffer, aktivin- eller ActRIIa-rettede små molekyler og aptamerer og nukleinsyrer som reduserer ekspresjonen av aktivin og ActRIIa, for behandling av forstyrrelser forbundet med lav bentetthet eller lav benstyrke, for eksempel osteoporose, eller for fremme av benvekst i pasienter med behov for dette, for eksempel pasienter med et benbrudd. Heri beskrives polypeptider som omfatter et løselig, aktivinbindende ActRIIa-polypeptid som bindes til aktivin. ActRIIa-polypeptider kan utformes som et farmasøytisk preparat som omfatter det aktivinbindende ActRIIa-polypeptid og et farmasøytisk godtagbart bærestoff. Det aktivinbindende ActRIIa-polypeptid bindes fortrinnsvis til aktivin med en K_D som er lavere enn 1 mikromolar eller lavere enn 100, 10 eller 1 nanomolar. Om ønskelig binder det aktivinbindende ActRIIa-polypeptid selektivt aktivin fremfor GDF11 og/eller GDF8, og fortrinnsvis med en K_D som er minst 10 ganger, 20 ganger eller 50 ganger lavere for aktivin enn for GDF11 og/eller GDF8. Uten ønske om å være bundet til en gitt virkningsmekanisme, forventes det at denne graden av selektivitet for inhibering av aktivin fremfor inhibering av GDF11/GDF8 er grunnen til den selektive virkningen på ben, uten en konsistent målbar virkning på muskel. Et ActRIIa-polypeptid kan utvelges for å gi mindre enn 15 %, mindre enn 10 % eller mindre enn 5 % økning av muskel ved doser som gir ønskelige virkninger på ben. Sammensetningen er fortrinnsvis minst 95 % ren når det gjelder andre polypeptid-bestanddeler, anslått ved størrelseseksklusjonskromatografi, og sammensetningen er mer foretrukket minst 98 % ren. Et aktivinbindende ActRIIa-polypeptid for anvendelse i oppfinnelsen kan ha en aminosyresekvens ifølge SEKV. ID. NR. 7 eller en aminosyresekvens som er minst 90 %, 95 %, 97 % eller 99 % identisk med en aminosyresekvens ifølge SEKV. ID. NR. 7. Et aktivinbindende ActRIIa-polypeptider kan omfatte et funksjonelt fragment av et naturlig ActRIIa-polypeptid, for eksempel et fragment som omfatter minst 10, 20 eller 30 aminosyrer fra en sekvens utvalgt blant SEKV. ID. NR. 1-3 eller en sekvens ifølge SEKV. ID. NR. 2, uten de 10 til 15 C-terminale aminosyrene ("halen").

Et løselig, aktivinbindende ActRIIa-polyprotein kan omfatte en eller flere endringer i aminosyresekvensen (f. eks. i det ligandbindende domene), sammenlignet med et naturlig forekommende ActRIIa-polyprotein. Eksempler på endrede ActRIIa-polyproteiner gis i WO 2006/012627, s. 59-60. Endringen i aminosyresekvensen kan for eksempel endre glykosyleringen av polyprotein når det produseres i en pattedyr-
 5 insektcelle eller en annen eukaryot celle, eller endre proteolytisk spaltning av polyprotein sammenlignet med det naturlig forekommende ActRIIa-polyprotein.

Et aktivinbindende ActRIIa-polyprotein kan være et fusjonsprotein som som ett domene har et ActRIIa-polyprotein (f. eks. en ligandbindende del av et ActRIIa), og et
 10 eller flere andre domener som tilveiebringer en ønsket egenskap, for eksempel forbedret farmakokinetikk, lettere rensing, styring til spesielle vev osv. For eksempel kan et domene i et fusjonsprotein forbedre en eller flere av *in vivo*-stabilitet, *in vivo*-halveringstid, opptak/tilførsel, vevslokalisering eller vevsfordeling dannelse av protein-komplekser, multimerisering av fusjonsproteinet og/eller rensing. Dimerisering eller
 15 multimerisering kan gi økt ligandbindende affinitet. Et aktivinbindende ActRIIa-fusjonsprotein kan omfatte et Fc-domene (villtype eller mutant) fra et immunglobulin, eller en del av serumalbumin eller et annet protein som innfører ønskede egenskaper, for eksempel forbedret farmakokinetikk, forbedret løselighet eller forbedret stabilitet. Et ActRIIa-Fc-fusjonsprotein ifølge oppfinnelsen vil typisk produseres som et homo-
 20 dimert kompleks. Om ønskelig omfatter et ActRIIa-Fc-fusjonsprotein en relativt ustrukturert linker plassert mellom Fc-domenet og det ekstracellulære ActRIIa-domenet. Denne ustrukturerte linkeren kan tilsvare det grovt sett 15 aminosyrer lange, ustrukturerte området i den C-terminale enden av det ekstracellulære domenet i ActRIIa ("halen"), eller den kan være en kunstig sekvens med 1, 2, 3, 4 eller 5 amino-
 25 syrer eller med en lengde på mellom 5 og 15, 20, 30, 50 eller flere aminosyrer som er relativt fri for sekundærstruktur, eller en blanding av begge disse. En linker kan være rik på glysin- og prolinrester og kan for eksempel inneholde en enkelt sekvens av treonin/serin og glysiner eller gjentatte sekvenser av treonin/serin og glysiner (f. eks. TG₄- eller SG₄-singletter eller -repetisjoner). Et fusjonsprotein kan omfatte en under-
 30 sekvens for rensing, for eksempel et epitopvedheng, et FLAG-vedheng, en polyhistidinsekvens og en GST-fusjon. Om ønskelig omfatter et løselig ActRIIa-polyprotein en eller flere modifiserte aminosyrerester utvalgt blant: en glykosylert aminosyre, en PEGylert aminosyre, en farnesylert aminosyre, en acetylt aminosyre, en biotinylt aminosyre, en aminosyre konjugert til en lipidgruppe og en aminosyre konjugert til et
 35 organisk derivatiseringsmiddel. Et farmasøytisk preparat kan også omfatte en eller flere andre forbindelser, for eksempel en forbindelse som anvendes for behandling av en benforstyrrelse. Et farmasøytisk preparat er fortrinnsvis pyrogenfritt. Generelt foretrekkes det at et ActRIIa-protein uttrykkes i en pattedyr-cellelinje som sørger for egnet, naturlig glykosylering av ActRIIa-proteinet, slik at sannsynligheten for en

ufordelaktig immunrespons i en pasient reduseres Humane cellelinjer og CHO-cellelinjer har med hell blitt anvendt, og det forventes at andre vanlige pattedyr-ekspresjonssystemer vil være anvendbare.

Som beskrevet heri har ActRIIa-proteiner som betegnes ActRIIa-Fc ønskelige egenskaper, deriblant selektiv binding til aktivin fremfor GDF8 og/eller GDF11, høy-affinitets ligandbinding og en halveringstid i serum som er lenger enn to uker i dyremodeller. ActRIIa-Fc-polypeptider og farmasøytiske preparater som omfatter slike polypeptider og en farmasøytisk godtagbar eksipiens beskrives heri.

Nukleinsyrer som koder for et løselig, aktivinbindende ActRIIa-Fc-polypeptid beskrives heri. Et isolert polynukleotid kan omfatte en kodende sekvens for et løselig, aktivinbindende ActRIIa-polypeptid, som beskrevet ovenfor. For eksempel kan en isolert nukleinsyre omfatte en sekvens som koder for et ekstracellulært domene (f. eks. ligandbindende domene) fra et ActRIIa og en sekvens som ville ha kodet for en del av eller hele transmembrandomenet og/eller det cytoplasmatiske domenet fra et ActRIIa, var det ikke for et stoppkodon plassert i transmembrandomenet eller det cytoplasmatiske domenet eller plassert mellom det ekstracellulære domenet og transmembrandomenet eller det cytoplasmatiske domenet. Et isolert polynukleotid kan for eksempel omfatte en fullengde ActRIIa-polynukleotidsekvens, for eksempel SEKV. ID. NR. 4 eller 5, eller en delvis avkortet versjon, hvor det isolerte polynukleotid videre omfatter et transkripsjonstermineringskodon minst seks hundre nukleotider før 3'-enden eller ellers plassert slik at translasjon av polynukleotidet gir opphav til et ekstracellulært domene som om ønskelig er fusjonert til en avkortet del av et fullengde ActRIIa. Én nukleotidsekvens er SEKV. ID. NR. 14. Nukleinsyrer som beskrives heri kan være operativt koblet til en promoter for ekspresjon, og beskrivelsen tilveiebringer celler som er transformert med slike rekombinante polynukleotider. Cellen er fortrinnsvis en pattedyr-celle, for eksempel en CHO-celle.

Videre beskrives heri fremgangsmåter for fremstilling av et løselig, aktivinbindende ActRIIa-polypeptid. En slik fremgangsmåte kan omfatte ekspresjon av hvilken som helst av nukleinsyrene (f. eks. SEKV. ID. NR. 4, 5 eller 14) som beskrives heri i en egnet celle, for eksempel en ovariecelle fra kinesisk hamster (CHO-celle). En slik fremgangsmåte kan omfatte: a) dyrking av en celle under betingelser som er egnet for ekspresjon av det løselige ActRIIa-polypeptid, hvor cellen er transformert med en ekspresjonskonstruksjon for en løselig ActRIIa, og b) gjenvinning av det således uttrykte, løselige ActRIIa-polypeptid. Løselige ActRIIa-polypeptider kan gjenvinnes som en uforedlet, delvis rensset eller høyrenset fraksjon. Rensing kan oppnås ved en serie av rensetrinn, deriblant for eksempel et, to, tre eller flere av følgende, i hvilken som helst rekkefølge: protein A-kromatografi, anionbytterkromatografi (f. eks. Q-sepharose), hydrofob interaksjonskromatografi (f. eks. fenylsepharose), størrelses-ekskludjonskromatografi og kationbytterkromatografi.

En aktivin-ActRIIa-antagonist som beskrevet heri, for eksempel et løselig, aktivinbindende ActRIIa-polypeptid, kan anvendes i en fremgangsmåte for fremme av benvekst eller øking av bentetthet i et individ. Behandling av en forstyrrelse forbundet med lav bentetthet eller for fremme av benvekst i pasienter med behov for dette kan omfatte tilførsel til et individ med behov for dette av en effektiv mengde av aktivin-ActRIIa-antagonist. Videre beskrives anvendelser av aktivin-ActRIIa-antagonist for fremstilling av et medikament for behandling av en forstyrrelse eller tilstand som beskrevet heri.

En fremgangsmåte for påvisning av et middel som stimulerer vekst av eller økt mineralisering i ben kan omfatte: a) påvisning av et testmiddel som bindes til aktivin eller et ligandbindende domene fra et ActRIIa-polypeptid og b) evaluering av virkningen av middelet på vekst av eller mineralisering i ben (ikke en del av oppfinnelsen).

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

Figur 1 viser rensingen av ActRIIa-hFc uttrykt i CHO-celler. Proteinet renses som en enkelt, veldefinert topp.

Figur 2 viser bindingen av ActRIIa-hFc til aktivin og GDF-11, målt i en Biacore™-analyse.

Figur 3 viser skjematisk A-204-rapportørgenanalysen. Figuren viser rapportørvektoren: pGL3 (CAGA) 12 (beskrevet i Dennler et al, 1998, EMBO 17: 3091-3100). CAGA 12-motivet foreligger i TGF-beta-responderende gener (PAI-1-gen), så denne vektoren kan anvendes generelt for faktorer som signaliserer via Smad 2 og 3.

Figur 4 viser virkningene av ActRIIa-hFc (romber) og ActRIIa-mFc (kvadrater) på GDF-8-signalisering i A-204-rapportørgenanalysen. Begge proteiner viste en vesentlig inhibering av GDF-8-formidlet signalisering i pikomolare konsentrasjoner.

Figur 5 viser virkningene av tre forskjellige fremstillinger av ActRIIa-hFc på GDF-11-signalisering i A-204-rapportørgenanalysen.

Figur 6 viser eksempler på DEXA-bilder av kontrollmus og ActRIIa-mFc-behandlede BALB/c-mus før (øvre felter) og etter (nedre felter) behandlingstiden på 12 uker. Lysere farging indikerer økt bentetthet.

Figur 7 viser en kvantifisering av virkningene av ActRIIa-mFc på mineraltettheten i ben hos BALB/c-mus over de 12 ukene. Behandlingene var kontroll (romber), 2mg/kg dosering av ActRIIa-mFc (kvadrater), 6 mg/kg dosering av ActRIIa-mFc (trekanter) og 10 mg/kg dosering av ActRIIa-mFc (sirkler).

Figur 8 viser en kvantifisering av virkningene av ActRIIa-mFc på mineralinnholdet i ben hos BALB/c-mus over de 12 ukene. Behandlingene var kontroll (romber), 2mg/kg dosering av ActRIIa-mFc (kvadrater), 6 mg/kg dosering av ActRIIa-mFc (trekanter) og 10 mg/kg dosering av ActRIIa-mFc (sirkler).

Figur 9 viser en kvantifisering av virkningene av ActRIIa-mFc på mineraltettheten i spongiøst ben hos ovariektomiserte (OVX) eller narreopererte (SHAM) C57BL6-mus over seks uker. Behandlingene var kontroll (PBS) eller 10 mg/kg dosering av ActRIIa-mFc (ActRIIa).

Figur 10 viser en kvantifisering av virkningene av ActRIIa-mFc på spongiøst ben hos ovariektomiserte (OVX) C57BL6-mus over 12 uker. Behandlingene var kontroll (PBS, lyse søyler) eller 10 mg/kg dosering av ActRIIa-mFc (ActRIIa, mørke søyler).

Figur 11 viser en kvantifisering av virkningene av ActRIIa-mFc på spongiøst ben hos narreopererte C57BL6-mus etter 6 eller 12 ukers behandling. Behandlingene var kontroll (PBS, lyse søyler) eller 10 mg/kg dosering av ActRIIa-mFc (ActRIIa, mørke søyler).

Figur 12 viser resultatene fra pQCT-analyse av bentettheten hos ovariektomiserte mus over 12 ukers behandling. Behandlingene var kontroll (PBS, lyse søyler) eller ActRIIa-mFc (mørke søyler) y-akse: mg/cm³

Figur 13 viser resultatene fra pQCT-analyse av bentettheten hos ovariektomiserte mus over 12 ukers behandling. Behandlingene var kontroll (PBS, lyse søyler) eller ActRIIa-mFc (mørke søyler) y-akse: mg/cm³

Figur 14 A og 14B viser DEXA-analyse av hele kroppen etter 12 ukers behandling (A) og *ex vivo*-analyse av lårben (B). Lyse områder angir områder med høy bentetthet.

Figur 15 viser *ex vivo*-pQCT-analyse av lårbenets midtstykke etter tolv ukers behandling. Behandlingene var bærestoffkontroll (PBS, mørke søyler) og ActRIIa-mFc (lyse søyler). De fire søylene til venstre viser den totale bentettheten mens de fire søylene til høyre viser innholdet av kortikalt ben. Det første paret av søyler i hvert sett av fire søyler viser resultater fra ovariektomiserte mus, mens det andre paret viser data fra narreopererte mus.

Figur 16 viser *ex vivo*-QCT-analyse og rørknokkelinnhold i lårbenets midtstykke etter tolv ukers behandling. Behandlingene var bærestoffkontroll (PBS, mørke søyler) eller ActRIIa-mFc (lyse søyler). De fire søylene til venstre viser totalt beninnhold, mens de fire søylene til høyre viser kortikalt beninnhold. Det første paret av søyler i hvert sett av fire søyler viser resultater fra ovariektomiserte mus, mens det andre paret av søyler viser resultater fra narreopererte mus.

Figur 17 viser *ex vivo*-pQCT-analyse av lårbenets midtstykke og lårbenets kortikale tykkelse. Behandlingene var kontroll (PBS, mørke søyler) og ActRIIa-mFc (lyse søyler). De fire søylene til venstre viser endost-omkretsen, mens de fire søylene til høyre viser periost-omkretsen. Det første paret av søyler i hvert sett av fire søyler viser resultater fra ovariektomiserte mus, mens det andre paret av søyler viser resultater fra narreopererte mus.

Figur 18 viser resultatene fra mekanisk testing av lårben etter tolv ukers behandling. Behandlingene var kontroll (PBS, mørke søyler) og ActRIIa-mFc (lyse søyler). De to søylene til venstre viser resultater fra ovariektomiserte mus, men de to siste søylene viser resultater fra narreopererte mus.

Figur 19 viser virkningene av ActRIIa-mFc på trabekulært benvolum.

Figur 20 viser virkningene av ActRIIa-mFc på trabekulær arkitektur i det distale lårben.

Figur 21 viser virkningene av ActRIIa-mFc på kortikalt ben.

Figur 22 viser virkningene av ActRIIa-mFc på benets mekaniske styrke.

Figur 23 viser virkningene av forskjellige doser av ActRIIa-mFc på benegenskaper ved tre forskjellige doser..

Figur 24 viser histomorfometrisk analyse av ben som tyder på at ActRIIa-mFc har både anabol og antiresorberende aktivitet.

Figur 25 viser flere histomorfometriske resultater

Figur 26 viser bilder av lårben fra friske og tumorbærende mus og virkningene av ActRIIa-mFc-behandling på benmorfologien i multippelt myelom-modellen. Mus som bærer multippelt myelom-tumorer (5T2) viser en markant gropdannelse og erodering i benet sammenlignet med normale mus (friske). Behandling med ActRIIa-mFc fjerner denne virkningen.

Figur 27 viser resultater fra den kliniske utprøvnings i mennesker som beskrives i Eksempel 5, hvor arealet under kurven (AUC) og tilført dose av ActRIIa-hFc har en lineær korrelasjon uavhengig av hvorvidt ActRIIa-hFc ble tilført intravenøst (IC) eller subkutan (SC).

Figur 28 viser en sammenligning mellom serumnivået av ActRIIa-hFc ved intravenøs (IV) og subkutan (SC) tilførsel.

Figur 29 viser nivået av alkalisk fosfatase i ben (BAP) som respons på forskjellige dosenivåer av ActRIIa-hFc. BAP er en markør for anabol benvekst.

Figur 30 viser de kooperative virkningene av ActRIIa-mFc (RAP-011) og et bisfosfonatmiddel (zoledronat) i mus.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

1. Oversikt

Transformerende vekstfaktor beta (TGF-beta)-superfamilien inneholder en rekke forskjellige vekstfaktorer som har felles sekvenser og strukturmotiver. Disse proteinene vites å utøve biologiske virkninger på et bredt utvalg av celletyper i både vertebrater og invertebrater. Medlemmer av superfamilien utfører viktige funksjoner under fosterutviklingen i mønsterdannelse og vevsspesifisering og kan påvirke en rekke forskjellige differensieringsprosesser, deriblant adipogenese, myogenese, kondrogenese, kardiogenese, hematopoese, neurogenese og epitelcelle-

differensiering. Familien er oppdelt i to generelle grener: BMP/GDF-grenen og TGF-beta/aktivin/BMP 10-grenen, hvis medlemmer har forskjellige og ofte komplementære virkninger. Ved å manipulere aktiviteten av et medlem av TGF-beta-familien er det ofte mulig å oppnå signifikante fysiologiske endringer i en organisme. For eksempel bærer storferasene Piemontese og Belgian Blue en "loss-of-function"-mutasjon i GDF8 (også betegnet myostatin)-genet, noe som gir en markant økning av muskelmassen. Grobet et al., *Nat Genet.* 1997, 17(1):71-4. I mennesket er videre inaktive alleler av GDF8 forbundet med økt muskelmasse og, ifølge rapporter, eksepsjonell styrke. Schuelke et al., *N Engl J Med* 2004, 350:2682-8.

Aktiviner er dimere vekstfaktor-polypeptider som tilhører TGF-beta-superfamilien. Den foreligger i prinsippet tre aktivinforme (A, B og AB) som er homo/-heterodimerer av to nært beslektede β -subenheter ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$ og $\beta_A\beta_B$). Det humane genom koder også for et aktivin V og et aktivin E, som primært uttrykkes i lever. I TGF-beta-superfamilien er aktivinene unike og multifunksjonelle faktorer som kan stimulere hormonproduksjonen i ovarie- og placentaceller, understøtte overlevelse av nevronceller, påvirke gangen gjennom celledyklus på positiv eller negativ måte, avhengig av celletypen, og indusere mesodermal differensiering, i det minste i amfibiembryoer (DePaolo et al., 1991, *Proc Soc Exp Biol Med.* 198:500-512, Dyson et al., 1997, *Curr Biol.* 7:81-84, Woodruff, 1998, *Biochem Pharmacol.* 55:953-963). Videre ble erytroid differensieringsfaktor (EDF) isolert fra de stimulerte humane monocytte-leukemicellene, funnet å være identisk med aktivin A (Murata et al., 1988, *PNAS*, 85:2434). Det har blitt foreslått at aktivin A virker som en naturlig, positiv regulator av erythropoesen i benmarg. I flere vev antagoniseres aktivinsignalisering av den beslektede heterodimeren inhibin. Under for eksempel frigjøringen av follikkelstimulerende hormon (FSH) fra hypofysen vil aktivin fremme FSH-sekresjon og -syntese, mens inhibin hindrer FSH-sekresjon og -syntese. Andre proteiner som kan regulere bioaktiviteten av aktivin og/eller bindes til aktivin omfatter follistatin (FS), follistatinrelatert protein (FSRP) og α_2 -makroglobulin.

TGF- β -signaler formidles av heteromere komplekser av type I- og type II-serin/treonin kinaseresepetorer, som fosforylerer og aktiverer nedstrøms Smad-proteiner etter ligandstimulering (Massagué, 2000, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:169-178). Disse type I- og type II-reseptorene er transmembranproteiner som består av et ligandbindende, ekstracellulært domene med cysteinrikt område, et transmembrandomene og et cytoplasmatisk domene med prediktert serin/treonin-spesifisitet. Type I-reseptorer er essensielle for signalisering og type II-reseptorer er nødvendige for binding av ligander og for ekspresjon av type I-reseptorer. Type I- og type II-aktivinreseptorer danner et stabilt kompleks etter ligandbinding, noe som fører til at type II-reseptorene fosforylerer type I-reseptorene.

To beslektede type II-reseptor, ActRIIa og ActRIIb, har blitt vist å være type II-reseptorene for aktiviner (Mathews og Vale, 1991, Cell 65:973-982, Attisano et al., 1992, Cell 68:97-108). I tillegg til aktiviner kan ActRIIa og ActRIIb interagere biokjemisk med flere andre proteiner i TGF- β -familien, deriblant BMP7, Nodal, GDF8 og GDF11 (Yamashita et al., 1995, J. Cell Biol. 130:217-226, Lee og McPherron, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9306-9311, Yeo og Whitman, 2001, Mol. Cell 7:949-957, Oh et al., 2002, Genes Dev. 16:2749-54). ALK4 er den primære type I-reseptoren for aktiviner, særlig for aktivin A, og ALK-7 kan også fungere som en reseptor for aktiviner, særlig for aktivin B.

Som vist heri er et løselig ActRIIa-polypeptid (sActRIIa), som viser omfattende preferanse for binding til aktivin A i motsetning til andre medlemmer av TGF-beta-familien, for eksempel GDF8 eller GDF11, effektivt for fremme av benvekst og økning av bentetthet *in vivo*. Uten ønske om å være bundet til en gitt mekanisme, forventes det at virkningen av sActRIIa primært skyldes en aktivinantagoniserende virkning, ut fra den svært kraftige aktivinbindingen (pikomolar dissosiasjonskonstant) som vises av den spesielle sActRIIa-konstruksjon som ble anvendt i disse undersøkelsene. Uavhengig av mekanismen er det ut fra resultatene som presenteres heri åpenbart at ActRIIa-aktivin-antagonister faktisk øker bentettheten i normale mus, i musemodeller for osteoporose og i en musemodell for multiple myelomer. Det skal bemerkes at ben er et dynamisk vev, med vekst og krymping og forhøyet eller redusert tetthet avhengig av en balanse mellom faktorer som danner ben og stimulerer mineralisering (hovedsakelig osteoblaster) og faktorer som nedbryter og demineraliserer ben (hovedsakelig osteoklaster). Vekst og mineralisering av ben kan forhøyes ved å øke de produktive faktorene, ved å redusere de destruktive faktorene eller begge disse. Begrepene "fremme benvekst" og "øke benmineralisering" viser til de fysiske endringene i ben og er ment å være nøytrale når det gjelder mekanismene ved hvilke endringer i ben skjer.

Musemodellene for osteoporose og benvekt/-tetthet som ble anvendt i undersøkelsene som beskrives heri anses å være svært prediktive når det gjelder virkning i mennesker, og derfor kan ActRIIa-polypeptider og andre aktivin-ActRIIa-antagonister anvendes for fremme av benvekst og økning av bentetthet i mennesker. Aktivin-ActRIIa-antagonister omfatter for eksempel aktivinbindende, løselige ActRIIa-polypeptider, antistoffer som bindes til aktivin (særlige aktivin A- eller B-subenheterne, også betegnet β A eller β B) og forstyrrer binding av ActRIIa, antistoffer som bindes til ActRIIa og forstyrrer aktivinbindingen, ikke-antistoffproteiner som er utvalgt for aktivin- eller ActRIIa-binding (se f. eks. WO/2002/088171, WO/2006/055689 og WO/2002/032925 for eksempler på slike proteiner og fremgangsmåter for utforming og utvelgelse av slike ikke-antistoffbaserte, affinitetsbindende reagenser) og randomiserte peptider utvalgt for aktivin- eller ActRIIa-binding, ofte festet til et Fc-domene. To

forskjellige proteiner (eller andre grupper) med aktivin- eller ActRIIa-bindende aktivitet, fortrinnsvis aktivinbindere som blokkerer bindingssetene for type I (f. eks. en løselig type I-aktivinreseptor) henholdsvis type II (f. eks. en løselig type II-aktivinreseptor) kan kobles sammen, slik at det dannes et bifunksjonelt bindingsmolekyl.

5 Nukleinsyreaptamerer, små molekyler og andre midler som inhiberer aktivin-ActRIIa-signaliseringsaksen. Forskjellige proteiner har aktivin-ActRIIa-antagonistisk aktivitet, innbefattet inhibin (dvs. inhibin-alfa-subenhet), selv om inhibin ikke universelt antagoniserer aktivin i alle vev, follistatin (f. eks. follistatin-288 og follistatin-315), FSRP, aktivin C, alfa(2)-makroglobulin og et aktivin A med en M108A (metionin til alanin i posisjon 108)-mutasjon. Generelt kan alternative former av aktivin, fortrinnsvis 10 former med endringer i type I-reseptorbindingsdomenet, binde til type II-reseptorer uten å kunne danne et aktivt ternært kompleks, slik at de virker som antagonister. I tillegg kan nukleinsyrer, for eksempel antisense-molekyler, siRNA eller ribozymmer, som inhiberer aktivin A-, B-, C- eller E-ekspresjon, eller fortrinnsvis ActRIIa- 15 ekspresjon, anvendes som aktivin-ActRIIa-antagonister. Fortrinnsvis vil aktivin-ActRIIa-antagonisten som skal anvendes vise selektivitet for inhibering av aktivin-formidlet signalisering fremfor andre medlemmer av TGF-beta-familien, særlig når det gjelder GDF8 og GDF11. Løselige ActRftb-proteiner bindes til aktivin, villtype-proteinet viser imidlertid ikke signifikant selektivitet for binding til aktivin fremfor 20 GDF8/11, og innledende forsøk tyder på at dette proteinet ikke gir de ønskede virkninger på ben, samtidig som det også fører til en vesentlig muskelvekst. Endrede former av ActRIIb med forskjellige bindingsegenskaper har imidlertid blitt påvist (se f. eks. WO 2006/012627 s. 55-59, og disse proteinene kan kanskje oppnå de ønskelige virkningene på ben. Nativt eller endret ActRIIb kan tilføres spesifisitet for aktivin ved 25 kobling til et andre, aktivinselektivt bindingsmiddel.

Begrepene som anvendes i denne beskrivelsen har generelt sin vanlige betydning innen faget, i sammenheng med den foreliggende oppfinnelse og i den spesifikke sammenheng i hvilken hvert begrep anvendes. Visse begreper diskuteres nedenfor eller annensteds i beskrivelsen for å gi ytterligere rettledning til utøveren i 30 beskrivelsen av sammensetningene og fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen og hvordan de skal fremstilles og anvendes.

”Tilnærmet” og ”omtrent” skal generelt bety en akseptabel grad av feil for den målte mengden, gitt målingenes natur eller presisjon. Eksempler på grader av feil er typisk innenfor 20 prosent (%), fortrinnsvis innenfor 10 % og mer foretrukket innenfor 35 5 % fra en gitt verdi eller et gitt verdiområde.

Alternativt, og spesielt i biologiske systemer, kan begrepene ”tilnærmet” og ”omtrent” bety verdier som ligger innenfor én størrelsesorden, fortrinnsvis innenfor 5 ganger og mer foretrukket innenfor 2 ganger av en gitt verdi. Numeriske kvantiteter

som gis heri er tilnærmede med mindre annet er angitt, hvilket vi si at begrepet "tilnærmet" eller "omtrent" kan antas når det ikke spesifikt er uttrykt.

Sekvenser kan sammenlignes med hverandre, innbefattet villtypesekvens med en eller flere mutanter (sekvensvarianter). Slike sammenligninger omfatter typisk sammenstillinger av polymersekvenser, f. eks. anvendelse av sekvenssammenstillingsprogrammer og/eller -algoritmer som er velkjente innen faget (for eksempel BLAST, FASTA og MEGALIGN, for å nevne noen få). Den erfarne fagperson vil lett forstå at i slike sammenstillinger, dersom en mutasjon omfatter insersjon eller delesjon av en rest, vil sekvenssammenstillingen innføre et "gap" (typisk representert med en tankestrek eller "A") i polymersekvensen som ikke inneholder den innsatte eller deleterte rest.

"Homolog" viser i alle sine grammatiske former og stavevarianter til sammenhengen mellom to proteiner som har et "felles evolusjonært opphav", deriblant proteiner fra superfamilier i samme organismeart, så vel som homologe proteiner fra forskjellige organismearter. Slike proteiner (og nukleinsyrene som koder for dem) har sekvenshomologi, som gjenspeilet i deres sekvenslikhet, enten uttrykt som prosent identitet eller ved nærvær av spesifikke rester eller motiver og konserverte posisjoner.

Begrepet "sekvenslikhet" viser i alle sine grammatikalske former til graden av identitet eller samsvar mellom nukleinsyre- eller proteinsekvenser som har eller ikke har et felles evolusjonært opphav.

I vanlig bruk og i den foreliggende søknad kan imidlertid begrepet "homolog" når det er modifisert med et adverb, for eksempel "svært", vise til sekvenslikhet, og det kan, men må ikke vise til et felles evolusjonært opphav.

2. ActRIIa-polypeptider

Som anvendt heri viser begrepet "ActRIIa" til en familie av aktivinreseptor type IIa (ActRIIa)-proteiner fra hvilken som helst art og varianter avledet fra slike ActRIIa-proteiner ved mutagenese eller annen modifisering. Henvisning til ActRIIa heri skal forstås å være en henvisning til hvilken som helst av de for tiden identifiserte formene. Medlemmer av ActRIIa-familien er generelt transmembranproteiner som består av et ligandbindende ekstracellulært domene med et cysteinrikt område, et transmembrandomene og et cytoplasmatisk domene med prediktert serin/treoninkinaseaktivitet.

Begrepet "ActRIIa-polypeptid" omfatter polypeptider som omfatter hvilket som helst naturlig forekommende polypeptid fra et ActRIIa-familiemedlem, så vel som hvilke som helst varianter av dette (deriblant mutanter, fragmenter, fusjoner og peptidomimetiske former) som fortsatt har en anvendbar aktivitet. For eksempel omfatter ActRIIa-polypeptider polypeptider avledet fra sekvensen til hvilket som helst kjent ActRIIa med en sekvens som er minst tilnærmet 80 % identisk med sekvensen til et ActRIIa-polypeptid, og fortrinnsvis med minst 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % eller

høyere identitet. For eksempel kan et ActRIIa-polypeptid ifølge oppfinnelsen bindes til og inhibere funksjonen av et ActRIIa-protein og/eller aktivin. Et ActRIIa-polypeptid kan fremme benvekst og benmineralisering. Eksempler på ActRIIa-polypeptider omfatter humant ActRIIa-forløperpolypeptid (SEKV. ID. NR. 1) og løselige humane ActRIIa-polypeptider (f. eks. SEKV. ID. NR. 2, 3, 7 og 12).

Sekvensen til det humane ActRIIa-forløperprotein er som følger:

MGAAAKLFAVFLISCSSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEP
CYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSP
EVYFCCCEGNMCNEKFSYFP**EMEVTQPTSNPVTPKPPYYNILLSLVPL**
MLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLVPTQDPGPPPPSPLLGLKPLQLE
VKARGRFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEVYSLPGMKHEN
ILQFIGAEKRGTSVDVDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVVSWNELCHIAE
TMARGLAYLHEDI PGLKDGHKPAISHRDIKSKNVLLKNNLTACIADFG
ALKFEAGKSAGDTHGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGL
VLWELASRCTAADGPVDEYMLPFEEEIGQHPSLEDMQEVVVHKKKRPVL
RDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMQRLTNIIT
TEDIVTVVTMTNVDFPPKESSL (SEKV. ID. NR. 1)

Signalpeptidet har enkel understrekning, det ekstracellulære domenet er i uthevet skrift og de mulige setene for N-koblet glykosylering er dobbelt understreket.

Sekvensen til humant ActRIIa løselig, prosessert polypeptid er som følger:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISG
SIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP
EMEVTQPTSNPVTPKPP (SEKV. ID. NR. 2)

Den C-terminale "halen" i det ekstracellulære domenet er understreket. Sekvensen med deletert "hale" (en $\Delta 15$ -sekvens) er som følger:

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISG
SIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP
EM (SEKV. ID. NR 3)

Nukleinsyresekvensen som koder for humant ActRIIa-forløperprotein er som følger (nukleotidene 164-1705 i Genbank post NM_001616):

ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGCCGTCCTTCTTATCTCCTGTTCTTCAGGTGC
TATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAG
ACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGTAACCGTGTTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCAT
TGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCATTGAAATAGTGAAACAAGGTTGTTG

GCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTG
 AAGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCA
 GAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCCTATTACAA
 CATCCTGCTCTATTCCCTTGGTGCCACTTATGTTAATTGCGGGGATTGTCATTTGTGCAT
 TTTGGGTGTACAGGCATCACAAGATGGCCTACCCTCCTGTACTTGTTCCTCAACTCAAGAC
 CCAGGACCACCCCCACCTTCTCCATTACTAGGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAAGT
 GAAAGCAAGGGGAAGATTTGGTTGTGTCTGGAAAGCCCAGTTGCTTAACGAATATGTGG
 CTGTCAAAATATTTCCAATACAGGACAAACAGTCATGGCAAAATGAATACGAAGTCTAC
 AGTTTGCCTGGAATGAAGCATGAGAACATATTACAGTTCATTGGTGCAGAAAAACGAGG
 CACCAGTGTGATGTGGATCTTTGGCTGATCACAGCATTTCATGAAAAGGGTTCACTAT
 CAGACTTTC7TAAGGCTAATGTGGTCTCTTGGAAATGAACTGTGTCTATTTGCAGAAACC
 ATGGCTAGAGGATTGGCATATTTACATGAGGATATACCTGGCCTAAAAGATGGCCACAA
 ACCTGCCATATCTCACAGGGACATCAAAAGTAAAAATGTGCTGTTGAAAAACAACCTGA
 CAGCTTGCATTGCTGACTTTGGGTTGGCCTTAAATTTGAGGCTGGCAAGTCTGCAGGC
 GATACCCATGGACAGGTTGGTACCCGGAGGTACATGGCTCCAGAGGTATTAGAGGGTGC
 TATAAACTTCCAAAGGGATGCATTTTTGAGGATAGATATGTATGCCATGGGATTAGTCC
 TATGGGAACCTGGCTTCTCGCTGTACTGCTGCAGATGGACCTGTAGATGAATACATGTTG
 CCATTTGAGGAGGAAATTGGCCAGCATCCATCTCTTGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGT
 GCATAAAAAAAGAGGCCTGTTTTAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGAATGGCAA
 TGCTCTGTGAAACCATTGAAGAATGTTGGGATCACGACGCAGAAGCCAGGTTATCAGCT
 GGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCAGAGACTAACAAATATTATTACCACAGA
 GGACATTGTAACAGTGGTCACAATGGTGACAAATGTTGACTTTCCTCCCAAAGAATCTA
 GTCTATGA (SEKV. ID. NR. 4)

Nukleinsyressekvensen som koder for et løselig (ekstracellulært) humant ActRIIa-polypeptid er som følger:

ATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGA
 CAGAACCAATCAAACCTGGTGTGTAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATT
 GTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCCATTGAAATAGTGAAACAAGGTGTTGG
 CTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGACAGCCCTGA
 AGTATATTTTTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCAG
 AGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCC
 (SEKV. ID. NR. 5)

Som beskrevet her viser begrepet "løselig ActRIIa-polypeptid" generelt
 5 til polypeptider som omfatter et ekstracellulært domene fra et ActRIIa-protein.
 Begrepet "løselig ActRIIa-polypeptid" som det anvendes heri, omfatter ethvert naturlig
 forekommende ekstracellulært domene fra et ActRIIa-protein, så vel som alle varianter

av dette (omfattende mutanter, fragmenter og peptidomimetiske former). Et aktivin-bindende ActRIIa-polypeptid er et polypeptid som har bevart evnen til å binde til aktivin, fortrinnsvis aktivin AA, AB eller BB. Fortrinnsvis vil et aktivinbindende ActRIIa-polypeptid bindes til aktivin AA med den dissosiasjonskonstant på 1 nM eller lavere. Aminosyresekvenser fra humant ActRIIa-forløperprotein gis nedenfor. Det ekstracellulære domenet fra et ActRIIa-protein bindes til aktivin og er generelt løselig, og kan derfor betegnes et løselig, aktivinbindende ActRIIa-polypeptid. Eksempler på løselige, aktivinbindende ActRIIa-polypeptider omfatter det løselige polypeptid som er vist i SEKV. ID. NR. 2, 3, 7, 12 og 13. SEKV. ID. NR. 7 betegnes ActRIIa-hFc og beskrives videre i Eksempelene Andre eksempler på løselige, aktivinbindende ActRIIa-polypeptider omfatter en signalsekvens i tillegg til det ekstracellulære domenet fra et ActRIIa-protein, for eksempel ledersekvensen fra mellitin fra honningbie (SEKV. ID. NR. 8), ledersekvensen fra vevsplasminogenaktivator (TPA) (SEKV. ID. NR. 9) eller den native ActRIIa-leadersekvens (SEKV. ID. NR. 10). ActRIIa-hFc-polypeptidet som er vist i SEKV. ID. NR. 13 anvender en TPA-leadersekvens.

Funksjonelt aktive fragmenter av ActRIIa-polypeptider kan erholdes ved å gjennomføre polypeptider som er rekombinant fremstilt fra det tilsvarende fragment av nukleinsyren som koder for et ActRIIa-polypeptid. I tillegg kan fragmenter syntetiseres kjemisk ved anvendelse av teknikker som er kjente innen faget, for eksempel konvensjonell Merrifield fast fase f-Moc- eller t-Boc-kjemi. Fragmentene kan fremstilles (rekombinant eller ved kjemisk syntese) og analyseres for å påvise de peptidylfragmentene som kan fungere som antagonister (inhibitorer) av ActRIIa-protein eller signalisering formidlet av aktivin.

Funksjonelt aktive varianter av ActRIIa-polypeptider kan erholdes ved å gjennomføre biblioteker av modifiserte polypeptider som er rekombinant fremstilt fra de tilsvarende, mutageniserte nukleinsyrene som koder for et ActRIIa-polypeptid. Variantene kan fremstilles og analyseres for å påvise dem som kan fungere som antagonister (inhibitorer) av ActRIIa-protein eller signalisering formidlet av aktivin. En funksjonell variant av ActRIIa-polypeptidene kan omfatte en aminosyresekvens som er minst 75 % identisk med en aminosyresekvens utvalgt blant SEKV. ID. NR. 2 eller 3. I visse tilfeller har den funksjonelle varianten en aminosyresekvens som er minst 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % eller 100 % identisk med en aminosyresekvens utvalgt blant SEKV. ID. NR. 2 eller 3.

Funksjonelle varianter kan frembringes ved å modifisere strukturen til et ActRIIa for slike formål som å forbedre den terapeutiske virkning eller stabiliteten (f. eks. holdbarheten *ex vivo* og resistensen mot proteolytisk degradering *in vivo*). Slike modifiserte ActRIIa-polypeptider anses dersom de er utvalgt til å bevare aktivinbindingen som funksjonelle ekvivalenter av de naturlig forekommende ActRIIa-polypeptidene. Modifiserte ActRIIa-polypeptider kan også for eksempel fremstilles ved

aminosyresubstitusjon, -delesjon eller -addisjon. Det er for eksempel rimelig å forvente at en isolert utskiftning av leucin med isoleucin eller valin, av aspartat med glutamat, av treonin med serin eller en tilsvarende utskiftning av en aminosyre med en strukturelt beslektet aminosyre (f. eks. konservative mutasjoner) ikke vil ha en vesentlig virkning på det resulterende molekyls biologiske aktivitet. Konservative utskiftninger er

5 utskiftninger som finner sted innen en familie av aminosyrer som har sidekjeder som ligner hverandre. Hvorvidt en endring i aminosyresekvensen til aii ActRIIa-polypeptid fører til en funksjonell homolog kan lett fastslås ved å vurdere ActRIIa-polypeptid-variantens evne til å gi en respons i celler på en måte som ligner på villtype-ActRIIa-

10 polypeptidets.

Spesifikke mutasjoner kan omfattes i ActRIIa-polypeptidene for å endre polypeptidets glykosylering. Slike mutasjoner kan utvelges slik at de innfører eller fjerner et eller flere glykosylerings seter, for eksempel seter for **O-koblet** eller N-koblet glykosylering. Gjenkjennings seter for asparaginkoblet glykosylering omfatter generelt

15 en tripeptidsekvens, asparagin-X-treonin (eller asparagin-X-serin) (hvor "X" er hvilken som helst aminosyre) som spesifikt gjenkjennes av formålstjenlige cellulære glykosylerings enzymer. Endringen kan også innføres ved addisjon eller substitusjon av en eller flere serin- eller treoninrester til sekvensen til villtype-ActRIIa-polypeptidet (for seter for O-koblet glykosylering). En rekke forskjellige aminosyresubstitusjoner eller -

20 delesjoner i en eller begge av den første eller tredje aminosyreposisjon i et glykosyleringsgjenkjennings sete (og/eller aminosyredelesjon i posisjon to) fører til at den modifiserte tripeptidsekvensen ikke glykosyleres. En annen måte å øke antallet av karbohydratgrupper på et ActRIIa-polypeptid på er ved kjemisk eller enzymatisk kobling av glykosider til ActRIIa-polypeptidet. Avhengig av den benyttede koblings-

25 måten kan sukkeret eller sukkerene kobles til (a) arginin og histidin, (b) frie karboksylgrupper, (c) frie sulfhydrylgrupper, for eksempel i cystein, (d) frie hydroksylgrupper, for eksempel i serin, treonin eller hydroksyprolin, (e) aromatiske rester, for eksempel i fenylalanin, tyrosin eller tryptofan, eller (f) amidgruppen i glutamin. Disse metodene beskrives i WO 87/05330, offentliggjort 11. september 1987, og i Aplin og Wriston

30 (1981) CRC Crit. Rev. Biochem. s. 259-306. Fjerning av en eller flere karbohydratgrupper som foreligger på et ActRIIa-polypeptid kan oppnås kjemisk og/eller enzymatisk. Kjemisk deglykosylering kan for eksempel omfatte behandling av ActRIIa-polypeptidet med forbindelsen trifluormetansulfonsyre eller en ekvivalent forbindelse. Denne behandlingen fører til avspalting av de fleste eller alle sukkere

35 bortsett fra det tilkoblede sukkeret (N-acetylglukosamin eller N-acetylgalaktosamin), mens aminosyresekvensen forblir intakt Kjemisk deglykosylering beskrives mer utførlig av Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 og av Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131. Enzymatisk avspalting av karbohydratgrupper på ActRIIa-polypeptider kan oppnås ved anvendelse av en rekke forskjellige endo- og

eksoglykosidaser, som beskrevet av Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. Sekvensen til et ActRIIa-polypeptid kan justeres på egnet vis, avhengig av typen av ekspresjonssystem som benyttes, siden pattedyrceller, gjærceller, insektceller og planteceller alle kan innføre forskjellige glykosyleringsmønstre som kan påvirkes av peptidets aminosyresekvens. Generelt vil ActRIIa-proteiner for anvendelse i mennesker uttrykkes i en pattedyrcellelinje som sørger for korrekt glykosylering, for eksempel HEK293 eller CHO-cellelinjer, selv om andre pattedyrcellelinjer for ekspresjon, gjær-cellelinjer med modifiserte glykosyleringsenzymer og insektceller også forventes å være anvendbare.

Heri beskrives en fremgangsmåte for frembringelse av mutanter, nærmere bestemt sett av kombinatoriske mutanter, av et ActRIIa-polypeptid, så vel som avkortede mutanter; samlinger av kombinatoriske mutanter er spesielt nyttige for påvisning av funksjonelle sekvensvarianter. Formålet med å gjennomføre slike kombinatoriske biblioteker kan for eksempel være å frembringe ActRIIa-polypeptid-varianter som kan virke som enten agonister eller antagonist, eller alternativt varianter som besitter fullstendig nye aktiviteter. En rekke forskjellige gjennomføringsanalyser tilveiebringes nedenfor, og slike analyser kan anvendes for evaluering av varianter. For eksempel kan en ActRIIa-polypeptidvariant analyseres for evne til å bindes til en ActRIIa-ligand, til å forhindre binding av en ActRIIa-ligand til et ActRIIa-polypeptid eller til å forstyrre signaliseringen som en ActRIIa-ligand forårsaker.

Aktiviteten til et ActRIIa-polypeptid eller dets varianter kan også analyseres i en cellebasert analyse eller *in vivo*-analyse. For eksempel kan man anslå virkningen av en ActRIIa-polypeptidvariant på ekspresjonen av gener som deltar i dannelsen eller nedbrytning av ben. Dette kan etter behov utføres i nærvær av et eller flere rekombinante ActRIIa-ligandproteiner (f. eks. aktivin), og celler kan transfekteres slik at de produserer et ActRIIa-polypeptid og/eller varianter av dette, og om ønskelig en ActRIIa-ligand. Likeså kan et ActRIIa-polypeptid tilføres til en mus eller et annet dyr, og en eller flere egenskaper av ben, for eksempel tetthet eller volum, kan evalueres. Hastigheten som benbrudd heles med kan også evalueres. Dobbeltenergi røntgenabsorpsjonsmåling (DEXA - dual-energy X-ray absorptiometry) er en veletablert, ikke-invasiv, kvantitativ teknikk for evaluering av bentetthet i perifere ben, deriblant for eksempel ben i hånd, håndledd, ankel og fot. Tradisjonelle røntgenbildesystemer, deriblant CAT-skann, kan anvendes for evaluering av benvekst og heling av benbrudd. Den mekaniske styrken av ben kan også evalueres.

Det kan frembringes kombinatorisk avlede varianter som har en selektiv eller generelt forhøyet aktivitet sammenlignet med et naturlig forekommende ActRIIa-polypeptid. Likeså kan mutagenese gi opphav til varianter som har en intracellulær halveringstid som er dramatisk forskjellig fra den til den tilsvarende villtype-ActRIIa-polypeptid. For eksempel kan det endrede protein gjøres enten mer stabilt eller mindre

stabil overfor proteolytisk degradering eller andre cellulære prosesser som fører til ødeleggelse eller inaktivering på annet vis av et nativt ActRIIa-polypeptid. Slike varianter og genene som koder for dem kan benyttes for å endre nivået av ActRIIa-polypeptid ved å modulere ActRIIa-polypeptidenes halveringstid. For eksempel kan en kort halveringstid gi opphav til mer forbigående biologiske virkninger og tillate en tettere kontroll av nivået av rekombinant ActRIIa-polypeptid i pasienten. I et Fc-fusjonsprotein kan mutasjoner innføres i linkerens (dersom den foreligger) og/eller i Fc-delen for å endre proteinets halveringstid.

Et kombinatorisk bibliotek kan fremstilles ved hjelp av et degenerert bibliotek av gener som koder for et bibliotek av polypeptider som alle omfatter i det minst en del av mulige ActRIIa-polypeptidsekvenser. Man kan for eksempel enzymatisk ligere en blanding av syntetiske oligonukleotider inn i gensekvenser slik at det degenererte settet av nukleotidsekvenser som koder for mulige ActRIIa-polypeptider kan uttrykkes som enkeltvis polypeptider, eller alternativt som et sett av større fusjonsproteiner (f. eks. for fag-display).

Det finnes mange måter for frembringelse av biblioteket av mulige homologer fra en degenerert oligonukleotidsekvens. Kjemisk syntese av en degenerert gensekvens kan utføres i et automatisert DNA-synteseinstrument og de syntetiske genene så liggeres inn i en egnet vektor for ekspresjon. Syntese av degenererte oligonukleotider er velkjent innen faget (se for eksempel Narang, SA (1983) Tetrahedron 39:3, Itakura et al., (1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, red. AG Walton, Amsterdam: Elsevier s- 273-289, Itakura et al., (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323, Itakura et al., (1984) Science 198:1056, Ike et al., (1983) Nucleic Acid Res. 11:477). Slike teknikker har blitt benyttet for styrt evolusjon av andre proteiner (se for eksempel Scott et al., (1990) Science 249:386-390, Roberts et al., (1992) PNAS USA 89:2429-2433, Devlin et al., (1990) Science 249: 404-406, Cwirla et al., (1990) PNAS USA 87: 6378-6382, så vel som U.S. Patentskrift nr. 5223409, 5198346 og 5096815).

Alternativt kan andre former for mutagenese benyttes for frembringelse av et kombinatorisk bibliotek. For eksempel kan ActRIIa-polypeptidvarianter frembringes og isoleres fra et bibliotek ved gjennomsøking ved anvendelse av for eksempel alanin-skannende mutagenese og lignende (Ruf et al., (1994) Biochemistry 33:1565-1572, Wang et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:3095-3099, Balint et al., (1993) Gene 137:109-118, Grodberg et al., (1993) Eur. J. Biochem. 218:597-601, Nagashima et al., (1993) J. Biol. Chem. 268:2888-2892, Lowman et al., (1991) Biochemistry 30:10832-10838 og Cunningham et al., (1989) Science 244:1081-1085), ved linkerskannende mutagenese (Gustin et al., (1993) Virology 193:653-660, Brown et al., (1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652, McKnight et al., (1982) Science 232:316), ved metningsmutagenese (Meyers et al., (1986) Science 232:613), ved PCR-mutagenese (Leung et al., (1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19) eller ved randomisert mutagenese, deriblant

kjemisk mutagenese, osv. (Miller et al., (1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSH L Press, Cold Spring Harbor, NY og Greener et al., (1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34). Linker-skannende mutagenese er, særlig i en kombinatorisk sammenheng, en interessant fremgangsmåte for påvisning av avkortede (bioaktive) former av ActRIIa-polypeptider.

Et bredt utvalg av teknikker er kjente innen faget for analyse av genprodukter fra kombinatoriske biblioteker fremstilt ved punktmutasjoner og avkortninger, og for den saks skyld for gjennom søkning av cDNA-biblioteker etter genprodukter med en gitt egenskap. Slike teknikker vil generelt kunne tilpasses hurtig gjennom søkning av genbibliotekene frembrakt ved kombinatorisk mutagenese av ActRIIa-polypeptider. De hyppigst benyttede teknikkene for gjennom søkning av store genbiblioteker omfatter typisk kloning av genbiblioteket i replikerbare ekspresjonsvektorer, transformasjon av egnede celler med det resulterende vektorbibliotek og ekspresjon av de kombinatoriske genene under betingelser ved hvilke påvisning av en ønskelig aktivitet muliggjør relativt enkel isolering av vektoren som koder for genet hvis produkt ble påvist. Foretrukne analyser omfatter aktivbindeingsanalyser og analyse av aktivinformidlet celledisignalisering.

ActRIIa-polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan videre omfatte posttranslasjonelle modifikasjoner i tillegg til dem som naturlig foreligger i ActRIIa-polypeptidene. Slike modifikasjoner omfatter, men er ikke begrenset til, acetylering, karboksylering, glykosylering, fosforylering, lipidering og acylering. Som et resultat kan de modifiserte ActRIIa-polypeptidene inneholde ikke-aminosyre-bestanddeler, for eksempel polyetylenglykoler, lipider, poly- eller monosakkarid og fosfater. Virkningene av slike ikke-aminosyre-bestanddeler på funksjonaliteten av et ActRIIa-polypeptid kan analyseres som beskrevet heri for andre ActRIIa-polypeptidvarianter. Dersom et ActRIIa-polypeptid fremstilles i celler ved å spalte en nysyntetisert form av ActRIIa-polypeptidet, kan posttranslasjonell prosessering også være viktig for korrekt folding og/eller funksjon av proteinet. Forskjellige celler (som CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3t3 eller HEK293) har et spesifikt cellulært maskineri og karakteristiske mekanismer for slike posttranslasjonelle aktiviteter og kan velges slik at korrekt modifisering og prosessering av ActRIIa-polypeptidene sikres.

Funksjonelle varianter eller modifiserte former av ActRIIa-polypeptidene kan omfatte fusjonsproteiner som har i det minste en del av ActRIIa-polypeptidene og et eller flere fusjonsdomener. Velkjente eksempler på slike fusjonsdomener omfatter, men er ikke begrenset til, polyhistidin, Glu-Glu, glutathion S transferase (GST), tioredoksin, protein A, protein G, et konstant område fra en immunoglobulin-tungkjede (Fc), maltosebindende protein (MPB) eller humant serumalbumin. Et fusjonsdomene kan utvelges for innføring av en ønskelig egenskap. For eksempel er noen fusjonsdomener spesielt nyttige for isolering av fusjonsproteinene ved affinitetskromatografi. For

affinitetskromatografi anvendes relevante medier for affinitetskromatografi, for eksempel resiner konjugert til glutation, amylase og nikkel eller kobolt. Mange slike medier er tilgjengelige i form av "sett", for eksempel Pharmacia GST-rencesystemet og QIAexpress™-systemet (Qiagen), som er anvendbart for (HIS₆)-fusjonspartnere. Som et annet eksempel kan et fusjonsdomene utvelges for å forenkle påvisningen av ActRIIa-polypeptidene. Eksempler på slike deteksjonsdomener omfatter de forskjellige fluorescerende proteinene (f. eks. GFP), så vel som "epitopetag", som vanligvis er korte peptidsekvenser for hvilke et spesifikt antistoff er tilgjengelig. Velkjente epitop-etag-er for hvilke spesifikke monoklonale antistoffer er lett tilgjengelige omfatter FLAG, hemagglutinin (HA) fra influensavirus og c-myc-tag. I noen tilfeller har fusjonsdomenene et spaltingssete for en protease, for eksempel faktor Xa eller trombin, som gjør det mulig for den relevante proteasen å delvis spalte fusjonsproteinene og på den måten frigjøre de rekombinante proteinene. De frigjorte proteinene kan så isoleres fra fusjonsdomenet ved påfølgende kromatografisk separasjon. Et ActRIIa-polypeptid kan fusjoneres til et domene som stabiliserer ActRIIa-polypeptidet *in vivo* (et "stabilisator"-domene). Med "stabilisere" menes hva som helst som forlenger halveringstiden i serum, uavhengig av om dette skyldes redusert nedbrytning, reduser clearance gjennom nyrene eller en annen farmakokinetisk virkning. Fusjoner med Fc-delen av et immunglobulin vites å gi ønskelige farmakokinetiske egenskaper til et bredt utvalg av proteiner. Likeså kan fusjoner til humant serumalbumin gi ønskelige egenskaper. Andre typer av fusjonsdomener som kan velges omfatter multimeriserende (f. eks. dimeriserende, tetrameriserende) domener og funksjonelle domener (som innfører en ekstra biologisk funksjon, for eksempel videre stimulering av benvekst eller muskelvekst etter ønske).

Som et spesifikt eksempel kan et fusjonsprotein omfatte et løselig, ekstracellulært domene fra ActRIIa fusjonert til et Fc-domene (f. eks. SEKV. ID. NR. 6).
 THTCPPEPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD(A)VSHEDEPEVK
 ENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A)
 VSNKALPVPKEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGPFFLYSKLTVDKSRWQQGMVFCFSVMH
 EALHN(A)HYTQKSLSLSPGK*

Om ønskelig har Fc-domenet en eller flere mutasjoner i aminosyrerester som Asp-265, lysin 322 og Asn-434. I visse tilfeller har det mutante Fc-domenet med en eller flere av disse mutasjonene (f. eks. Asp-265-mutasjon) redusert evne til å bindes til Fcy-reseptoren, sammenlignet med et villtype-Fc-domene. I andre tilfeller har det mutante Fc-domenet med en eller flere av disse mutasjonene (f. eks. Asn-434-mutasjon) økt evne til å bindes til MHC klasse I-relatert Fc-reseptor (FcRN), sammenlignet med et villtype-Fc-domene.

Det skal forstås at forskjellige elementer i fusjonsproteinene kan være arrangert på hvilken som helst måte som er i samsvar med den ønskede funksjonalitet. For eksempel kan et ActRIIa-polypeptid være plassert C-terminalt for et heterologt domene, eller alternativt kan et heterologt domene være plassert C-terminalt for et ActRIIa-domene. ActRIIa-polypeptiddomenet og det heterologe domenet må ikke nødvendigvis ligge i nabostilling til hverandre i et fusjonsprotein, og andre domener eller aminosyresekvenser kan inngå C- eller N-terminalt for hvilket som helst av domene eller mellom domene.

I visse utførelser inneholder ActRIIa-polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse en eller flere modifikasjoner som kan stabilisere ActRIIa-polypeptidene. Slike modifikasjoner kan for eksempel forbedre *in vitro*-halveringstiden for ActRIIa-polypeptidene, forbedre halveringstiden i sirkulasjonen for ActRIIa-polypeptidene eller redusere proteolytisk degradering av ActRIIa-polypeptidene. Slike stabiliserende modifikasjoner omfatter, men er ikke begrenset til, fusjonsproteiner (deriblant for eksempel fusjonsproteiner som omfatter et ActRIIa-polypeptid og et stabilisator-domene), modifikasjoner av et glykosyleringssete (innbefattet for eksempel addisjon av et glykosyleringssete til et ActRIIa-polypeptid) og modifikasjoner av karbohydratgruppen (innbefattet for eksempel fjerning av karbohydratgrupper fra et ActRIIa-polypeptid). Når det gjelder fusjonsproteiner er et ActRIIa-polypeptid fusjonert til et stabilisator-domene, for eksempel et IgG-molekyl (f. eks. et Fc-domene). Som anvendt heri viser begrepet "stabilisator-domene" ikke bare til et fusjonsdomene (f. eks. Fc), som i tilfellet fusjonsproteiner, med omfatter også ikke-proteinbaserte modifikasjoner, for eksempel en karbohydratgruppe eller en ikke-proteinbasert polymer, for eksempel polyetylglykol.

Isolerte og/eller rensede former av ActRIIa-polypeptidene kan være isolert fra eller på annet vis i det vesentlige frie for andre proteiner. ActRIIa-polypeptider vil generelt være fremstilt ved ekspresjon fra rekombinante nukleinsyrer.

3. Nukleinsyrer som koder for ActRIIa-polypeptider (ikke en del av oppfinnelsen)

Heri beskrives isolerte og/eller rekombinante nukleinsyrer som koder for hvilke som helst av ActRIIa-polypeptidene (f. eks. løselige ActRIIa-polypeptider), deriblant fragmenter, funksjonelle varianter og fusjonsproteiner, som beskrives heri. For eksempel koder SEKV. ID. NR. 4 for det naturlig forekommende humane ActRIIa-forløperpolypeptid, mens SEKV. ID. NR. 5 koder for det prosesserte ekstracellulære domene i ActRIIa. Nukleinsyrene det gjelder kan være enkeltrådede eller dobbelttrådede. Slike nukleinsyrer kan være DNA- eller RNA-molekyler. Disse nukleinsyrene kan for eksempel anvendes i fremgangsmåter for fremstilling av ActRIIa-polypeptider eller som direkte terapeutiske midler (f. eks. i en genterapitilnærming).

I visse aspekter skal det videre forstås at de angjeldende nukleinsyrener som koder for ActRIIa-polypeptider kan omfatte nukleinsyrer som er varianter av SEKV. ID. NR. 4 eller 5. Nukleotidsekvensvarianter omfatter sekvenser som er forskjellige grunnet en eller flere nukleotidsubstitusjoner, -addisjoner eller -delesjoner, for eksempel alleliske varianter.

Videre beskrives heri isolerte eller rekombinante nukleinsyresekvenser som er minst 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % eller 100 % identiske med SEKV. ID. NR. 4 eller 5. En person med alminnelige kunnskaper innen faget vil forstå at nukleinsyresekvenser som er komplementære til SEKV. ID. NR. 4 eller 5 og varianter av SEKV. ID. NR. 4 eller 5 kan tilveiebringes. Nukleinsyresekvensene som beskrives heri kan være isolerte, rekombinante og/eller fusjonert til en heterolog nukleotidsekvens, eller foreligge i et DNA-bibliotek.

Nukleinsyrer kan også omfatte nukleotidsekvenser som hybridiserer under betingelser med høy stringens til nukleinsyresekvensen som er spesifisert i SEKV. ID. NR. 4 eller 5 den komplementære sekvensen til SEKV. ID. NR. 4 eller 5 eller fragmenter av disse. Som diskutert ovenfor vil en person med alminnelige kunnskaper innen faget lett forstå at egnede stringensbetingelser som fremmer DNA-hybridisering kan varieres. En person med alminnelige kunnskaper innen faget vil lett forstå at egnede stringensbetingelser som fremmer DNA-hybridisering kan varieres. Man kan for eksempel utføre hybridiseringen i 6,0 x natriumklorid/natriumcitrat (SSC) ved tilnærmet 45 °C, fulgt av en vask med 2,0 x SSC ved 50 °C. For eksempel kan saltkonsentrasjonen i vasketrinnet utvelges fra en lav stringens med tilnærmet 2,0 x SSC ved 50 °C til høy stringens med tilnærmet 0,2 x SSC ved 50 °C. I tillegg kan temperaturen i vasketrinnet økes fra betingelser med lav stringens ved romtemperatur, tilnærmet 22 °C, til betingelser med høy stringens ved tilnærmet 65 °C. Både temperatur og salt kan varieres, eller temperatur eller saltkonsentrasjon kan holdes konstant mens den andre variabelen endres. Heri beskrives er nukleinsyrer som hybridiserer under betingelser med lav stringens, 6 x SSC ved romtemperatur fulgt av en vask med 2 x SSC ved romtemperatur.

Isolerte nukleinsyrer som er forskjellige fra nukleinsyrener som er beskrevet i SEKV. ID. NR. 4 eller 5 av den grunn at den genetiske kode er degenerert beskrives også heri. For eksempel spesifiseres en rekke aminosyrer av mer enn én tripplett. Kodoner som spesifiserer den samme aminosyren, eller synonymer (for eksempel er CAU og CAC synonymer for histidin) kan føre til "stille" mutasjoner som ikke påvirker proteinets aminosyresekvens. Det forventes imidlertid at DNA-sekvenspolymorfier som vil føre til endringer i aminosyresekvensene til de angjeldende proteiner vil forefinnes blant pattedyrceller. En fagperson vil forstå at disse variasjonene i et eller flere nukleotider (opp til tilnærmet 3-5 % av nukleotidene) i

nukleinsyrene som koder for et gitt protein kan foreligge blant individer av en gitt art, grunnet naturlig allelisk variasjon.

De rekombinante nukleinsyrene som beskrives heri kan være operativt koblet til en eller flere regulatoriske nukleotidsekvenser i en ekspresjonskonstruksjon.

5 Regulatoriske nukleotidsekvenser vil generelt være passende for vertscellen som anvendes for ekspresjon. En rekke typer av passende ekspresjonsvektorer og egnede regulatoriske sekvenser er kjente innen faget for et bredt utvalg av vertsceller. Typisk kan den eller de angjeldende regulatoriske nukleotidsekvensene omfatte, uten å være begrenset til, promotersekvenser, leder- eller signalsekvenser, ribosombindings seter, 10 transkripsjonsstart- og -termineringssekvenser, translasjonsstart- og -termineringssekvenser og enhancer- eller aktivatorsekvenser. Konstitutive eller induserbare promotere, som kjent innen faget, omfattes.

Promoterene kan enten være naturlig forekommende promotere eller hybride promotere som kombinerer elementer fra mer enn én promoter. En ekspresjons- 15 konstruksjon kan foreligge i en celle på et episom, for eksempel et plasmid, eller ekspresjonskonstruksjonen kan være innsatt i et kromosom. Ekspresjonsvektoren kan inneholde et selekterbart markørgen som tillater seleksjon av transformerte vertsceller. Selekterbare markørgener er velkjente innen faget og vil variere med den anvendte vertscelle.

20 Nukleinsyren kan foreligge i en ekspresjonsvektor som omfatter en nukleotidsekvens som koder for et ActRIIa-polypeptid og operativt koblet til minst én regulatorisk sekvens. Regulatoriske sekvenser er kjente innen faget og er utvalgt for å styre ekspresjonen av ActRIIa-polypeptidet. Begrepet regulatorisk sekvens omfatter følgelig promotere, enhancere og andre ekspresjonskontrollelementer. Eksempler på 25 regulatoriske sekvenser er beskrevet i Goeddel; Gene Expression Technology; Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). For eksempel kan hvilken som helst av et bredt utvalg av ekspresjonskontrollsekvenser som kontrollerer ekspresjonen av en DNA-sekvens når de er operativt koblet til den anvendes i disse vektorene for ekspresjon av DNA-sekvenser som koder for et ActRIIa-polypeptid. 30 Slike anvendbare ekspresjonskontrollsekvenser omfatter for eksempel den tidlige og sene promoter fra SV40, tet-promoteren, den umiddelbart tidlige promoter fra adenovirus eller cytomegalovirus, RSV-promotere, lac-systemet, trp-systemet, TAC- eller TRC-systemet, T7-promoteren, hvis ekspresjon styres av T7 RNA polymerase, hovedoperator- og -promoterområdene fra bakteriofag lambda, kontrollområdene for fd-kappeprotein, promoteren for 3-fosfoglycerat kinase eller andre glykolyseenzymer, 35 promotere for sur fosfatase, f. eks. Pho5, promotere for α -paringsfaktor fra gjær, polyhedronpromoteren fra baculovirussystemet og andre sekvenser som vites å kontrollere ekspresjonen av gener i prokaryote eller eukaryote celler, og forskjellige kombinasjoner av disse. Det skal forstås at utformingen av ekspresjonsvektoren kan

avhenge av faktorer som valg av vertscelle som skal transformeres og/eller typen av protein man ønsker å uttrykke. Videre bør vektorens kopitall, evnen til å kontrollere dette kopitallet og ekspresjonen av eventuelle andre proteiner som kodes av vektoren, for eksempel antibiotikamarkører, også tas i betraktning.

5 En rekombinant nukleinsyre kan fremstilles ved å ligere det klonede gen eller en del av det inn i en vektor som er egnet for ekspresjon i enten prokaryote celler, eukaryote celler (gjær, fugleceller, insektceller eller pattedyrceller) eller begge deler. Ekspresjonsbærere for fremstilling av et rekombinant ActRIIa-polypeptid omfatter plasmider og andre vektorer. Egnede vektorer omfatter for eksempel plasmider av
10 typene: pBR322-avledede plasmider, pEMBL-avledede plasmider, pEX-avledede plasmider, pBTac-avledede plasmider og pUC-avledede plasmider for ekspresjon i prokaryote celler, for eksempel *E. coli*.

Noen pattedyrsekspresjonsvektorer inneholder både prokaryote sekvenser for fremme av oppformering av vektoren i bakterier og en eller flere eukaryote
15 transkripsjonsenheter som uttrykkes i eukaryote celler. pcDNA/amp, pcDNAI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo og pHyg-avledede vektorer er eksempler på pattedyrsekspresjonsvektorer som er egnet for transfeksjon av eukaryote celler. Noen av disse vektorene er modifisert med sekvenser fra bakterieplasmider, for eksempel pBR322, for å muliggjøre replikasjon og
20 medikamentresistensseleksjon i både prokaryote og eukaryote celler. Alternativt kan derivater av virus som bovint papillomavirus (BPV-1) eller Epstein-Barr-virus (pHEBo, pREP-avledede og p205) anvendes for transient ekspresjon av proteiner i eukaryote celler. Eksempler på andre virale (inkludert retrovirale) ekspresjonssystemer kan finnes nedenfor i beskrivelsen av tilførselssystemer for genterapi. De forskjellige
25 fremgangsmåtene som benyttes for fremstilling av plasmidene og transformasjon av vertsorganismene er velkjente innen faget. For andre egnede ekspresjonssystemer for både prokaryote og eukaryote celler, så vel som for generelle rekombinante fremgangsmåter, se Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3. utgave, red. av Sambrook, Fritsch og Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). I noen tilfeller kan
30 det være ønskelig å uttrykke de rekombinante polyproteinene ved anvendelse av et baculovirus-ekspresjonssystem. Eksempler på slike baculovirus-ekspresjonssystemer omfatter pVL-avledede vektorer (som pVL1392, pVL1393 og pVL941), pAcUW-avledede vektorer (som pAcUW1) og pBlueBac-avledede vektorer (som den β -galholdige pBlueBac III).

35 En vektor kan være utformet for fremstilling av de angjeldende ActRIIa-polyproteinene i CHO-celler, for eksempel en Pcmv-Script-vektor (Stratagene, La Jolla, Calif.), pcDNA4-vektorer (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) og pCI-neo-vektorer (Promega, Madison, Wisc.). Det vil være åpenbart at de angjeldende genkonstruksjonene kan anvendes for å oppnå ekspresjon av de angjeldende ActRIIa-polyproteinene i celler som

oppformerer i kultur, f. eks. for fremstilling av proteiner, deriblant fusjonsproteiner eller proteinvarianter, for rensing.

Videre beskrives en vertscelle som er transfektert med et rekombinant gen som omfatter en kodende sekvens (f. eks. SEKV. ID. NR. 4 eller 5) for et eller flere av de angjeldende ActRIIa-polypeptidene. Vertscellen kan være hvilken som helst prokaryot eller eukaryot celle. For eksempel kan et ActRIIa-polypeptid uttrykkes i bakterieceller, for eksempel *E. coli*, insektceller (f. eks. ved anvendelse av et baculovirus-ekspresjonssystem), gjærceller eller pattedyrceller. Andre egnede vertsceller er kjente blant fagfolk.

Heri beskrives fremgangsmåter for fremstilling av de angjeldende ActRIIa-polypeptidene. For eksempel kan en vertscelle som er transfektert med en ekspresjonsvektor som koder for et ActRIIa-polypeptid dyrkes under betingelser som er egnede for ekspresjon av ActRIIa-polypeptidet. ActRIIa-polypeptidet kan utskilles og isoleres fra en blanding av celler og medium som inneholder ActRIIa-polypeptidet. Alternativt kan ActRIIa-polypeptidet beholdes i cytoplasma eller i en membranfraksjon, cellene høstes og lyses og proteinet isoleres. En cellekultur omfatter vertsceller, medium og andre sideprodukter. Egnede medier for celledyrking er velkjente innen faget. De angjeldende ActRIIa-polypeptidene kan isoleres fra celledyrkingsmedium, vertsceller eller begge deler ved anvendelse av teknikker som er kjente innen faget for rensing av proteiner, deriblant ionebytterkromatografi, gelfiltreringskromatografi, ultrafiltrering, elektroforese, immunaffinitetsrensing med antistoffer som er spesifikke for spesielle epitoper på ActRIIa-polypeptidene og affinitetsrensing med et middel som bindes til et domene som er fusjonert til ActRIIa-polypeptidet (f. eks. kan en protein A-kolonne anvendes for rensing av en ActRIIa-Fc-fusjon). ActRIIa-polypeptidet kan være et fusjonsprotein som inneholder et domene som forenkler rensingen av det. Rensing kan oppnås via en serie av kolonnekromatografitrinn, omfattende for eksempel tre eller flere av følgende i hvilken som helst rekkefølge: protein A-kromatografi, Q sepharose-kromatografi, fenylsepharose-kromatografi, størrelseseksklusjonskromatografi og kationbytterkromatografi. Rensing kan avsluttes med virusfiltrering og bufferutbytning. Som vist heri ble ActRIIa-hFc-protein renses til en renhet på >98 % bestemt ved størrelseseksklusjonskromatografi og >95 % bestemt ved SDS-PAGE. Dette renhetsnivået var tilstrekkelig til å oppnå ønskelige virkninger på ben i mus og en tilfredsstillende sikkerhetsprofil i mus, rotter og ikke-menneskelige primater.

Et fusjonsgen som koder for en ledersekvens for rensing, for eksempel poly-(His)/enterokinasespaltingssetesekvens, i N-enden av den ønskede del av det rekombinante ActRIIa-polypeptid, kan muliggjøre rensing av det uttrykte fusjonsprotein ved affinitetskromatografi på et Ni²⁺-metallresin. Ledersekvensen for rensing kan så senere fjernes ved behandling med enterokinase for å tilveiebringe det rensede

ActRIIa-polypeptid (se f. eks. Hochull et al., (1987) J. Chromatography 411:177 og Janknecht et al., PNAS USA 88:8972).

Teknikker for fremstilling av fusjonsproteiner er velkjente. I all vesentlighet utføres en sammenkobling av forskjellige DNA-fragmenter som koder for forskjellige polypeptidsekvenser i samsvar med konvensjonelle teknikker, ved benyttelse av butte ender eller ender med overheng for ligering, kutting med restriksjonsenzymmer for tilveiebringelse av egnede ender, innfylling av klebrige ender etter behov, behandling med alkalisk fosfatase for å unngå uønsket sammenkobling og enzymatisk ligering. Fusjonsgenet kan syntetiseres ved anvendelse av konvensjonelle teknikker, deriblant automatiserte DNA-synteseinstrumenter. Alternativt kan PCR-amplifisering av genfragmenter utføres ved anvendelse av anker-primere som gir opphav til komplementære overheng mellom to på hverandre følgende genfragmenter, som så kan hybridiseres for dannelsen av en kimær gensekvens (se for eksempel Current Protocols in Molecular Biology, red. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

4. Alternative aktivin- og ActRIIa-antagonister (ikke en del av oppfinnelsen)

Resultatene som presenteres heri viser at antagonister av aktivin-ActRIIa-signalisering kan anvendes for fremme av benvekst og mineralisering av ben. Selv om det heri beskrives visse løselige ActRIIa-polypeptider, spesielt ActRIIa-Fc, og selv som slike antagonister kan påvirke ben via en mekanisme som er en annen enn aktivin-antagonisme (f. eks. kan aktivininhibering være en indikator på et middels tendens til å inhibere aktiviteten av et spektrum av molekyler, deriblant kanskje andre medlemmer av TGF-beta-superfamilien, og slik kollektiv inhibering kan føre til den ønskede virkning på ben), forventes andre typer av aktivin-ActRIIa-antagonister å være anvendbare, deriblant anti-aktivin (f. eks. A, B, C eller E)-antistoffer, anti-ActRIIa-antistoffer, antisense-, RNAi- eller ribozym-nukleinsyrer som inhiberer dannelsen av ActRIIa, og andre inhibitorer av aktivin eller ActRIIa, særlig slike som forstyrrer aktivin-ActRIIa-bindingen.

Et antistoff som er spesielt reaktivt mot et ActRIIa-polypeptid (f. eks. et løselig ActRIIa-polypeptid) og som enten bindes i konkurranse med ActRIIa til ligand eller på annet vis inhiberer ActRIIa-formidlet signalisering, kan anvendes som en antagonist av ActRIIa-polypeptidaktiviteter. Likeså kan et antistoff som er spesielt reaktivt mot et aktivin A-polypeptid og som forstyrrer bindingen til ActRIIa anvendes som en antagonist.

Ved anvendelse av immunogener som er avledet fra et ActRIIa-polypeptid eller et aktivinpolypeptid kan anti-protein/anti-peptid-antisera eller monoklonale antistoffer fremstilles ved hjelp av standard fremgangsmåter (se for eksempel Antibodies: A Laboratory Manual, red. Harlow og Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Et pattedyr, for eksempel en mus, en hamster eller en kanin, kan immuniseres med en

immunogen form av ActRIIa-polypeptidet, et antigen fragment som kan utløse en antistoffrespons eller et fusjonsprotein. Teknikker for å gjøre et protein eller peptid antigen omfatter konjugering til bærere eller andre teknikker som er velkjente innen faget. En immunogen del av et ActRIIa- eller aktivin-polypeptid kan tilføres i nærvær
 5 av adjuvans. Immuniseringsforløpet kan følges ved påvisning av antistofftiter i plasma eller serum. Standard ELISA eller andre immunanalyser kan anvendes med immunogenet som antigen for estimering av antistoffnivået.

Etter immunisering av et dyr med et antigen preparat av et ActRIIa-polypeptid kan antiserum erholdes, og om ønskelig kan polyklonale antistoffer isoleres fra serum.
 10 For fremstilling av monoklonale antistoffer kan antistoffproduserende celler (lymfocytter) isoleres fra et immunisert dyr og fusjoneres ved hjelp av standardfremgangsmåter for fusjon av somatiske celler til immortaliserte celler, for eksempel myelomceller, for erholdelse av hybridomceller. Slike teknikker er velkjente innen faget og omfatter for eksempel hybridomteknikken (opprinnelig utviklet av Kohler og Milstein,
 15 (1976) *Nature*, 256:495-497), human B-celle-hybridomteknikken (Kozbar et al., (1983) *Immunology Today*, 4:72) og EBV-hybridomteknikken for fremstilling av humane monoklonale antistoffer (Cole et al., (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. s. 77-96). Hybridomceller kan analyseres immunkjemisk for dannelse av antistoffer som reagerer spesifikt med et ActRIIa-polypeptid, og monoklonale antistoffer kan isoleres fra en kultur som omfatter slike hybridomceller.
 20

Begrepet "antistoff" er som det anvendes heri ment å skulle omfatte fragmenter av antistoffer som også reagerer spesifikt med et angjeldende polypeptid. Antistoffer kan fragmenteres ved anvendelse av konvensjonelle teknikker og fragmentene analyseres for anvendbarhet på samme måte som beskrevet ovenfor for intakte antistoffer.
 25 For eksempel kan F(ab)₂-fragmenter frembringes ved å behandle antistoff med pepsin. Det resulterende F(ab)₂-fragment kan behandles for reduksjon av disulfidbroer for fremstilling av Fab-fragment. Antistoffene som beskrives heri er videre ment å skulle omfatte bispesifikke, enkeltkjedede, kimære, humaniserte og fullt ut humane molekyler med en affinitet for et ActRIIa- eller aktivin-polypeptid som skyldes minst
 30 ett CDR-område fra antistoffet. Et antistoff kan videre omfatte en merkingsgruppe som er koblet til det og som kan påvises (merkingsgruppen kan f. eks. være en radioaktiv isotop, en fluorescerende forbindelse, et enzym eller en enzymkofaktor).

Antistoffet kan være et rekombinant antistoff, hvor dette begrepet omfatter ethvert antistoff som er fremstilt ved delvis anvendelse av molekylærbiologiske
 35 teknikker, deriblant CDR-transplanterte eller kimære antistoffer, humane eller andre antistoffer som er oppbygd av antistoffdomener utvalgt fra biblioteker, enkeltkjedede antistoffer og enkeltdomeneantistoffer (f. eks. humane V_H-proteiner eller kamelide V_{HH}-proteiner). Antistoffet kan være et monoklonalt antistoff, og heri beskrives fremgangsmåter for frembringelse av nye antistoffer. For eksempel kan en fremgangsmåte

for frembringelse av et monoklonalt antistoff som bindes spesifikt til et ActRIIa-polypeptid eller aktivinpolypeptid omfatte tilførsel til en mus av en mengde av en immungen sammensetning som omfatter antigenpolypeptidet som effektivt stimulerer en påvisbar immunrespons, erholdelse av antistoffproduserende celler (f. eks. celler fra milt) fra musen og fusjon av de antistoffproduserende cellene til myelomceller for erholdelse av antistoffproduserende hybridomer, og analyse av de antistoffproduserende hybridomene for påvisning av et hybridom som produserer et monoklonalt antistoff som bindes spesifikt til antigenet. Etter erholdelse av et hybridom kan det oppformerer i cellekultur, om ønskelig under dyrkningsbetingelser hvor hybridomcellene produserer det monoklonale antistoffet som bindes spesifikt til antigenet. Det monoklonale antistoffet kan renses fra cellekulturen.

Adjektivet ” spesifikt reaktivt mot” anvendt i forbindelse med et antistoff er ment å bety, som generelt forstått innen faget, at antistoffet er tilstrekkelig selektivt for antigenet av interesse (f. eks. et ActRIIa-polypeptid) fremfor andre antigener som ikke er av interesse, til at antistoffet er anvendbart for i det minste å påvise nærvær av antigenet av interesse i en gitt type av biologisk prøve. I visse fremgangsmåter som benytter antistoffet, for eksempel terapeutiske anvendelser, kan det være ønskelig med en høyere grad av bindingsspesifisitet. Monoklonale antistoffer har generelt høyere tendens (sammenlignet med polyklonale antistoffer) til å skille effektivt mellom de ønskede antigenene og kryssreagerende polypeptider. En egenskap som påvirker spesifisiteten av en antistoff:antigeninteraksjon er antistoffet affinitet for antigenet. Selv om den ønskede spesifisitet kan nås med et område av forskjellige affiniteter vil generelt foretrukne antistoffer ha en affinitet (en dissosiasjonskonstant) på tilnærmet 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} eller lavere. Ut fra den ekstraordinært tette bindingen mellom aktivin og ActRIIa forventes det at et nøytraliserende anti-aktivin- eller anti-ActRIIa-antistoff generelt vil ha en dissosiasjonskonstant på 10^{-10} eller lavere.

I tillegg kan teknikkene som anvendes for gjennom søkning av antistoffer for påvisning av et ønskelig antistoff påvirke egenskapene til det erholdte antistoff. Dersom for eksempel et antistoff skal anvendes for binding av et antigen i løsning, kan det være ønskelig å analysere binding i løsning. En rekke forskjellige teknikker er tilgjengelige for analyse av interaksjonen mellom antistoffer og antigener for påvisning av spesielt ønskelige antistoffer. Slike teknikker omfatter ELISA-analyser, overflateplasmonresonans-bindingsanalyser (f. eks. Biacore™-bindingsanalysen, Biacore AB, Uppsala, Sverige), sandwich-analyser (for eksempel systemet med paramagnetiske kuler fra IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), western-blotting, immunpresipitasjon analyse og immunhistokjemi.

Eksempler på kategorier av nukleinsyreforbindelser som er aktivin- eller ActRIIa-antagonister omfatter antisense-nukleinsyrer, RNAi-konstruksjoner og katalytiske nukleinsyrekonstruksjoner. En nukleinsyreforbindelse kan være enkelttrådet

eller dobbelttrådet. En dobbelttrådet forbindelse kan også omfatte områder med overheng eller ikke-komplementaritet, for den ene eller andre tråden er enkelttrådet. En enkelttrådet forbindelse kan omfatte områder med selvkomplementaritet, hvilket vil si at forbindelsen danner en såkalt "hårnål"- eller "stamme-løkke"-struktur, med et

5 område med dobbeltheliksstruktur. En nukleinsyreforbindelse kan omfatte en nukleotidsekvens som er komplementær til et område som består av ikke mer enn 1000, ikke mer enn 500, ikke mer enn 250, ikke mer enn 100 eller ikke mer enn 50, 35, 30, 25, 22, 20 eller 18 nukleotider fra fullengde-ActRIIa-nukleinsyresekvensen eller aktivin β A- eller aktivin β B-nukleinsyresekvensen. Området med komplementaritet vil

10 fortrinnsvis være på minst 8 nukleotider og om ønskelig minst 10 eller minst 15 nukleotider, eventuelt mellom 15 og 25 nukleotider. Et område med komplementaritet kan falle innenfor et intron, en kodende sekvens eller en ikke-kodende sekvens i måltranskriptet, for eksempel området med den kodende sekvens. Generelt vil en nukleinsyreforbindelse har en lengde på fra tilnærmet 8 til tilnærmet 500 nukleotider

15 eller basepar, og lengden vil om ønskelig være fra tilnærmet 14 til tilnærmet 50 nukleotider. En nukleinsyre kan være et DNA (fortrinnsvis for anvendelse som antisense), et RNA eller et RNA:DNA-hybrid. Hvilken som helst av trådene kan omfatte en blanding av DNA og RNA, så vel som modifiserte former som ikke lett kan klassifiseres som enten DNA eller RNA. Likeså kan en dobbelttrådet forbindelse være

20 DNA:DNA, DNA:RNA eller RNA:RNA, og hvilken som helst at trådene kan også omfatte en blanding av DNA og RNA, så vel som modifiserte former som ikke lett kan klassifiseres som enten DNA eller RNA. En nukleinsyreforbindelse kan omfatte hvilke som helst av en rekke forskjellige modifikasjoner, deriblant en eller modifikasjoner i ryggraden (sukker-fosfat-delen i en naturlig nukleinsyre, inklusive internukleotid-

25 bindinger) eller basedelen (purin- eller pyrimidindelen av en naturlig nukleinsyre). En antisense-nukleinsyreforbindelse vil fortrinnsvis ha en lengde på fra tilnærmet 15 til tilnærmet 30 nukleotider og vil ofte inneholde en eller flere modifikasjoner for å forbedre egenskaper som stabilitet i serum, i en celle eller et område til hvilket forbindelsen sannsynligvis vil tilføres, for eksempel magen når det gjelder oralt tilførte

30 forbindelser og lungen for inhalerte forbindelser. Når det gjelder en RNAi-konstruksjon vil tråden som er komplementær til måltranskriptet generelt være RNA eller modifikasjoner av RNA. Den andre tråden kan være RNA, DNA eller hvilken som helst annen variasjon. Dupleksdelen av dobbelttrådet eller enkelttrådet "hårnål"-RNA-konstruksjon vil fortrinnsvis ha en lengde på fra 10 til 40 nukleotider og om

35 ønskelig fra tilnærmet 21 til 23 nukleotider, så lenge som den fungerer som et substrat for Dicer. Katalytiske eller enzymatiske nukleinsyrer kan være ribozymmer eller DNA-enzymmer og kan også inneholde modifiserte former. Nukleinsyreforbindelser kan inhibere ekspresjonen av målet med tilnærmet 50 %, 75 %, 90 % eller mer når de settes i kontakt med celler under fysiologiske betingelser og ved en konsentrasjon hvor en

nonsense- eller sense-kontroll har liten eller ingen virkning. Foretrukne konsentrasjoner for analyse av virkningen av nukleinsyreforbindelser er 1, 5 og 10 mikromolar. Nukleinsyreforbindelser kan også analyseres for virkninger på for eksempel benvekst og mineralisering av ben.

5

5. Gjennomsøkningsanalyser (ikke en del av oppfinnelsen)

ActRIIa-polyeptider (f. eks. løselige ActRIIa-polyeptider) og aktivinpolyeptider kan anvendes for påvisning av forbindelser (midler) som er agonister eller antagonist av aktivin-ActRIIa-signalveien. Forbindelser som påvises ved slik
10 gjennomsøkning kan analyseres for å anslå deres evne til å modulere benvekst eller mineralisering av ben *in vitro*. Om ønskelig kan disse forbindelsene analyseres videre i modeller i ikke-menneskelige dyr for å evaluere deres evne til å modulere vevsvekst *in vivo*.

Det finnes en rekke tilnærminger for søk etter terapeutiske midler for
15 modulering av vevsvekst med aktivin- og ActRIIa-polyeptider som målmolekyler. Høykapasitets gjennomsøkning av forbindelser kan utføres for å påvise midler som forstyrrer aktivin- eller ActRIIa-medierte virkninger på ben. I visse tilfeller utføres analysen for å søke etter og påvise forbindelser som spesifikt inhiberer eller reduserer bindingen av et ActRIIa-polyeptid til aktivin. Alternativt kan analysen anvendes for
20 påvisning av forbindelser som forsterker bindingen av et ActRIIa-polyeptid til aktivin. Forbindelsene kan påvises ut fra deres evne til å interagere med et aktivin- eller ActRIIa-polyeptid.

En rekke forskjellige analyseformater vil være tilstrekkelige, og i lys av den foreliggende beskrivelse vil de som ikke uttrykkelig beskrives heri ikke desto mindre
25 kunne forstås av gjennomsnittsfagpersonen. Som beskrevet heri kan analyseforbindelsene (midlene) være fremstilt ved hvilken som helst kombinatorisk kjemisk fremgangsmåte. Alternativt kan forbindelsene det gjelder være naturlig forekommende biomolekyler som er syntetisert *in vivo* eller *in vitro*. Forbindelser (midler) som skal analyseres for evne til å virke som modulatorer av vevsvekst kan for eksempel være
30 produsert av bakterier, gjær, planter eller andre organismer (f. eks. naturprodukter), fremstilt kjemisk (f. eks. små molekyler, innbefattet peptidomimetika) eller fremstilt rekombinant. Analyseforbindelser omfatter organiske ikke-peptidyl-molekyler, peptider, polypeptider, peptidomimetika, sukker, hormoner og nukleinsyremolekyler. I et spesifikt tilfelle er analysemiddelet et lite, organisk molekyl med en molekylvekt
35 som er lavere enn tilnærmet 2000 dalton.

Analyseforbindelsene kan foreligge som enkeltvis, adskilte enheter eller i biblioteker av større kompleksitet, for eksempel fremstilt ved kombinatorisk kjemi. Disse bibliotekene kan for eksempel omfatte alkoholer, alkylhalider, aminer, amider, estere, aldehyder, etere og andre klasser av organiske forbindelser. Presentasjonen av

analyseforbindelsene overfor analysesystemet kan foregå enten i isolert form eller som en blanding av forbindelser, særlig i de innledende gjennom søkningstrinnene.

Eventuelt kan forbindelsene om ønskelig være derivatisert med andre forbindelser og ha derivatiserende grupper som forenkler rensingen av forbindelsene. Ikkebegrensede
 5 eksempler på derivatiserende grupper omfatter biotin, fluorescein, digoksygenin, grønt fluorescerende protein, isotoper, polyhistidin, magnetiske kuler, glutation S transferase (GST), lysaktiverbare kryssbindere eller hvilke som helst kombinasjoner av disse.

I mange programmer for søk etter medikamenter som analyserer biblioteker av forbindelser og natale ekstrakter er det ønskelig med analyser med høy kapasitet for å
 10 maksimalisere antall forbindelser som kan inspiseres innen et gitt tidsrom. Analyser som utføres i cellefrie systemer, som for eksempel kan være avledet med rensede eller delvis rensede proteiner, foretrekkes ofte som "primære" søk, siden de kan fremstilles slik at de tillager hurtig fremkalling og relativt enkel påvisning av en endring i et mål-molekyl som er formidlet av en analyseforbindelse. Videre kan virkninger forbundet
 15 med celletoksisitet eller biotilgjengelighet generelt ignoreres i *in vitro*-systemet, hvor analysen i stedet primært er rettet mot virkningen av medikamentet på målmolekylet, som denne viser seg som en endring av bindingsaffiniteten mellom et ActRIIa-poly-peptid og aktivin.

Kun som en illustrasjon sette forbindelsen av interesse i et eksempel på en
 20 gjennom søkningsanalyse i forbindelse med et isolert og rensed ActRIIa-molekyl som normalt er i stand til å bindes til aktivin. Blandingen av forbindelse og ActRIIa-poly-peptid tilsettes så en sammensetning som inneholder en ActRIIa-ligand. Påvisning og kvantifisering av ActRIIa/aktivin-komplekser utgjør et middel for å bestemme forbindelsens virkning når det gjelder inhibering (eller forsterkning) av kompleks-
 25 dannelsen mellom ActRIIa-polypeptidet og aktivin. Virkningen av forbindelsen kan estimeres ved å fremstille dose-responskurver fra resultater erholdt ved anvendelse av forskjellige konsentrasjoner av analyseforbindelsen. Videre kan det også utføres en kontrollanalyse for å etablere et basalnivå å sammenligne med. I en kontrollanalyse tilsettes for eksempel isolert og rensed aktivin til en sammensetning som inneholder
 30 ActRIIa-polypeptidet, og dannelsen av ActRIIa/aktivin-kompleks kvantifiseres i fravær av analyseforbindelsen. Det skal forstås at rekkefølgen som reaktantene sammen-blandes i generelt kan varieres, og de kan sammenblandes samtidig. Videre kan det i stedet for rensede proteiner anvendes celleekstrakter og lysater for å oppnå et egnet, cellefritt analysesystem.

35 Kompleksdannelsen mellom ActRIIa-polypeptidet og aktivin kan påvises ved hjelp av en rekke forskjellige teknikker. For eksempel kan modulering av dannelsen av komplekser kvantifiseres ved anvendelse av for eksempel påvisbart merkede proteiner, for eksempel radioaktivt merket (f. eks. ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C eller ^3H), fluorescensmerket (f. eks.

FITC), eller enzymatisk merket ActRIIa-polypeptid eller aktivin, ved immunanalyse eller ved kromatografisk påvisning.

Fluorescenspolariseringsanalyser og fluorescensresonansenergioverføring (FRET)-analyser kan anvendes for enten direkte eller indirekte måling av graden av interaksjon mellom et ActRIIa-polypeptid og dets bindende protein. Videre kan andre påvisningsmåter, for eksempel slike som bygger på optiske bølgeledere (PCT-publikasjon WO 96/26432 og U.S. Patentskrift nr. 5677196), overflateplasmonresonans (SPR), overflateladningssensorer og overflatekraftsensorer, anvendes.

En interaksjonsfelle-analyse, også betegnet "tohybrid-analysen", kan anvendes for påvisning av midler som forstyrrer eller forsterker interaksjonen mellom et ActRIIa-polypeptid og dets bindende protein. Se for eksempel U.S. Patentskrift nr. 5283317, Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232, Madura et al. (1993) J Biol Chem 268:12046-12054, Bartel et al. (1993) Biotechniques 14:920-924 og Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696). Reverserte tohybridsystemer kan anvendes for påvisning av forbindelser (f. eks. små molekyler eller peptider) som dissosierer interaksjoner mellom et ActRIIa-polypeptid og dets bindende protein. Se for eksempel Vidal og Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29, Vidal og Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81 og U.S. Patentskrift nr. 5525490, 5955280 og 5965368.

De angjeldende forbindelsene kan påvises ut fra evnen til å interagere med et ActRIIa- eller aktivinpolypeptid som beskrives heri. Interaksjonen mellom forbindelsen og ActRIIa- eller aktivinpolypeptidet kan være kovalent eller ikke-kovalent. En slik interaksjon kan for eksempel påvises på proteinnivå ved anvendelse av biokjemiske *in vitro*-fremgangsmåter, deriblant fotokryssbinding, binding av radioaktiv ligand og affinitetskromatografi (Jakoby WB et al., 1974, Methods in Enzymology 46:1) I visse tilfeller kan forbindelsene analyseres i en mekanismebasert analyse, for eksempel en analyse for påvisning av forbindelser som bindes til et aktivin- eller ActRIIa-polypeptid. Dette kan omfatte en bindingshendelse i fast fase eller fluid fase. Alternativt kan genet som koder for et aktivin- eller ActRIIa-polypeptid sammen med et rapportørsystem (f. eks. β -galaktosidase, luciferase eller grønt fluorescerende protein) transfekteres inn i en celle og analyseres mot biblioteket, fortrinnsvis ved gjennomsøkning med høy ytelse eller med enkeltmedlemmer av biblioteket. Andre mekanismebaserte bindingsanalyser kan anvendes, for eksempel bindingsanalyser som påviser endringer i fri energi. Bindingsanalyser kan utføres med målmolekylet festet til en brønn, kule eller brikke, innfanget av et immobilisert antistoff eller fraksjonert ved kapillærelektroforese. De bundne forbindelsene kan påvises, vanligvis ved anvendelse av kolorimetri, fluorescens eller overflateplasmonresonans.

Heri beskrives fremgangsmåter og midler for modulering (stimulering eller inhibering) av bendannelse og økning av benmassen. Følgelig kan enhver påvist

forbindelse analyseres i hele celler eller vev, *in vitro* eller *in vivo*, for å bekrefte evnen til å modulere vekst eller mineralisering av ben. Forskjellige fremgangsmåter som er kjente innen faget kan benyttes for dette formål.

For eksempel kan virkningen av ActRIIa- eller aktivinpolypeptidene eller analyseforbindelser på vekst av ben eller brusk bestemmes ved å måle induksjon av Msx2 eller differensiering av osteoprogenitorceller til osteoblaster i cellebaserte analyser (se for eksempel Daluiski et al., Nat Genet. 2001, 27(1):84-8, Hino et al., Front Biosci. 2004, 9:1520-9). Et annet eksempel på cellebaserte analyser omfatter analyse av den osteogene aktiviteten av de angjeldende ActRIIa- eller aktivinpolypeptidene og analyseforbindelser i mesenkymale progenitorceller og osteoblastiske celler. Som en illustrasjon kan det konstrueres rekombinant adenovirus som uttrykker et aktivin- eller ActRIIa-polypeptid for infeksjon av pluripotente mesenkymale C3H 10Y1 /2-progenitorceller, preosteoblastiske C2C12-celler og osteoblastiske TE-85-celler. Osteogen aktivitet bestemmes så ved å måle induksjonen av alkalisk fosfatase, osteokalsin og mineralisering av matriks (se f. eks. Cheng et al., J bone Joint Surg Am. 2003, 85-A(8):1544-52).

In vivo-analyser kan anvendes for måling av vekst av ben eller brusk. For eksempel beskriver Namkung-Matthai et al., Bone, 28:80-86 (2001) en osteoporosemodell i rotte i hvilken reparasjon av ben i det tidlige tidsrom etter brudd undersøkes. Kubo et al., Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 68:197-202 (1999) beskriver også en osteoporosemodell i rotte i hvilken reparasjon av ben i det sene tidsrom etter brudd undersøkes. Andersson et al., J. Endocrinol. 179:529-537 beskriver en osteoporosemodell i mus i hvilken mus ovariektomiseres, noe som fører til at musene i vesentlig grad mister benets mineralinnhold og mineraltetthet, slik at spongiøst ben mister rundt regnet 50 % av mineraltettheten i ben. Bentettheten kunne økes i de ovariektomisererte musene ved tilførsel av faktorer som parathormon. Analyser for bruddheling som er kjente innen faget kan benyttes. Disse analysene omfatter bruddteknikk, histologisk analyse og biokjemisk analyse som for eksempel beskrives i U.S. Patentskrift nr. 6521750, som beskriver eksperimentelle fremgangsmåter for å forårsake, så vel som å måle omfanget av brudd, samt reparasjonsprosessen.

6. Eksempler på terapeutiske anvendelser

Aktivin-ActRIIa-antagonister (f. eks. ActRIIa-polypeptider) kan anvendes for behandling eller forebyggelse av en sykdom eller tilstand som er forbundet med ben-skade, enten f. eks. grunnet brudd, tap eller demineralisering. Som vist heri er aktivin-ActRIIa-antagonister, og særlig ActRIIa-Fc-konstruksjoner, effektive i behandling eller forebyggelse av kreftforbundet tap av ben. Heri beskrives fremgangsmåter for behandling eller forebyggelse av benskade i et individ med behov for dette ved å tilføre til individet en terapeutisk effektiv mengde av en aktivin-ActRIIa-antagonist, nærmere

bestemt et ActRIIa-polypeptid. Videre beskrives fremgangsmåter for fremme av benvekst eller -mineralisering i et individ med behov for dette av ved å tilføre til individet en terapeutisk effektiv mengde av en aktivin-ActRIIa-antagonist, nærmere bestemt et ActRIIa-polypeptid. Disse fremgangsmåtene er fortrinnsvis rettet mot terapeutisk og profylaktisk behandling av dyr, og mer foretrukket mennesker. Beskrevet deri er 5 aktivin-ActRIIa-antagonister (fortrinnsvis løselige ActRIIa-polypeptider og nøytraliserende antistoffer rettet mot aktivin eller ActRIIa) for behandling av forstyrrelser forbundet med lav bentetthet eller redusert benstyrke.

Som anvendt heri viser et terapeutisk middel som "forebygger" en forstyrrelse eller tilstand til en forbindelse som i et statistisk utvalg reduserer forekomsten av 10 forstyrrelsen eller tilstanden i det behandlede utvalget sammenlignet med et ubehandlet kontrollutvalg. Begrepet "behandle" omfatter som det anvendes heri profylakse av den nevnte tilstanden eller lindring eller eliminering av tilstanden når den først har etablert seg. I begge tilfeller kan det skilles mellom forebyggelse og behandling ut fra 15 diagnosen som gis av en lege og det påtenkte resultatet av tilførselen av det terapeutiske middelet.

Beskrivelsen beskriver fremgangsmåter for induksjon av dannelse av ben og/eller brusk, forebyggelse av bentap, økning av mineraliseringen av ben eller forebyggelse av demineralisering av ben. For eksempel kan de angjeldende aktivin-ActRIIa-antagonistene anvendes ved behandling av osteoporose og heling av benbrudd og bruskdefekter i mennesker og andre dyr. De angjeldende sammensetningene kan 20 også ha profylaktisk anvendelse ved lukket så vel som åpen bruddreduksjon, og også for forbedret fiksering av kunstige ledd. De novo-bendannelse induert av et osteogent middel bidrar til reparasjon av kraniofaciale defekter som er medfødte eller induert av traume eller onkologisk reseksjon, og er også nyttig i kosmetisk plastisk kirurgi. I visse 25 tilfeller kan de angjeldende aktivin-ActRIIa-antagonistene tilveiebringe et miljø som tiltrekker bendannende celler, stimulerer vekst av bendannende celler eller induserer differensiering av forløpere for bendannende celler. Aktivin-ActRIIa-antagonister kan også være anvendbare ved behandling av osteoporose.

Sammensetninger ifølge oppfinnelsen kan benyttes for tilstander som 30 særpreges av *eller* omfatter tap av ben, for eksempel osteoporose (deriblant sekundær osteoporose), hyperparatyreoidisme, Cushings sykdom, Pagets sykdom, tyrotoksikose, kronisk diarétilstand eller feilabsorpsjon, renal tubulær acidose eller anorexia nervosa.

Osteoporose kan skyldes eller være assosiert med forskjellige faktorer. Å være 35 kvinne, særlig en postklimakterisk kvinne, å ha lav kroppsvekt og å ha en stillesittende livsstil er alle risikofaktorer for osteoporose (tap av mineraltettheten i ben, noe som fører til fare for benbrudd). Personer med hvilke som helst av følgende profiler kan være kandidater for behandling med en ActRIIa-antagonist: en postklimakterisk kvinne som ikke tar østrogen eller annen for hormonerstatningsbehandling, en person med en

personlig eller maternell historie med hoftebrudd eller røyking, en postklimakterisk kvinne som er høy (over 170 cm) eller tynn (mindre enn 57 kg), en mann med kliniske tilstander forbundet med tap av ben, en person som anvender medikamenter som vites å være en årsak til bentap, deriblant kortikosteroider som Prednisone™, forskjellige antikonvulsive midler, for eksempel Dilantin™, og visse barbiturater, eller thyroid-behandling i store doser, en person med type 1 diabetes, leversykdom, nyresykdom eller en familiehistorie med osteoporose, en person med høy benomsetning (f. eks. overskudd av kollagen i urinprøver), en person med en tilstand i skjoldkjertelen, for eksempel hypertyreoidisme, en person som har opplevd benbrudd etter et mildt traume, en person som ved røntgenundersøkelser har fått påvist virvelbrudd eller andre tegn på osteoporose.

Som bemerket ovenfor kan osteoporose også oppstå som en tilstand forbundet med en annen forstyrrelse eller grunnet bruk av visse medikamenter. Osteoporose som følge av medikamenter eller en annen medisinsk tilstand kalles sekundær osteoporose. I en tilstand som kalles Cushions sykdom fører den overdrevne høye konsentrasjonen av kortisol som kroppen produserer til osteoporose og brudd. Kortikosteroidene, en klasse av medikamenter som virker som kortisol, et hormon som produseres naturlig av binyrekjertlene, er de medikamentene som hyppigst er forbundet med sekundær osteoporose. Selv om et adekvat nivå av tyreoidhormoner (som produseres av skjoldkjertelen) er nødvendig for utvikling av skjelettet, kan et for høyt nivå av tyreoidhormon over tid redusere benmassen. Antacider som inneholder aluminium kan føre til bentap ved inntak i høye doser av mennesker med nyreproblemer, særlig dem som gjennomgår dialyse. Andre medikamenter som kan føre til sekundær osteoporose omfatter fenytoin (Dilantin) og barbiturater som anvendes for forebyggelse av anfall, metotreksat (Rheumatrex, Immunex, Folex PFS), et medikament for noen former av artritt, kreft og immunforstyrrelser, syklosporin (Sandimmune, Neoral), et medikament som anvendes for behandling av noen autoimmune sykdommer og for å undertrykke immunsystemet i pasienter som gjennomgår organtransplantasjon, luteiniserende hormon-frigjørende hormon-agonister (Lupron, Zoladex), som anvendes for behandling av prostatakreft og endometriose, heparin (Calciparine, Liquaemin), et antikoagulasjonsmedikament, og kolestyramin (Questran) og kolestipol (Colestid), som anvendes for behandling av høyt kolesterol. Bentap som følge av kreftbehandling er alminnelig kjent og betegnes kreftterapiindusert bentap (CTIBL - cancer therapy induced bone loss). Metastaser i ben kan danne hulrom i benet som kan korrigeres ved behandling med aktivin-ActRIIa-antagonister.

I en foretrukket utførelse kan sammensetninger ifølge oppfinnelsen anvendes i kreftpasienter. Pasienter med visse tumorformer (for eksempel multiple myelomer) kan behandles med aktivin-ActRIIa-antagonisten ifølge kravene, selv i fravær av bevis for bentap eller metastaser i ben. Pasienter kan også overvåkes for tegn på bentap eller

metastaser i ben og behandles med aktivin-ActRIIa-antagonister dersom indikatorer tydet på forhøyet risiko. Generelt anvendes DEXA-skann for å anslå endringer i ben-tettheten, mens indikatorer på remodellering av ben kan anvendes for å anslå sannsynligheten for metastaser i ben. Serummarkører kan overvåkes. Benspesifikk alkalisk fosfatase (BSAP) er et enzym som foreligger i osteoblaster. Nivået av BSAP i blodet er forhøyet hos pasienter med metastase i ben og andre tilstander som fører til økt remodellering av ben. Osteokalsin og prokollagenpeptider er også forbundet med bendannelse og metastaser i ben. En økning av BSAP har blitt påvist i pasienter med metastaser i ben som følge av prostatakreft, og i mindre grad i metastaser i ben grunnet brystkreft. Benmorfogent protein 7 (BMP-7)-nivået er høyt i prostatakreft som har metastasert til ben, men ikke i benmetastaser grunnet kreft i urinblære, hud, lever eller lunge. Type I karboksyterminalt telopeptid (ICTP) er en kryssbinding som fines i kollagen som er dannet under til resorpsjon av ben. Siden ben hele tiden nedbrytes og gjendannes vil ICTP foreligge i hele kroppen. I setet for en benmetastase vil imidlertid nivået være signifikant høyere enn i et område med normalt ben. ICTP har blitt funnet i høyt nivå i benmetastase som skyldes kreft i prostata, lunge og bryst. En annen kollagen-kryssbinding, type IN-terminalt telopeptid (NTx), dannes sammen med ICTP under omsetning av ben. Mengden av NTx er forhøyet i benmetastase grunnet mange forskjellige kreftformer, deriblant kreft i lunge, prostata og bryst. Videre øker nivået av NTx etter hvert som benmetastasen utvikles. Denne markøren kan følgelig anvendes for både påvisning av metastase og for måling av sykdommens omfang. Andre resorpsjonsmarkører omfatter pyridinolin og deoksyipyridinolin. Enhver økning av resorpsjonsmarkører eller markører for benmetastase indikerer et behov for behandling av en pasient med aktivin-ActRIIa-antagonist.

Aktivin-ActRIIa-antagonister kan tilføres sammen med andre farmasøytiske midler.

Felles tilførsel kan oppnås ved tilførsel av en enkelt ko-utforming, ved samtidig tilførsel eller ved tilførsel på separate tidspunkter. Aktivin-ActRIIa-antagonister kan være spesielt fordelaktige dersom de tilføres sammen med andre midler som er aktive på ben. En pasient kan dra nytte av forbundet tilførsel av aktivin-ActRIIa-antagonist og inntak av kalsiumsupplementer, vitamin D, egnet fysisk trening og/eller i noen tilfeller andre medikamenter. Eksempler på andre medikamenter omfatter bisfosfonater (alendronat, ibandronat og risedronat), kalsitonin, østrogener, parathormon og raloksifen. Bisfosfonatene (alendronat, ibandronat og risedronat), kalsitonin, østrogener, parathormon og raloksifen påvirker benet remodelleringssyklus og klassifiseres som antiresorpsjonsmedikamenter. Remodellering av ben består av to adskilte stadier: resorpsjon av ben og dannelse av ben. Antiresorpsjonsmedikamenter reduserer eller stanser benresorpsjonsdelen av syklusen, men reduserer ikke den bendannende delen av syklusen. Som en følge av dette fortsetter nydannelsen med en

hastighet som er høyere enn benresorpsjonshastigheten, og bentettheten kan øke over tid. Teriparatid, en form for parathormon, øker bendannelseshastigheten i remodelingssyklusen. Alendronat er godkjent for både forebyggelse (5 mg pr. dag eller 35 mg én gang i uken) og behandling (10 mg pr. dag eller 70 mg én gang i uken) av postklimakterisk osteoporose. Alendronat reduserer tap av ben, øker bentettheten og reduserer risikoen for brudd i ryggrad, håndledd og hofte. Alendronat er også godkjent for behandling av glukokortikosteroidindusert osteoporose i menn og kvinne som en følge av lang tids bruk av disse medikamentene (dvs. prednison og kortison) og for behandling av osteoporose i menn. Alendronat pluss vitamin D er godkjent for behandling av osteoporose i postklimakteriske kvinner (70 mg én gang i uken pluss vitamin D) og for behandling for å forbedre benmassen hos menn med osteoporose. Ibandronat er godkjent for forebyggelse eller behandling av postklimakterisk osteoporose. Tatt som en pille (150 mg) én gang i måneden bør ibandronat tas på den samme dag hver måned. Ibandronat reduserer bentap, øker bentettheten og reduserer risikoen for brudd i ryggrad og andre steder. Risedronat er også godkjent for anvendelse av menn og kvinner for forebyggelse og/eller behandling av glukokortikosteroidindusert osteoporose som følge av lang tids bruk av disse medikamentene (dvs. prednison og kortison). Kalsitonin er et naturlig forekommende hormon som inngår i kalsiumreguleringen og metabolisme av ben. I kvinner som er mer enn 5 år etter menopausen reduserer kalsitonin bentap, øker bentettheten i ryggraden og kan lindre smerten som er forbundet med benbrudd. Kalsitonin reduserer risikoen for ryggradsbrudd. Kalsitonin er tilgjengelig som en injeksjon (50-100 IU daglig) eller nesespray (200 IU daglig). Østrogenterapi (ET)/hormonterapi (HT) er godkjent for behandling av osteoporose. ET har blitt vist å redusere bentap, øke bentettheten i både ryggrad og hofte og redusere risikoen for brudd i hofte og ryggrad hos postklimakteriske kvinner. ET tilføres vanligvis i form av en pille eller et hudplaster som tilfører en lav dose på tilnærmet 0,3 mg pr. dag eller en standarddose på tilnærmet 0,625 mg pr. dag, og er effektivt selv når behandlingen begynner etter en alder på 70 år. Dersom østrogen inntas alene kan dette øke risikoen for at kvinnen utvikler kreft i livmorens slimhinne (endometriekreft). For å fjerne denne risikoen foreskriver helsetjenesten hormonet progestin i kombinasjon med østrogen (hormonerstatningsterapi eller HT) til kvinner med en intakt livmor. ET/HT lindrer menopausale symptomer og har blitt vist å ha en gunstig virkning på benhelsen. Bivirkninger kan omfatte vaginale blødninger, ømme bryst, humørforstyrrelser og galleblæresykdom. Raloksifen, 60 mg. pr. dag, er godkjent for forebyggelse og behandling av postklimakterisk osteoporose. Dette medikamentet tilhører en gruppe av medikamenter som kalles selektive østrogenreseptormodulatorer (SERM), som har blitt utviklet for å gi de gunstige virkningene av østrogener uten disses mulige ulemper. Raloksifen øker benmassen og reduserer faren for ryggradsbrudd. Det foreligger ennå ikke resultater som viser at raloksifen kan redusere risikoen

for brudd i hofte og andre steder. Teriparatid, en form for parathormon, er godkjent for behandling av osteoporose i postklimakteriske kvinner og i menn med høy risiko for brudd. Dette medikamentet stimulerer dannelsen av nytt ben og gir en signifikant økning av benets mineraltetthet. Hos postklimakteriske kvinner ble en reduksjon av brudd observert i ryggrad, hofte, for, ribben og håndledd. Hos menn ble en reduksjon av brudd observert i ryggrad, men det forelå ikke nok data for å evaluere reduksjonen av brudd andre steder. Teriparatid tilføres av pasienten selv som en daglig injeksjon i opp til 24 måneder.

7. Farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen er definert i kravene 1-11.

I visse utførelser er aktivin-ActRIIa-antagonister (f. eks. (ActRIIa-polypeptider) ifølge foreliggende oppfinnelse utformet med et farmasøytisk godtagbart bærestoff. Et ActRIIa-polypeptid kan for eksempel tilføres alene eller som en bestanddel av en farmasøytisk utforming (terapeutisk utforming). De angjeldende forbindelsene kan utformes for tilførsel på hvilken som helst egnet måte for anvendelse innen human medisin og veterinærmedisin.

Sammensetningene kan tilføres systemisk, eller lokalt som et implantat eller en innretning. Vid tilførsel av den terapeutiske sammensetningen for anvendelse i dette inventiv er i en pyrogenfri, fysiologisk godtagbar form. Terapeutisk anvendbare midler i tillegg til ActRIIa-antagonistene som også kan inngå i sammenligningen, som beskrevet ovenfor, kan tilføres samtidig med eller sekvensielt med de angjeldende forbindelsene (f. eks. ActRIIa-polypeptidene) i fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen.

Typisk vil ActRIIa-antagonister tilføres parenteralt, fortrinnsvis intravenøst eller subkutant. Farmasøytiske sammensetninger som er egnet for parenteral tilførsel kan omfatte et eller flere ActRIIa-polypeptider i kombinasjon med en eller flere farmasøytisk godtagbare, sterile, isotone, vandige eller ikkevandige løsninger, dispersjoner, suspensjoner eller emulsjoner, eller sterile pulvere som kan rekonstitueres til sterile, injiserbare løsninger eller dispersjoner like før bruk, som kan inneholde antioksidanter, buffere, bakteriostatisk midler, løste stoffer som gjør utformingen isoton med blodet til den påtenkte mottaker eller suspensjons- eller tykningsmidler. Eksempler på egnede vandige og ikkevandige bærestoffer som kan benyttes i de farmasøytiske sammensetningene ifølge oppfinnelsen omfatter vann, etanol, polyoler (f. eks. glyserol, propylenglykol, polyetylglykol og lignende), og egnede blandinger av disse, vegetabiliske oljer, for eksempel olivenolje, og injiserbare organiske estere, for eksempel etyloleat. Korrekt fluiditet kan for eksempel opprettholdes ved anvendelse av belegningsmaterialer, for eksempel lecitin, ved opprettholdelse av den nødvendige partikkelstørrelse når det gjelder dispersjoner og ved anvendelse av surfaktanter.

Videre kan sammensetningen innkapsles eller injiseres i en form for tilførsel til et målsete i et vev (f. eks. ben). I visse utførelser kan sammensetninger ifølge fore-

liggende oppfinnelse omfatte en matriks som kan tilføre en eller flere terapeutiske forbindelser (f. eks. ActRIIa-polypeptider til et målsete i et vev (f. eks. ben), som tilveiebringer en struktur for vevet som utvikles og som optimalt kan resorberes inn i kroppen. Matriksen kan for eksempel sørge for langsom frigjøring av ActRIIa-polypeptidene. Slike matrikser kan utformes av materialer som i dag anvendes for andre implanterte medisinske anvendelser.

Valget av matriksmateriale bygger på biokompatibilitet, biodegraderbarhet, mekaniske egenskaper, kosmetisk utseende og grenseflateegenskaper. Den angjeldende anvendelse av de angjeldende sammensetningene vil definere den egnede utforming.

Mulige matrikser for sammensetningene kan være biodegraderbart og kjemisk definert kalsiumsulfat, trikalsiumfosfat, hydroksyapatitt, polymelkesyre og polyanhydrider. Andre mulige matrikser er ikke biologisk degraderbare og kjemisk definerte, for eksempel sintret hydroksyapatitt, bioglass, aluminater og andre keramiske stoffer. Matrikser kan omfatte kombinasjoner av hvilke som helst av de ovenfor nevnte materialtypene, for eksempel polymelkesyre og hydroksyapatitt eller kollagen og trikalsiumfosfat. De biokeramiske stoffene kan endres når det gjelder sammensetning, for eksempel kalsiumaluminatfosfat, og prosessering for å endre porestørrelsen, partikkelstørrelsen, partikkelformen og biodegraderbarheten.

Sammensetninger ifølge oppfinnelsen kan tilføres oralt, f. eks. i form av kapsler, piller, tabletter, pastiller (ved anvendelse av en smakssatt basis, vanligvis sukrose og akasie eller tragant), pulvere, partikler eller som en løsning eller suspensjon i en vandig eller ikkevandig væske, eller som en olje-i-vann eller vann-i-olje flytende emulsjon, som en eliksir eller sirup eller som pastiller (ved anvendelse av en inert basis, for eksempel gelatin og glyserol, eller sukrose og akasie) og/eller som munnvann og lignende, som alle inneholder en på forhånd bestemt mengde av et middel som en aktiv bestanddel. Et middel kan også tilføres som en bolus, blandet med honning eller et annet søtstoff eller som en grøt.

I faste doseringsformer for oral tilførsel (kapsler, tabletter, piller, dragéer, pulvere, partikler og lignende) kan en eller flere terapeutiske forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse være sammenblandet med et eller flere farmasøytisk godtagbare bærestoffer, for eksempel natriumcitrat eller dikalsiumfosfat, og/eller hvilke som helst av følgende: (1) fyllstoffer eller ekstendere, for eksempel stivelser, laktose, sukrose, glukose, mannitol og/eller kiselsyre, (2) bindemidler, for eksempel karboksymetylcellulose, alginater, gelatin, polyvinylpyrrolidon, sukrose og/eller akasie, (3) fuktighetsbevarende midler, for eksempel glyserol, (4) desintegrasjonsmidler, for eksempel agar-agar, kalsiumkarbonat, potet- eller tapiokastivelse, alginsyre, visse silikater og natriumkarbonat, (5) oppløsningsretarderende midler, for eksempel parafin, (6) absorpsjonsakselererende midler, for eksempel kvaternære ammoniumforbindelser, (7) fuktighetsmidler, for eksempel cetylalkohol og glyserolmonostearat, (8) absorpsjonsmidler, for

eksempel kaolin og bentonittleire, (9) smøremidler, for eksempel talkum, kalsiumstearat, magnesiumstearat, faste polyetylenglykoler, natriumlaurylsulfat og blandinger av disse og (10) fargestoffer. Når det gjelder kapsler, tabletter og piller kan de farmasøytiske sammensetningene også omfatte bufringsmidler. Faste sammensetninger av en tilsvarende type kan også benyttes som fyllstoffer i myke og harde gelatinkapsler ved anvendelse av eksipienser som laktose eller melkesukker, så vel som høymolekylære polyetylenglykoler og lignende.

Flytende doseringsformer for oral tilførsel omfatter farmasøytiske godtagbare emulsjoner, mikroemulsjoner, løsninger, suspensjoner, siruper og eliksirer. I tillegg til den aktive bestanddel kan de flytende doseringsformene inneholde inerte fortynningsmidler som anvendes alminnelig innen faget, for eksempel vann eller andre løsemidler, løsningshjelpemidler og emulgeringsmidler, for eksempel etylalkohol, isopropylalkohol, etylkarbonat, etylacetat, benzylalkohol, benzylbenzoat, propylenglykol, 1,3-butylenglykol, oljer (fortrinnsvis bomullsfrøolje, jordnøttolje, maisolje, hvetekimolje, olivenolje, lakserolje og sesamolje), glyserol, tetrahydrofurylalkohol, polyetylenglykoler og fettsyreestere av sorbitan, samt blandinger av disse. I tillegg til inerte fortynningsmidler kan de orale sammensetningene også omfatte adjuvanter som fuktemidler, emulgerings- og suspenderingsmidler, søtstoffer, smaksstoffer, fargestoffer, duftmidler og konserveringsmidler.

Suspensjoner kan i tillegg til de aktive forbindelsene inneholde suspenderingsmidler som etoksylerte isostearylalkoholer, polyoksyetylenorbitol, og sorbitanestere, mikrokrySTALLinsk cellulose, aluminiummetahydroksid, bentonitt, agar-agar og tragant, samt blandinger av disse.

Sammensetningene ifølge oppfinnelsen kan også inneholde adjuvanter, for eksempel konserveringsmidler, fuktemidler, emulgeringsmidler og dispergeringsmidler. Forebyggelse av virkningen av mikroorganismer kan sikres ved å la inngå forskjellige antibakterielle og antifungale midler, for eksempel paraben, klorbutanol, fenolsorbinsyre og lignende. Det kan også være ønskelig å inkludere isotonisitetsmidler, for eksempel sukker, natriumklorid og lignende, i sammensetningene. I tillegg kan forlenget absorpsjon av den injiserbare farmasøytiske form oppnås ved å innbefatte midler som forsinker absorpsjonen, for eksempel aluminiummonostearat og gelatin.

Det skal forstås at doseringsordningen vil fastsettes av den behandlende lege, idet forskjellige faktorer som modifierer virkningen av den angjeldende forbindelsene ifølge oppfinnelsen (f. eks. ActRIIa-polypeptider) tas i betraktning. De forskjellige faktorene omfatter, men er ikke begrenset til, den ønskede mengde benvekt som skal dannes, graden av tap av bentetthet, setet for benskaden, tilstanden til det skadde ben, pasientens alder, kjønn og kosthold, omfanget av eventuelle sykdommer som kan bidra til bentap, tilførselstidspunktet og andre kliniske faktorer. Om ønskelig kan dosen variere med typen av matriks som anvendes i rekonstitusjonen og typene av for-

bindelser i sammensetningen. Tilsetning av andre kjente vekstfaktorer til den endelige sammensetning kan også påvirke dosen. Utviklingen kan følges ved periodevis vurdering av benvekst og/eller -reparasjon, for eksempel røntgenstråling (deriblant DEXA), histomorfometriske målinger og tetrasyklinmerking.

5 Eksperimenter med primater og mennesker har vist at virkninger av ActRIIa-Fc på ben kan påvises når forbindelsen doseres med tidsintervall og i mengder som er tilstrekkelige til å oppnå serumkonsentrasjoner på tilnærmet 200 ng/ml, hvor den halve maksimale virkning på anabolske biomarkører for ben opptrer ved en dose på 0,3 mg/kg eller en ekvivalent mengde uttrykt som areal under kurven. I mennesker kan et
10 serumnivå på 200 ng/ml oppnås med en enkelt dose på 0,1 mg/kg eller mer og et serumnivå på 1000 ng/ml kan oppnås med en enkelt dose på 0,3 mg/kg eller mer. Den observerte halveringstid i serum for molekylet er mellom tilnærmet 25 og 35 dager, vesentlig lenger enn for de fleste Fc-fusjonsproteiner, og følgelig kan et vedvarende effektivt serumnivå oppnås ved for eksempel dosering med tilnærmet 0,05 til 0,5
15 mg/kg ukentlig eller annenhver uke, eller det kan anvendes høyere doser med lengre tidsintervall mellom dosene. For eksempel kan doser på 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 1,2 eller 3 mg/kg eller verdier som ligger mellom disse anvendes hver måned eller annenhver måned, og virkningen på ben kan være tilstrekkelig varig til at dosering er nødvendig bare en gang hver 3., 4., 5., 6., 9. eller 12. måned eller sjeldnere. Lengre tidsintervaller
20 mellom dosene understøttes videre av varigheten av den farmakodynamiske virkningen, som er lenger enn varigheten av medikamentet i serum. PD-virkninger observeres i minst 120 dager i mennesker.

Genterapi kan anvendes for *in vivo*-produksjon av ActRIIa-polypeptider. Slik behandling vil nå sin terapeutiske virkning ved innføring av ActRIIa-polynukleotid-sekvensene i celler eller vev som har de forstyrrelser som er opplistet ovenfor. Tilførsel
25 av ActRIIa-polynukleotidsekvensene kan oppnås ved anvendelse av en rekombinant ekspresjonsvektor, for eksempel et kimært virus eller et kolloidalt dispersjonssystem. Foretrukket for terapeutisk tilførsel av ActRIIa-polynukleotidsekvenser er anvendelse av målstyrte liposomer.

30 Forskjellige virusvektorer som kan benyttes for genterapi som beskrevet heri omfatter adenovirus, herpesvirus, vaccinia eller, fortrinnsvis, et RNA-virus, for eksempel et retrovirus. Retrovirusvektoren er fortrinnsvis et derivat av et museretrovirus eller fugleretrovirus. Eksempler på retrovirusvektorer i hvilke et enkelt fremmed gen kan innsettes omfatter, men er ikke begrenset til: Moloney museleukemivirus
35 (MoMuLV), Harvey musesarkomvirus (HaMuSV), musebrysttumovirus (MuMTV) og Rous sarkomvirus (RSV). En rekke andre retrovirus kan inkorporere flere gener. Alle disse vektorene kan overføre eller inkorporere et gen for en seleksjonsmarkør, slik at transduserte celler kan påvises og fremstilles. Retrovirusvektorer kan gjøres målspesifikke ved for eksempel å tilkoble et sukker, et glykolipid eller et protein. Mål-

styring oppnås fortrinnsvis ved anvendelse av et antistoff. Fagfolk vil innse at spesifikke polynukleotidsekvenser kan innsettes i det retrovirale polynukleotid. I en foretrukket utførelse styres vektoren til ben eller brusk.

Alternativt kan vevskulturceller transfekteres direkte med plasmider som koder
 5 for de retrovirale strukturelle genene gag, pol og env ved konvensjonell kalsiumfosfat-transfeksjon. Disse cellene transfekteres så med vektorplasmidet som inneholder genene av interesse. De resulterende cellene frigjør retrovirusvektoren til dyrkningsmediet.

Et annet målstyringssystem for ActRIIa-polynukleotider er et kolloidalt
 10 dispersjonssystem. Kolloidale dispersjonssystemer omfatter makromolekylkomplekser, nanokapsler, mikrokuler, kuler og lipidbaserte systemer som omfatter olje-i-vann-emulsjoner, miceller, blandede miceller og liposomer. Et foretrukket kolloidalt system er et liposom. Liposomer er kunstige membranvesikler som er anvendes som tilførselsbærere *in vitro* og *in vivo*. RNA, DNA og intakte virioner kan innkapsles i det vandige
 15 indre og tilføres til celler i en biologisk aktiv form (se f. eks. Fraley et al., Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Fremgangsmåter for effektiv genoverføring ved anvendelse av en liposombærer er velkjente innen faget, se f. eks. Mannino et al., Biotechniques, 6:682, 1988. Sammensetningen av liposomet er vanligvis en kombinasjon av fosfolipider, vanligvis i kombinasjon med steroider, fortrinnsvis kolesterol. Andre fosfo-
 20 lipider eller andre lipider kan også anvendes. De fysiske egenskapene til liposomer avhenger av pH, ionestyrke, og nærvær av divalente kationer.

Eksempler på lipider som er anvendbare for fremstilling av liposomer omfatter fosfatidylforbindelser, for eksempel fosfatidylglyserol, fosfatidylkolin, fosfatidylserin, fosfatidyletanolamin, sfingolipider, cerebrosider og gangliosider. Eksempler på fosfo-
 25 lipider omfatter fosfatidylkolin fra egg, dipalmitoylfosfatidylkolin og distearoylfosfatidylkolin, Målstyring av liposomer er også mulig, basert på for eksempel organspesifisitet, celledoesifisitet og organellespesifisitet, og er kjent innen faget.

EKSEMPLER

30 Eksempel 1: ActRIIa-Fc-fusjonsproteiner

Søkerne konstruerte et løselig ActRIIa-fusjonsprotein som har det ekstracellulære domene fra human ActRIIa fusjonert til et Fc-domene fra menneske eller mus, med en minimal linker mellom disse. Konstruksjonene betegnes ActRIIa-hFc henholdsvis ActRIIa-mFc.

35 ActRIIa-hFc vises nedenfor som det ble rensset fra CHO-cellelinjer (SEKV. ID. NR. 7):

ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
 CWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPMEVTVQPTSNPVTPK
PPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYCKVSNKALP
VPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSGDSFELYSKLTVDKSRWQOGNVEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

ActRIIa-hFc- og ActRIIa-mFc-proteinet ble uttrykt i CHO-cellelinjer. Tre forskjellige ledersekvenser ble tatt i betraktning:

- (i) Mellitin fra honningbie (HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEKV. ID. NR. 8)
- (ii) Vevsplasminogenaktivator (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEKV. ID. NR. 9)
- (iii) Nativ: MGAAAKLAFVFLISCSSGA (SEKV. ID. NR. 10).

Den valgte formen benytter TPA-ledersekvensen og har følgende uprosesserte aminosyresekvens:

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCY
 GDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEG
 NMCNEKFSYFPMEVTVQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
 DTLNISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNQKEYCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFELYSKLTVDKSRWQ
 QGNVEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEKV. ID. NR. 13)

Dette polypeptidet kodes av følgende nukleinsyresekvens:

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCT
 TCGTTTCGCCCCGGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTT
 TTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACCTGGTGTGAACCGTGTT
 ATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGG
 TTCCATTGAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACA
 GGACTGATTGTGTAGAAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGA
 GGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCGGAGATGGAAGTCACACAG
 CCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGGAACTCACACAT
 GCCCACCGTGCCACGACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC
 CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG
 GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC
 GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG
 CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGTCCCCATCGAGAAA
 ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC
 CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA
 GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
 AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT
 ATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
 GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
 GTCTCCGGGTAAATGAGAATTC (SEKV. ID. NR. 14)

Både ActRIIa-hFc og ActRIIa-mFc var bemerkelsesverdig mottakelige for
 rekombinant ekspresjon. Som vist i figur 1 ble proteinet rensset som en enkelt,
 veldefinert proteintopp. N-terminal sekvensering viste en enkelt sekvens som var
 5 -ILGRSTQE (SEKV. ID. NR. 11). Rensing kunne oppnås ved en serie av kolonne-
 kromatografitrinn, for eksempel innbefattende tre eller flere av følgende i hvilken som
 helst rekkefølge: protein A-kromatografi, Q sepharose-kromatografi, fenylsepharose-
 kromatografi, størrelseseksklusjonskromatografi og kationbytterkromatografi.
 Rensingen kunne fullføres med virusfiltrering og bufferutbytning. ActRIIa-hFc-
 10 proteinet ble rensset til en renhet på >98 % bestemt ved størrelseseksklusjons-
 kromatografi og >95 % bestemt ved SDS-PAGE.

ActRIIa-hFc og ActRIIa-mFc viste en høy affinitet for ligand, særlig akti vin
 A. GDF-11 eller aktivin A ("ActA") ble immobilisert til en Biacore CM5-brikke ved
 anvendelse av standard aminkoblingsfremgangsmåte. ActRIIa-hFc- og ActRIIa-mFc-
 15 protein ble innført i systemet og binding ble målt. ActRIIa-hFc bandt til aktivin med en
 dissosiasjonskonstant (K_D) på 5×10^{-12} og proteinet bandt til GDF11 med en K_D på
 $9,96 \times 10^{-9}$. Se figur 2. ActRIIa-mFc oppførte seg på tilsvarende måte.

En A-204 rapportørgenanalyse ble anvendt for å evaluere virkningene av
 ActRIIa-hFc-proteiner på signalisering via GDF-11 og aktivin A. Cellelinje: Humant

rabdomyosarkom (avledet fra muskel). Rapportørvektor: pGL3(CAGA) 12 (beskrevet i Dennier et al., 1998, EMBO 17:3091-3100). Se Figur 3. CAGA12-motivet foreligger i TGF-beta-responderende gener (PAI-1-gen), så denne vektoren kan anvendes generelt for faktorer som signaliserer via Smad2 og 3.

5 Dag 1: A-204-celler overføres til en 48-brønners plate.

Dag 2: A-204-celler transfekteres med 10 pg pGL3(CAGA)12 eller pGL3(CAGA)12 (10 µg) + pRLCMV (1 µg) og Fugene.

Dag 3: Faktorer tilsettes (fortynnet med medium + 0,1 % BSA). Inhibitorer må preinkuberes med faktorer i 1 time før tilsetning til cellene. 6 timer senere vaskes
10 cellene med PBS og lyses.

Dette følges av en luciferaseanalyse. Typisk vil i denne analysen aktivin A i fravær av inhibitorer vise grovt regnet 10 gangers stimulering av rapportørgenekspressjonen og en ED50- 2 ng/ml. GDF-11: 16 gangers stimulering, ED50: ~1,5 ng/ml. GDF-8 viser en virkning som tilsvarende den av GDF-11.

15 Som vist i figur 4 inhiberer ActRIIa-hFc og ActRIIa-mFc GDF-8-formidlet signalisering i pikomolare konsentrasjoner. Som vist i figur 5 inhiberte tre forskjellige preparater av ActRIIa-hFc GDF-11-signalisering med en IC50 på tilnærmet 200 pM.

ActRIIa-hFc var svært stabilt i farmakokinetiske undersøkelser. Rotter ble dosert med 1 mg/kg, 3 mg/kg eller 10 mg/kg ActRIIa-hFc-protein og plasmanivået av proteinet ble målt etter 24, 48, 72, 144 og 168 timer. I en separat undersøkelse ble rotter dosert med 1 mg/kg, 10 mg/kg eller 30 mg/kg. I rotter hadde ActRIIa-hFc en halveringstid i serum på 11-14 dager, og nivået av medikamentet i sirkulasjonen var temmelig høyt eller to uker (11 µg/ml, 110 µg/ml eller 304 µg/ml for innledende
20 tilførsel av 1 mg/kg, 10 mg/kg henholdsvis 30 mg/kg). I krabbemakak var halveringstiden i plasma vesentlig lenger enn 14 dager, og nivået av medikamentet var 25 µg/ml,
25 304 µg/ml eller 1440 µg/ml for innledende tilførsel av 1 mg/kg, 10 mg/kg henholdsvis 30 mg/kg. Innledende forsøk i mennesker tyder på at halveringstiden i serum er mellom tilnærmet 20 og 30 dager.

30 Eksempel 2: ActRIIa-mFc fremmer benvekst *in vivo* (ikke en del av oppfinnelsen)

Normale hunmus (BALB/c) ble dosert med ActRIIa-mFc med 1 mg/kg/dose, 3 mg/kg/dose eller 10 mg/kg/dose, hvor dosene ble tilført to ganger i uken. Mineraltettheten og mineralinnholdet i ben ble bestemt ved hjelp av DEXA, se figur 6.

I BALB/c-mus viste DEXA-skann en signifikant økning (>20 %) av mineraltettheten og mineralinnholdet i ben som en følge av behandlingen med ActRIIa-mFc.
35 Se figurene 7 og 8.

Antagonisering av ActRIIa førte således til økt bentetthet og -innhold i normale hunmus. Som et neste trinn ble virkningen av ActRIIa-mFc på ben i en musemodell for osteoporose analysert.

Andersson et al. (2001) fastslo at ovariektomiserte mus opplevde et vesentlig tap av ben (grovt regnet 50 % tap av spongiøst ben 6 uker etter operasjonen) og at tap av ben i disse rottene kunne motvirkes med kandidater til terapeutiske midler, for eksempel parathormon.

5 Søkerne anvendte C57BL6-hunrotter som ble ovariektomisert (OVX) eller narreoperert ved en alder på 4-5 uker. Åtte uker etter inngrepet ble behandling med ActRIIa-mFc (10 mg/kg to ganger i uken) eller kontroll (PBS) innledet. Bentettheten ble målt med en CT-skanner.

10 Som vist i figur 9 hadde ubehandlede, ovariektomiserte mus et omfattende tap av tettheten av spongiøst ben etter seks uker, sammenlignet med de narreopererte kontrolldyrene. Behandling med ActRIIa-mFc førte til at bentettheten ble gjenopprettet til samme nivå som i de narreopererte musene. Etter 6 og 12 ukers behandling førte ActRIIa-mFc til en vesentlig økning av spongiøst ben i OVX-mus. Se figur 10. Etter 6 ukers behandling var bentettheten 24 % høyere enn i PBS-kontrollene. Etter 12 uker
15 var tettheten 27 % høyere.

I de narreopererte musene førte ActRIIa-mFc også til en vesentlig økning av spongiøst ben. Se figur 11. Etter 6 og 12 uker ga behandlingen en økning på 35 % sammenlignet med kontrollene.

20 I et ekstra sett av eksperimenter ble ovariektomiserte (OVX) eller narreopererte mus som beskrevet ovenfor behandlet med ActRIIa-mFc (10 mg/kg to ganger i uken) eller kontroll (PBS) over tolv uker. På tilsvarende måte som i resultatene beskrevet ovenfor for ActRIIa-mFc viste OVX-mus som ble tilført ActRIIa-mFc en økning av tettheten av spongiøst ben på 15 % allerede etter fire uker og 25 % etter 12 ukers behandling (Figur 12). Narreopererte mus som ble tilført ActRIIa-mFc viste på
25 tilsvarende måte en økning av tettheten av spongiøst ben på 22 % allerede etter fire uker og 32 % etter 12 ukers behandling (Figur 13).

Etter tolv ukers behandling med ActRIIa-mFc viste DEXA-analyse av hele kroppen og lårben *ex vivo* at behandlingen induserer en økning av bentettheten, både hos ovariektomiserte og narreopererte mus (Figur 14A henholdsvis 14B). Disse
30 resultatene understøttes også av *ex vivo*-pQCT-analyse av lårbenets midtstykke, som viste en signifikant økning av tettheten av både totalben og kortikalt ben etter 12 ukers behandling med ActRIIa-mFc. Bærerbehandlede, ovariektomiserte kontrollmus viste en bentetthet som var sammenlignbar med bærerbehandlede, narreopererte kontrollmus (Figur 15). I tillegg til bentettheten økte også beninnholdet etter behandling med
35 ActRIIa-mFc. *Ex vivo*-pQCT-analyse av lårbenets midtstykke viste en signifikant økning av innholdet av både totalben og kortikalt ben etter 12 ukers behandling med ActRIIa-mFc, mens både ovariektomiserte og narreopererte, bærerbehandlede kontrollmus viste et sammenlignbart innhold av ben (Figur 16). *Ex vivo*-pQCT-analyse av lårbenets midtstykke viste også at ActRIIa-mFc-behandlede mus ikke hadde en endring

av periost-omkretsen, mens behandling med ActRIIa-mFc førte til en reduksjon av endost-omkretsen, noe som indikerer en økning av den kortikale tykkelse grunnet vekst på den indre overflaten av lårbenet (Figur 17).

Mekanisk analyse av lårben viste at ActRIIa-mFc var i stand til å øke benets ytre egenskaper (maksimal belastning, stivhet og tilført energi før brudd), noe som bidro til en signifikant økning av benets indre egenskaper (den endelige styrke). Ovariektomiserte mus behandlet med ActRIIa-mFc viste en økt benstyrke til et nivå som var høyere enn i narreopererte, bærerbehandlede kontrollmus, noe som indikerer en fullstendig reversering av den osteoporotiske fenotype (Figur 18).

Disse resultatene viser at en aktivin-ActRIIa-antagonist kan øke bentettheten i normale hunmus og videre korrigere defekter når det gjelder bentetthet, beninnhold og den endelige benstyrken i en musemodell for osteoporose.

I et videre sett av eksperimenter ble mus ovariektomisert eller narreoperert ved en alder på 4 uker og behandlet i 12 uker med enten placebo eller ActRIIa-mFc (2 ganger i uken, 10 mg/kg) (også betegnet RAP-11 i Figurene 19-24) fra og med en alder på 12 uker. En rekke forskjellige benparametere ble evaluert. Som vist i Figur 19 ga ActRIIa-mFc en økning av forholdet mellom volumet av vertebralt spongiøst ben og volumet av totalben (BV/TV) i både OVX-mus og narreopererte (SHAM) mus. ActRIIa-mFc forbedret også trabekelarkitekturen (Figur 20), økte den kortikale tykkelse (Figur 21) og forbedret benstyrken (Figur 22). Som vist i Figur 23 ga ActRIIa-mFc ønskelige virkninger i et doseringsområde fra 1 mg/kg til 10 mg/kg.

Histomorfometrisk analyse av ben ble utført etter to uker i narreopererte mus. Disse resultatene, som vises i Figur 24, viser at ActRIIa-mFc hadde dobbelt virkning og både inhiberte resorpsjonen av ben og fremmet veksten av ben. Således stimulerer ActRIIa benvekst (anabol virkning) og inhiberer benresorpsjon (antikatabol virkning). BV = benvolum, TV = totalt vevsvolum. BV/TV er et mål på prosentandelen av ben som er mineralisert. ES = erodert overflate, BS = benoverflate. ES/BS er et mål på benerosjon, og reduksjonen som RAP-011 forårsaker viser en antiresorptiv eller antikatabol virkning. Ms/Bs er forholdet mellom mineraliserende overflate og benoverflate, som er en indikator på benvekst eller anabol virkning. På tilsvarende måte viser mineraldeponeringshastigheten (MAR) og bendannelseshastighet pr. benoverflate pr. dag (BFR/BSd) benvekst. Målinger av osteoblaster (Nob/BPm) og osteoklaster (Noc/BPm) utføres for å undersøke virkningsmekanismen.

Et andre histomorfometrisk eksperiment ble utført i C57BL/6-hunmus med begynnelse ved en alder på 12 uker. Musene ble dosert intraperitonealt to ganger i uken med 10 mg/kg ActRIIa-mFc i to uker, fire uker, åtte uker og tolv uker. Hver gruppe ble avlivet fem dager etter siste dose og ben tatt ut for analyse. Musene ble kalseinmerket ni dager og to dager før avlivningen. Som vist i Figur 25 viser målingene at ActRIIa-mFc fremmer benvekst og -mineralisering og har både anabole og antikatabole

virksomheter. Se for eksempel BV/TV-forholdet, ES/BS-forholdet og MS/BS-forholdet. De anabole virkningene ser ut til å vedvare gjennom hele doseringsordningen, mens de antiresorptive virkningene ser ut til å være mer kortvarige i musene.

5 Eksempel 3: ActRIIa-mFc lindrer eller forhindrer benskade i en musemodell for multiple myelomer

Pasienter med multiple myelomer viser en bentapsforstyrrelse som særpreges ved forhøyet osteoklastaktivitet og redusert dannelse av ben fra osteoblaster. 5T2MM-modellen for myelomer i mus bygger på anvendelse av tumorceller (5T2MM-celler) fra
10 en type av spontan tumor som utvikles i eldre mus og fører til virkninger i musene som tilsvarer dem som kan observeres i menneskelige pasienter med multiple myelomer. Se f. eks. Vanderkerken et al., Methods Mol Med. 2005, 113:191-205. ActRIIa-mFc ble analysert for virkninger i denne modellen.

5T2MM-celler injisert i C57Bl/KaLwRij-mus fremmet en økning av
15 osteoklastoverflaten, dannelse av osteolytiske lesjoner og førte til en reduksjon av benarealet. Bensykdommen var forbundet med et redusert antall osteoblaster, redusert osteoblastoverflate og redusert mineralisering.

Mus som bar 5T2MM-celler ble behandlet med ActRIIa-mFc (RAP-011) (10 mg/kg, i.p. to ganger i uken) eller en bærer fra tidspunktet for injeksjon av 5T2MM og i alt 12 uker. MikroCT-analyse av det proksimale skinneben og lumbale ryggvirvler viste en reduksjon på 39 % og 21 % av volumet av spongiøst ben ($p<0,001$ og $p<0,01$) og en reduksjon på 37 % og 15 % av trabekeltallet ($p<0,01$ og $p<0,05$) i 5T2MM-bærende mus sammenlignet med friske mus. RAP-011 forhindret fullstendig 5T2MM-induserte reduksjoner av trabekelvolumet og antall trabekler i både skinneben ($p<0,001$
20 og $p<0,01$) og ryggvirvler ($p<0,01$ og $p<0,05$) sammenlignet med bærerbehandlete mus. Benvolumet var 19 % høyere i skinnebenet ($p=168$) og 12 % høyere i ryggvirvlene ($p<0,05$) i RAP-011-behandlede mus sammenlignet med friske mus. RAP-011 forhindret utviklingen av osteolytiske benlesjoner ($p<0,05$). Denne virkningen illustreres i Figur 26. Mens en innledende vurdering av resultatene ikke viste
30 signifikante virkninger på paraprotein i serum (en biomarkør for multippelt myelom-tumorceller) eller myelombelastningen i denne undersøkelsen, indikerte en videre analyse at paraprotein i serum var vesentlig redusert i alle de behandlede dyrene bortsett fra ett, og videre at volumet av frisk benmarg var vesentlig forhøyet, noe som indikerer en reduksjon av myelomtumorcellebelastningen.

35 Følgelig kan ActRIIa-mFc anvendes for å redusere virkningene av bensykdom som følge av multiple myelomer og for behandling av selve tumorcellene.

Eksempel 4: Karakterisering av et ActRIIa-hFc-protein

ActRIIa-hFc-fusjonsprotein ble uttrykt i stabilt transfekterte CHO-DUKX B11-celler fra en pAID4-vektor (SV40-ori/enhancer, CMV-promoter) ved anvendelse av en vevsplasminogen-ledersekvens ifølge SEKV. ID. NR. 9. Proteinet, rensset som

5 beskrevet ovenfor i Eksempel 1, hadde sekvensen ifølge SEKV. ID. NR. 7. Fc-delen er en human IgG1-Fc-sekvens, som vist i SEKV. ID. NR. 7. Sialinsyreanalyse viste at proteinet gjennomsnittlig inneholdt mellom tilnærmet 1,5 og 2,5 mol sialinsyre pr. molekyl ActRIIa-hFc-protein.

Dette rensede proteinet viste en bemerkelsesverdig lang halveringstid i serum

10 hos alle analyserte dyr, deriblant en halveringstid på 25-32 dager i menneskelige pasienter (se Eksempel 5 nedenfor). I tillegg har det CHO-celleuttrykte materialet en høyere affinitet for aktivin B-ligand enn hva som er rapportert for et ActRIIa-hFc-fusjonsprotein uttrykt i humane 293-celler (del Re et al., J Biol Chem. 2004 17. desember, 279(51): 53126-35). I tillegg ga anvendelsen av tPa-ledersekvensen en

15 høyere produksjon enn andre ledersekvenser og ga, i motsetning til ActRIIa-Fc uttrykt med en nativ ledersekvens, en svært ren N-terminal sekvens. Anvendelse av den native ledersekvensen førte til to hovedtyper av ActRIIa-Fc med forskjellige N-terminale sekvenser.

Eksempel 5: Human klinisk utprøving (ikke en del av oppfinnelsen)

Proteinet som er beskrevet i Eksempel 4 ble tilført til menneskelige pasienter i en randomisert, dobbeltblind, placebokontrollert utprøving som ble utført for primært å evaluere sikkerheten av proteinet i friske, postklimakteriske kvinner. Førtiåtte

individer ble randomisert i grupper på 6 for tilførsel av enten en enket dose av ActRIIa-hFc eller placebo (5 aktive: placebo). Doseringsnivået varierte fra 0,01 til 3,0 mg/kg

25 intravenøst (IV) og fra 0,03 til 0,2 mg/kg subkutan (SC). Alle individer ble fulgt i 120 dager. Individer ble ekskludert fra deltakelse i utprøvingen dersom de hadde tatt medikamenter som påvirker benmetabolismen i løpet av de siste 6 månedene før opptak i undersøkelsen. Sikkerhetsevalueringer ble utført for hver gruppe for å

30 bestemme doseeskalerings. I tillegg til farmakokinetiske (PK) analyser ble den biologiske aktiviteten av ActRIIa-hFc også vurdert ved måling av biokjemiske markører for bendannelse og -resorpsjon, samt FSH-nivået.

Ingen alvorlige uheldige hendelser ble rapportert i denne utprøvingen. De uheldige hendelsene var generelt milde og forbigående. Den innledende analysen av

35 uheldige hendelser omfattet hodepine, forhøyede laboratorieverdier, forkjølelses-symptomer, brekninger eller oppkast, intravenøs infiltrasjon og bloduttredelse på injeksjonsstedet.

PK-analyse av ActRIIa-hFc viste en lineær profil med dosen og en gjennomsnittlig halveringstid på tilnærmet 25-32 dager. Arealet under kurven (AUC) for

ActRIIa-hFc var lineært avhengig av dosen og absorpsjonen etter SC-dosering var i det vesentlige fullstendig (se Figur 27 og 28). Disse resultatene indikerer at SC er en ønskelig tilnærming for dosering, siden den gir ekvivalent biotilgjengelighet og halveringstid i serum av medikamentet, samtidig som man unngår det skarpe utslaget i serumkonsentrasjonen av medikamentet som er forbundet med de første få dagene med IV-dosering (se Figur 28). ActRIIa-hFc førte til en hurtig, vedvarende, doseavhengig økning av serumnivået av benspesifikk alkalisk fosfatase (BAP), som er en biomarkør for anabol benvekst, og en doseavhengig reduksjon av nivået av C-terminalt type 1 kollagen-telopeptid og tartratresistent sur fosfatase 5b, som er markører for ben-resorpsjon. Andre markører, for eksempel P1NP, viste ikke avgjørende resultater. BAP-nivåene viste nær mettende virkninger ved den høyeste dosen av medikament på 0,3 mg/kg, med økninger på opp til 3 mg/kg. Beregnet som sen sammenheng mellom farmakodynamisk virkning og AUC for medikamentet er EC50 51,465 (dager*ng/ml). Se Figur 29. Disse endringene i biomarkører for ben vedvarte i tilnærmet 120 dager for de høyeste dosenivåene som ble analysert. Det var også en doseavhengig reduksjon av FSH-nivået i serum som var i samsvar med en inhibering av aktivin.

En enkelt dose av ActRIIa-hFc tilført til friske, postklimakteriske kvinner var sikker og ble godt tolerert innen det analyserte doseringsområdet. De forlengede PK-virkningene og farmakodynamiske virkningene tyder på at intermitterende dosering vil være egnet for fremtidige utprøvnings. For eksempel kan dosering basert på halveringstiden i serum utføres på en månedlig basis eller rundt hver annen, tredje, fjerde, femte eller sjette uke. I tillegg, kunne, siden den farmakodynamiske virkningen varte langt lenger enn medikamentets serumresidens, doseringen utføres basert på den farmakodynamiske virkningen, hvilket vil si at dosering hver tredje måned eller hver annen, tredje, fjerde, femte, sjette eller til og med hver tolvte måned kan være effektivt for å oppnå den ønskede virkning i pasienter. Denne kliniske utprøvingen viser at ActRIIa-hFc i mennesker er et osteoanabolt middel med biologisk bevis for både økt bendannelse og redusert resorpsjon av ben.

Eksempel 6: Samtidig tilførsel av ActRIIa-mFc og et bisfosfonat

Bisfosfonater er en klasse av medikamenter som hyppig anvendes for behandling av forstyrrelser som er forbundet med lav mineraltetthet i ben, deriblant osteoporose og kreftrelatert bentap. Bisfosfonater har en kraftig anti-resorptiv aktivitet og inhiberer osteoklaster. Kanskje på grunn av at osteoklaster er nødvendige for både nedbrytning og vekst av ben, ser det ut til at bisfosfonater reduserer virkningene av parathormon (PTH), et av de eneste kjente anabole benvekstmidlene (Black et al., N Engl J Med. 2003, 25. september, 349(13):1207-15, Samadfam et al., Endocrinology. 2007, juni, 148(6):2778-87).

For å teste anvendbarheten av ActRIIa-Fc-behandling av pasienter som tidligere eller samtidig ble tilført bisfosfonat eller annen antiresorptiv behandling ble mus undersøkt med en kombinasjon av ActRIIa-mFc og zoledronat, en bisfosfonat-forbindelse. 12 uker gamle C57BL/6N-mus ble behandlet som følger:

Gruppe 1 PBS

Gruppe 2 ActRIIa-mFc (RAP-011) (10 mg/kg) to ganger i uken (med gruppe 3 og 4)

Gruppe 3 Zoledronsyre (ZOL) enkeltdose (20 mg/kg)

Gruppe 4 ZOL (1 dose), 3 dager senere ActRIIa-mFc (RAP-011 (1 mg/kg) to ganger i uken

Gruppe 5 ZOL (1 dose), 3 dager senere ActRIIa-mFc (RAP-011 (10 mg/kg) to ganger i uken

Total BMD ble bestemt ved hjelp av DEXA-skanning (PIXI) for dosering og etter 3 og 8 ukers behandling.

Som vist i Figur 30 økte total BMD markant i alle behandlingsgrupper, hvor kombinasjonen av ZOL og ActRIIa-mFc ga de største virkningene. Disse resultatene indikerer at ActRIIa-Fc-proteiner kan anvendes for å øke bentettheten, selv hos pasienter som har blitt gitt bisfosfonatbehandling.

Eksempel 7: ActRIIa-Fc lindrer eller forhindrer bentap grunnet metastaser av brystkreft (ikke en del av oppfinnelsen)

Det anslås at 67 til 75 % av all brystkreft metastaserer til ben, noe som fører til vesentlige skader på benstrukturen, økt risiko for brudd, smerte og andre bivirkninger. Vi analyserte virkningene av ActRIIa-Fc i en musmodell for brystkreft som har metastasert til ben.

En underlinje av den humane brystkreftcellelinjen MDA-MH-231 (klon 2287) ble dyrket *in vitro* og cellene høstet ved en tetthet på 5×10^6 celler/ml. MDA-MB-231 er en cellelinje som er svært kompetent til kimdannelse i ben og forårsakelse av benskader som tilsvarende hva som benmetastaser kan gi. 10 ml celler ble injisert i skinnebenet hos 6 uker gamle, atymiske, nakne hunn-mus på undersøkelsens dag 0. På undersøkelsens dag 10 ble musene tilført ActRIIa-mFc (10 mg/kg to ganger i uken subkutan) (n=8) eller PBS-bærer (n=7). Sykdomsutviklingen ble vurdert ved dobbel-energi røntgenabsorpsjonsmåling (PIXIMus) med ukentlige mellomrom. Musene ble behandlet med ActRIIa-mFc i 4 uker og så avlivet, og skinneben (både fra injiserte og tumorfrie mus) ble oppsamlet fra hvert dyr. Skinnebena ble behandlet og klargjort for mikroCT og histologisk analyse.

Intratibial injeksjon av MDA-MB-231-celler i atymiske nakne mus fremmet utviklingen av osteolytiske benlesjoner i de injiserte skinnebena sammenlignet med det

kontralaterale beinet. MikroCT-analyse av det proksimale skinneben viste en 62 %, reduksjon av volumet av spongiøst ben i det MDA-MB-231-bærende skinneben sammenlignet med det tumorfrie skinneben i mus behandlet med PBS-bærer. ActRIIa-mFc-behandling førte til en økning på 70 % eller 147 % i friskt henholdsvis tumor-
 5 bærende skinneben sammenlignet med bærer ($P < 0,001$ for begge). De tumorbærende skinneben fra ActRIIa-behandlede mus hadde en tilsvarende tetthet av spongiøst ben som det friske skinneben fra de bærestoffbehandlede musene ($p = 0,39$).

ActRIIa-mFc kan følgelig eliminere den benskade som er forbundet med nærvær av brysttumorer i benet.

Eksempel 8: Alternative ActRIIa-Fc-proteiner

En alternativ konstruksjon kan ha en delesjon av den C-terminale halen (de 15 siste aminosyrene i det ekstracellulære domenet fra ActRIIa. Sekvensen til en slik konstruksjon vises nedenfor (Fc-delen er understreket) (SEKV. ID. NR. 12):

15 **ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQG
 CWLDDINCYDRITDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPMTGGQTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLEPPKPKDTLMISRTPEVTCVYVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTSKAKGPRE
POVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGEYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWOOQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

P a t e n t k r a v

1. Farmasøytisk sammensetning omfattende et ActRIIa-Fc-fusjonsprotein uttrykt
5 fra CHO-celler, hvor ActRIIa-Fc-proteinet er en dimer dannet av to polypeptider som
hvert har en aminosyresekvens som er minst 90 % til 95 % identisk med aminosyre-
sekvensen ifølge SEKV. ID. NR. 7 sammenkoblet ved disulfidbinding, og hvor
dimeren har mellom 3 og 5 sialinsyregrupper.
- 10 2. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 1, hvor ActRIIa-Fc-fusjonsproteinet
er en dimer dannet av to polypeptider ifølge SEKV. ID. NR. 7 og hvor et av
polypeptidene eller begge om ønskelig har en aminosyre mindre i amino- eller
karboksyenden enn hva som vises i SEKV. ID. NR. 7.
- 15 3. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 1 eller krav 2, hvor ActRIIa-Fc-
fusjonsproteinet er rekombinant uttrykt i CHO-celler ved anvendelse av TPA-
ledersekvensen ifølge SEKV. ID. NR. 9.
4. Farmasøytisk sammensetning ifølge ethvert av de foregående krav, hvor
20 dimeren har 4 sialinsyregrupper.
5. Farmasøytisk sammensetning ifølge ethvert av de foregående krav, hvor
ActRIIa-Fc-fusjonsproteinet har en halveringstid i serum på gjennomsnittlig 25 til 32
dager i normale, friske mennesker og ekvivalent biotilgjengelighet ved intravenøs og
25 subkutan tilførsel.
6. Farmasøytisk sammensetning ifølge ethvert av de foregående krav, hvor den
farmasøytiske sammensetningen er egnet for subkutan tilførsel.
- 30 7. Farmasøytisk sammensetning ifølge ethvert av de foregående krav, hvor
ActRIIa-Fc-fusjonsproteinet er minst 90 % rent når det gjelder andre proteinbestand-
deler.
8. Farmasøytisk sammensetning ifølge ethvert av de foregående krav, hvor
35 ActRIIa-Fc-fusjonsproteinet omfatter to eller flere modifiserte aminosyrerester utvalgt
blant: en glykosylert aminosyre, en PEGylert aminosyre, en farnesylert aminosyre, en
acetylert aminosyre, en biotinyllert aminosyre, en aminosyre konjugert til en lipid-
gruppe og en aminosyre konjugert til et organisk derivatiseringsmiddel.

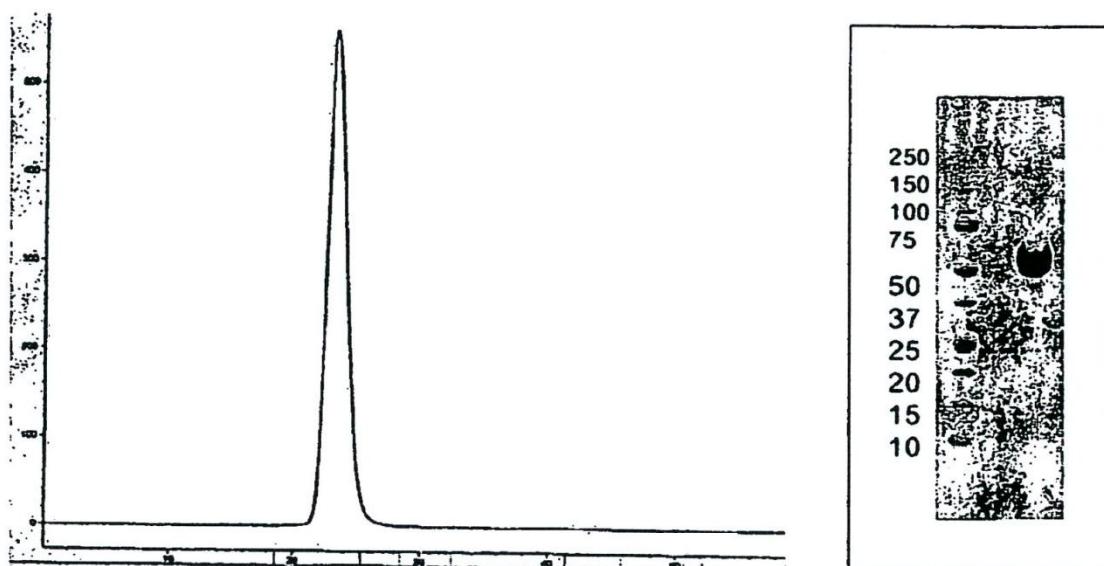
9. Farmasøytisk sammensetning ifølge ethvert av de foregående krav, videre omfattende et bisfosfonatmiddel.

5 10. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 9, hvor bisfosfonatmiddelet er utvalgt blant alendronat, ibandronat og risedronat.

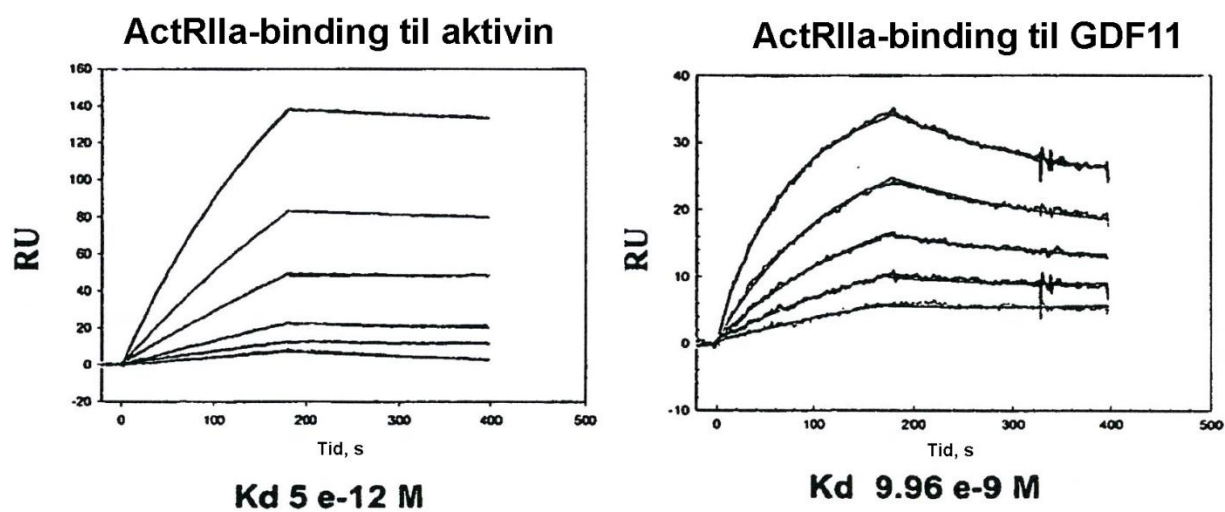
10 11. Farmasøytisk sammensetning omfattende et ActRIIa-Fc-fusjonsprotein for anvendelse for behandling eller forebyggelse av multiple myelomer i en menneskelig pasient, hvor den farmasøytiske sammensetningen er som definert i ethvert av kravene 1 til 10.

12. Anvendelse av et ActRIIa-Fc-fusjonsprotein for fremstilling av et medikament for behandling eller forebyggelse av multiple myelomer i en menneskelig pasient, hvor ActRIIa-Fc-fusjonsproteinet er som definert i ethvert av kravene 1 til 10.

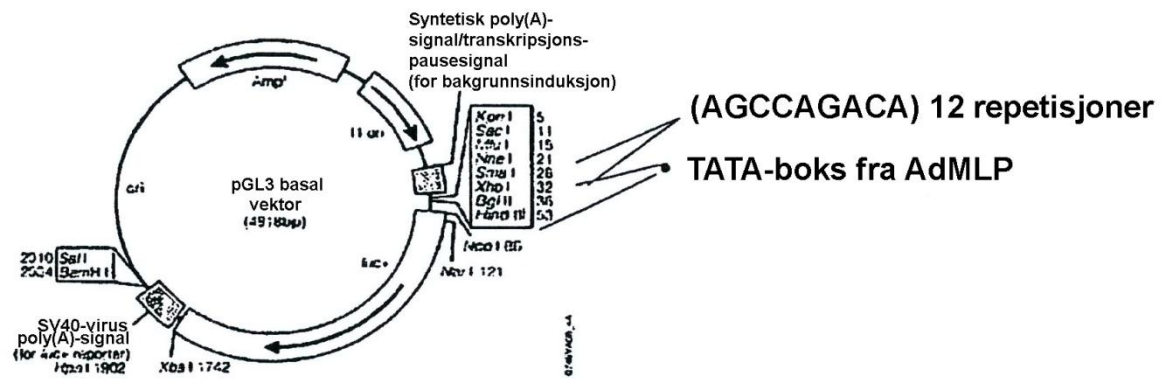
1/30



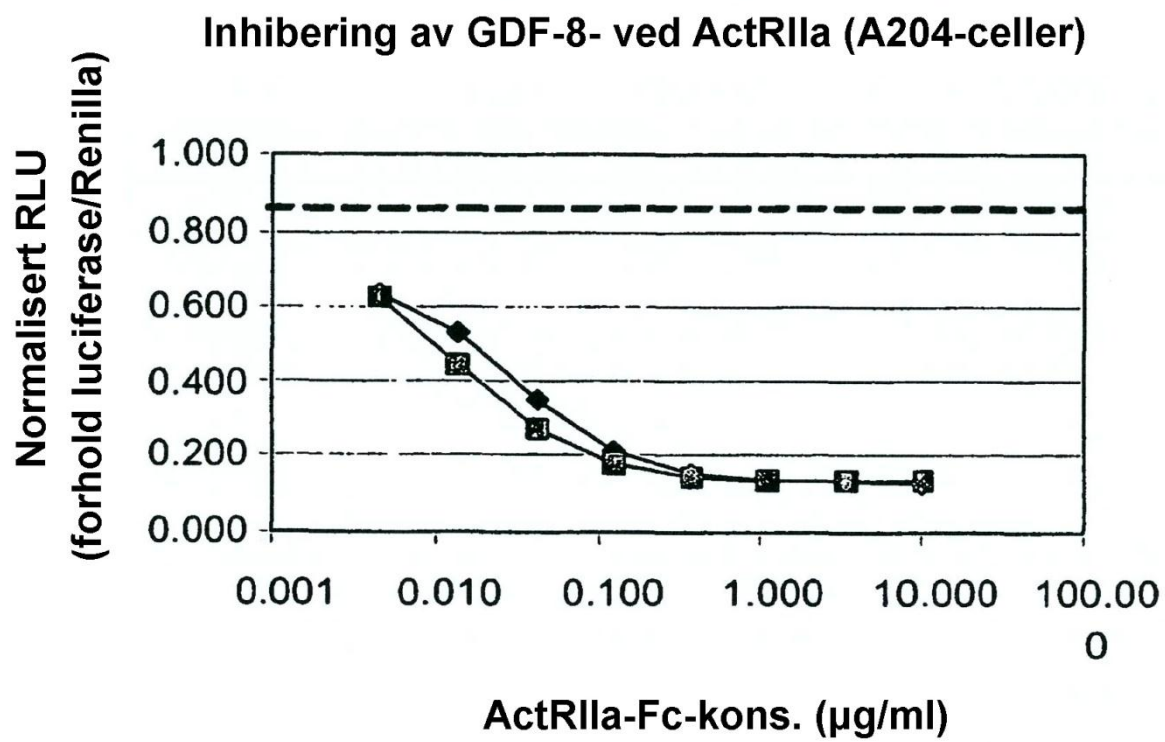
Figur 1



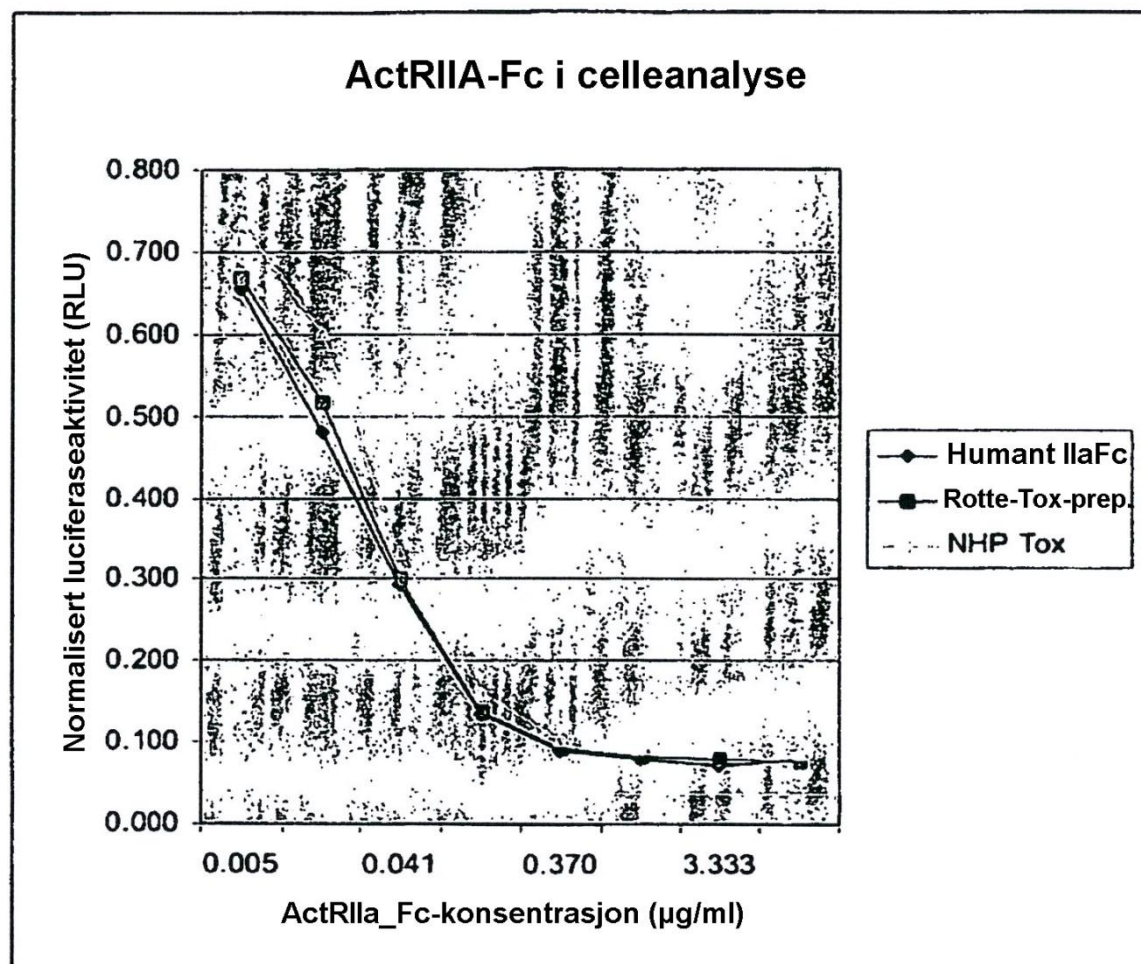
Figur 2



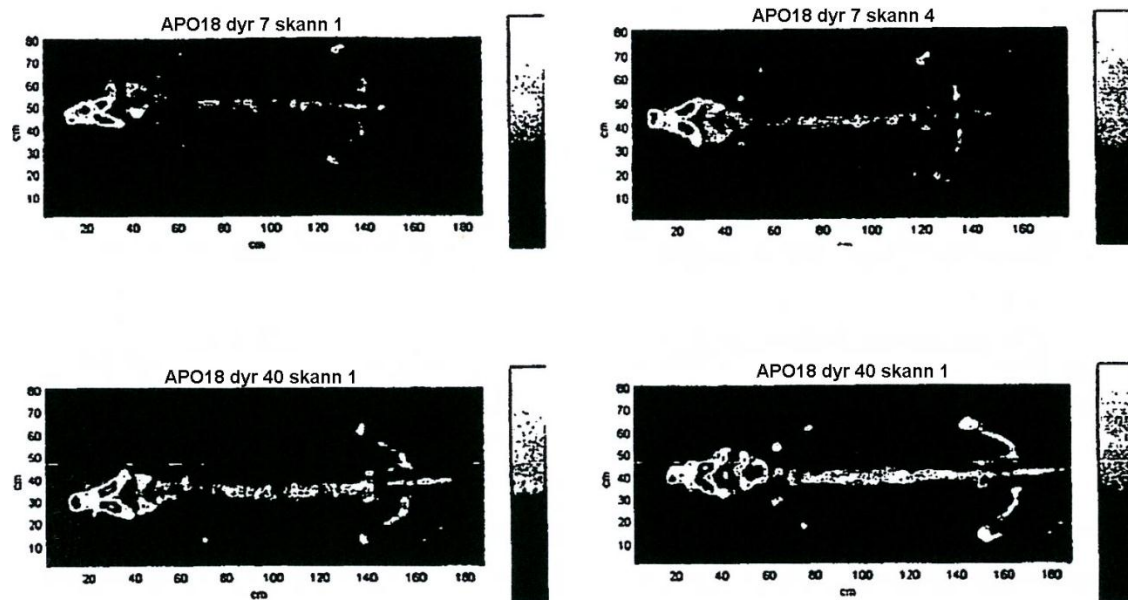
Figur 3



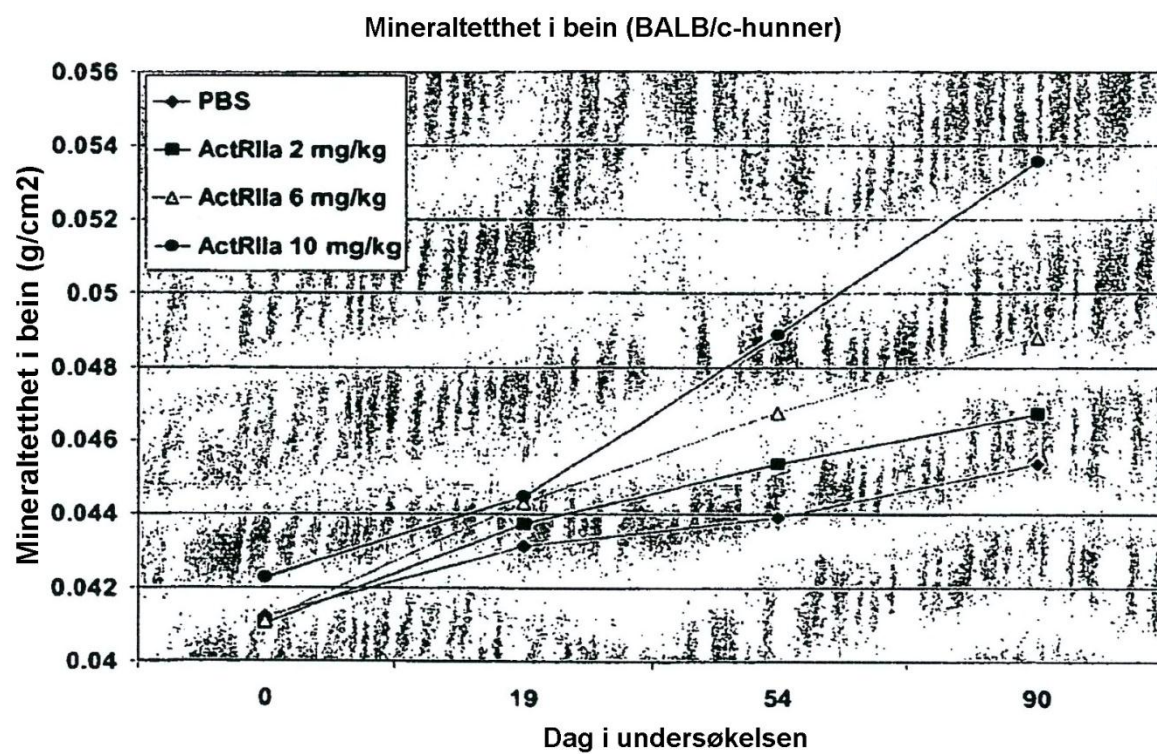
Figur 4



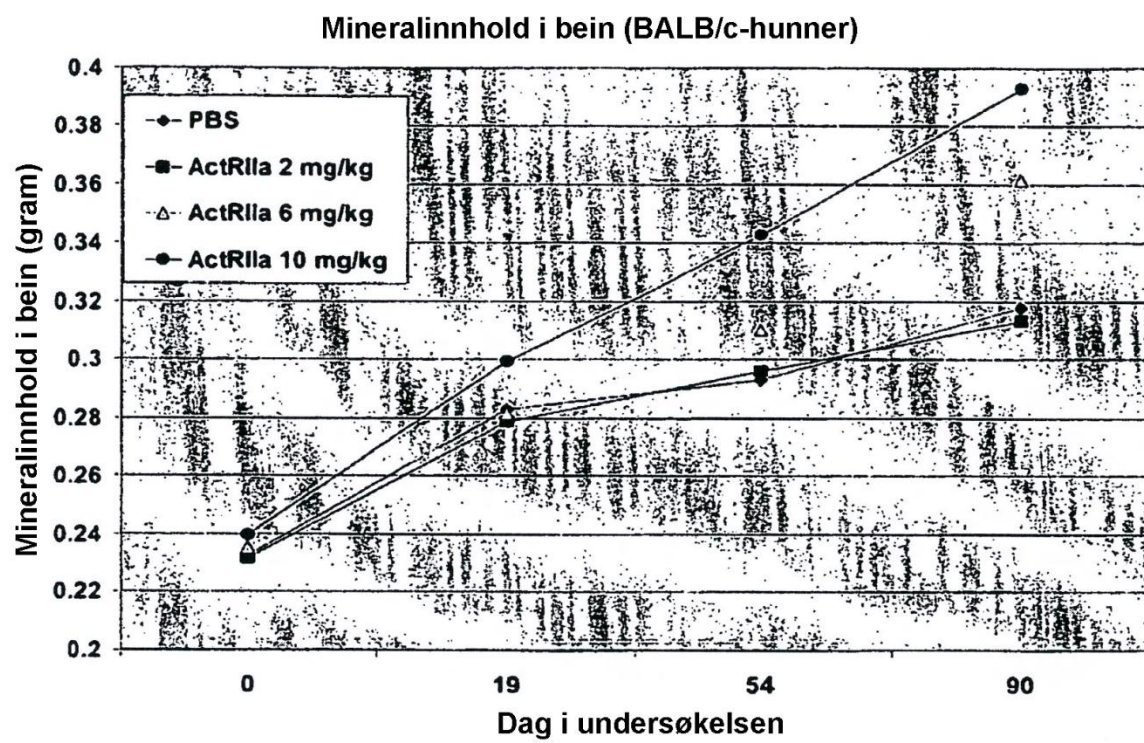
Figur 5



Figur 6

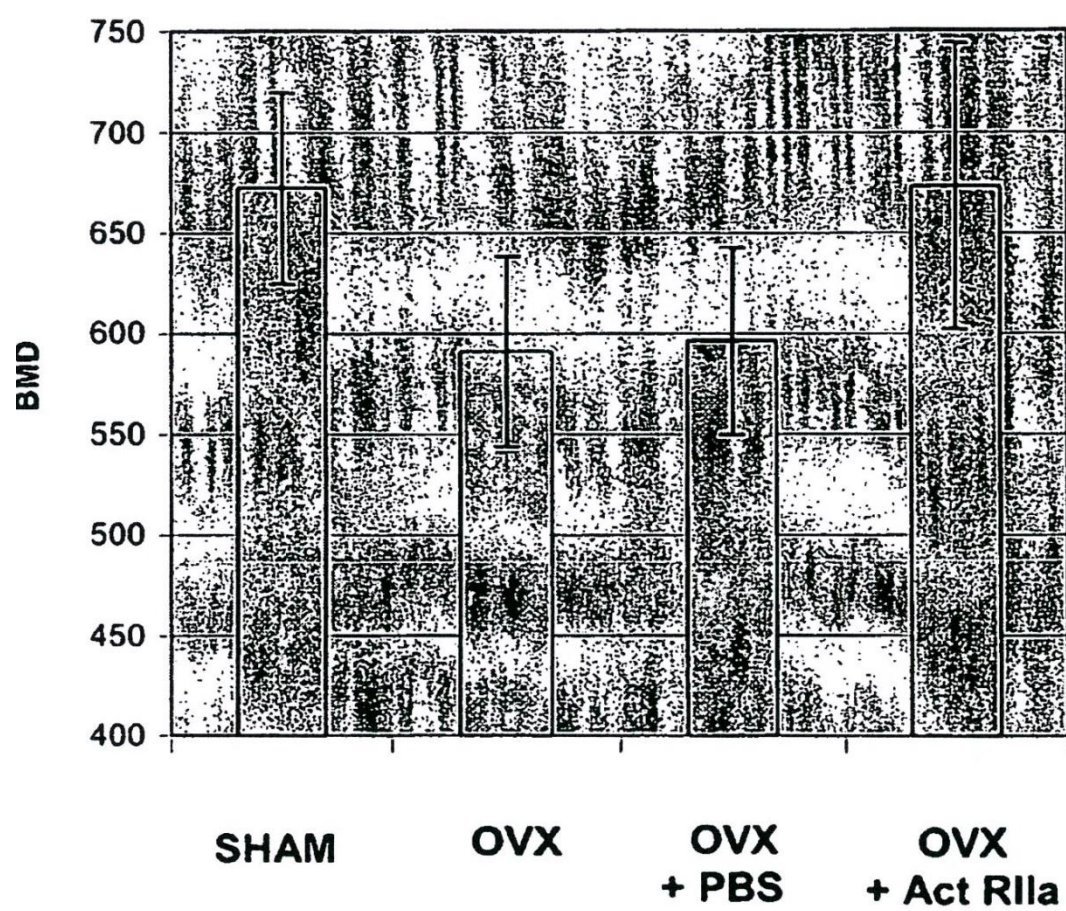


Figur 7

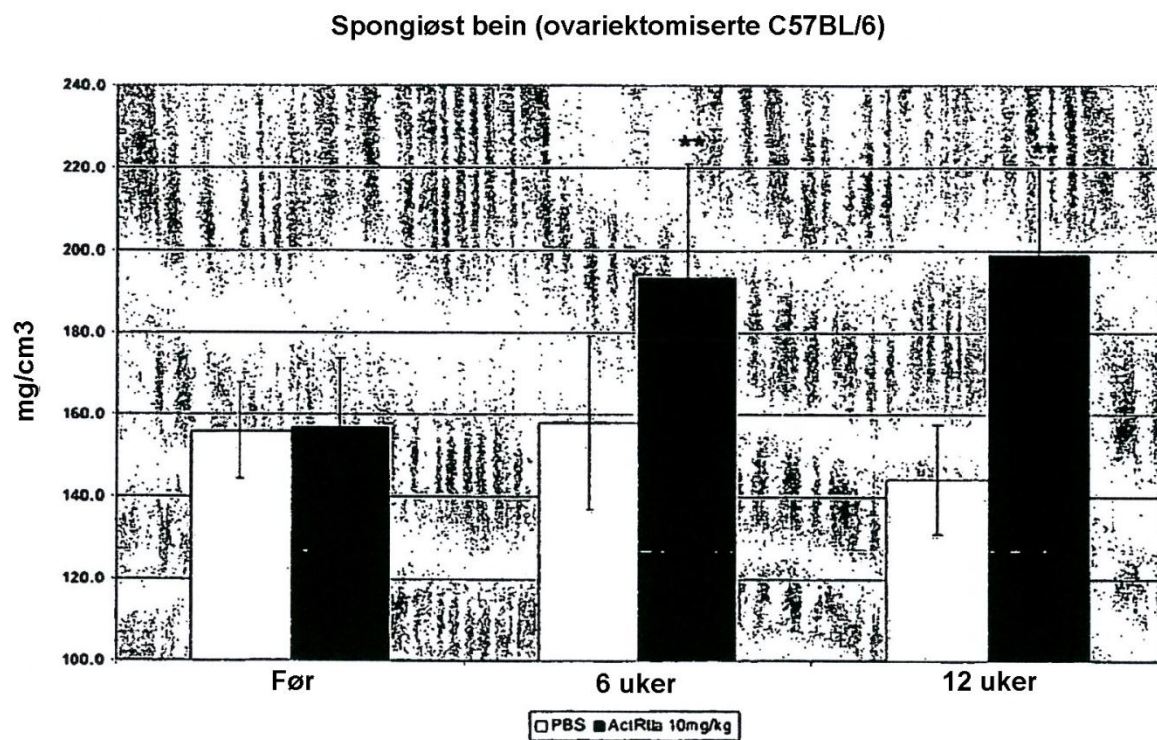


Figur 8

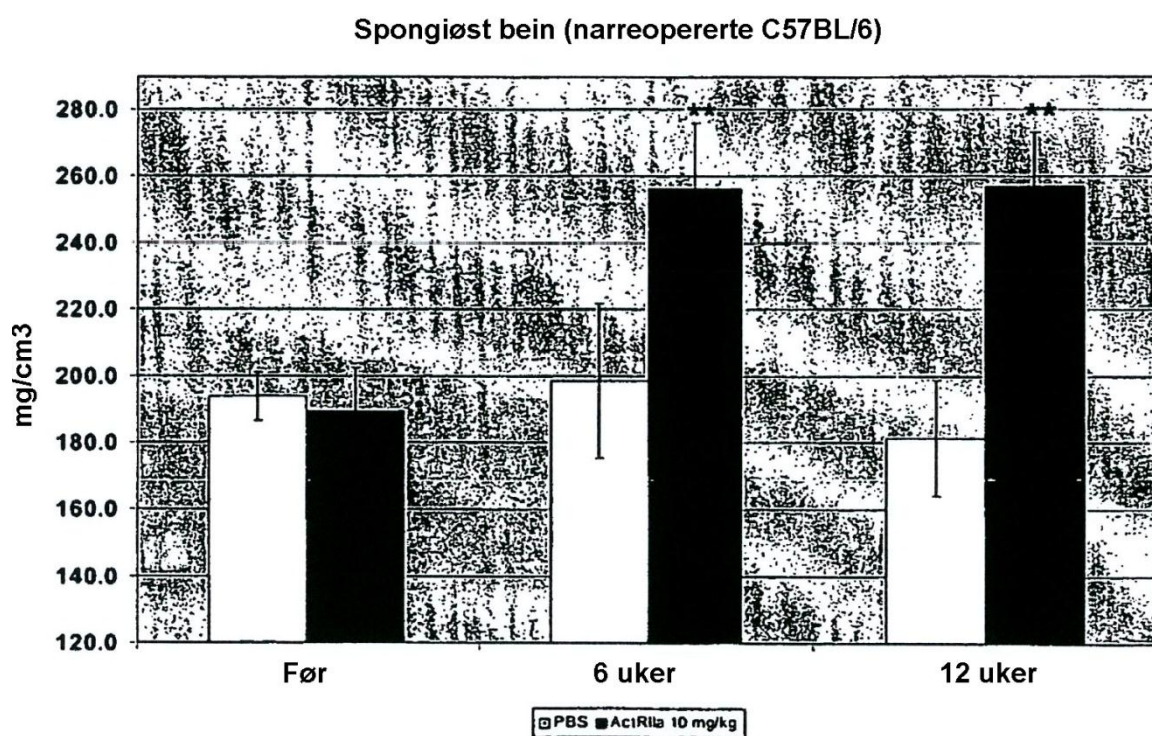
9/30



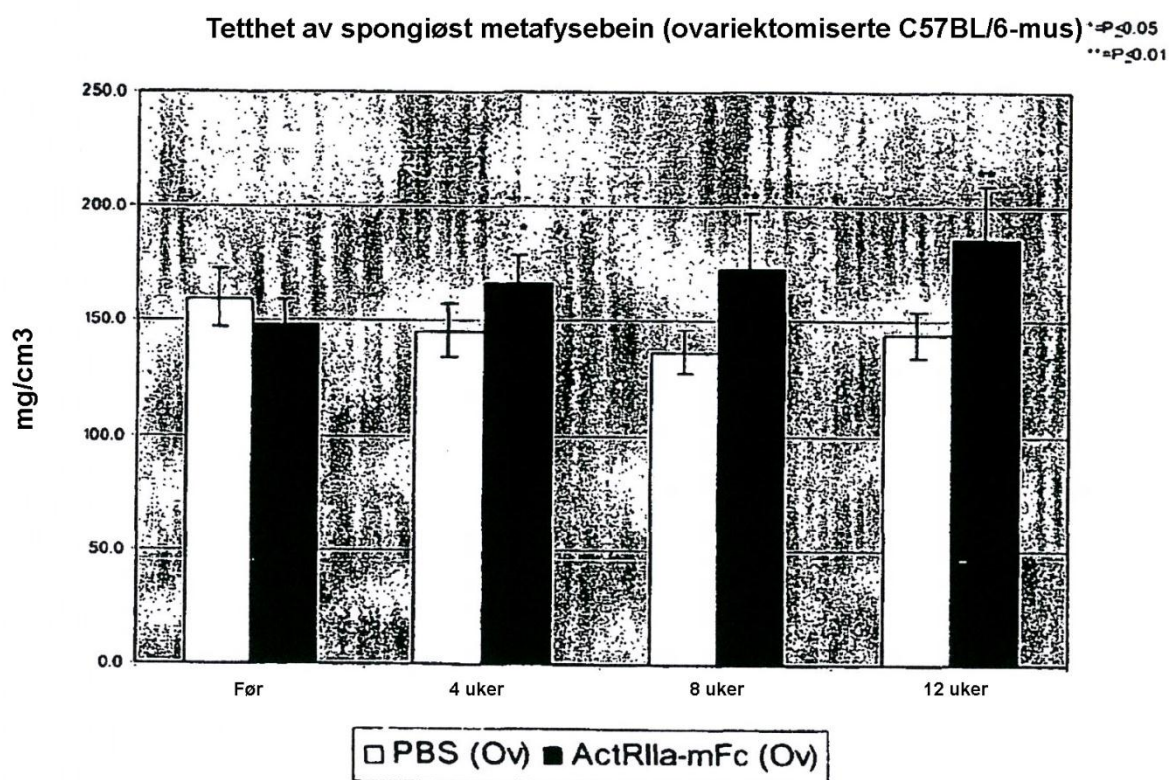
Figur 9



Figur 10

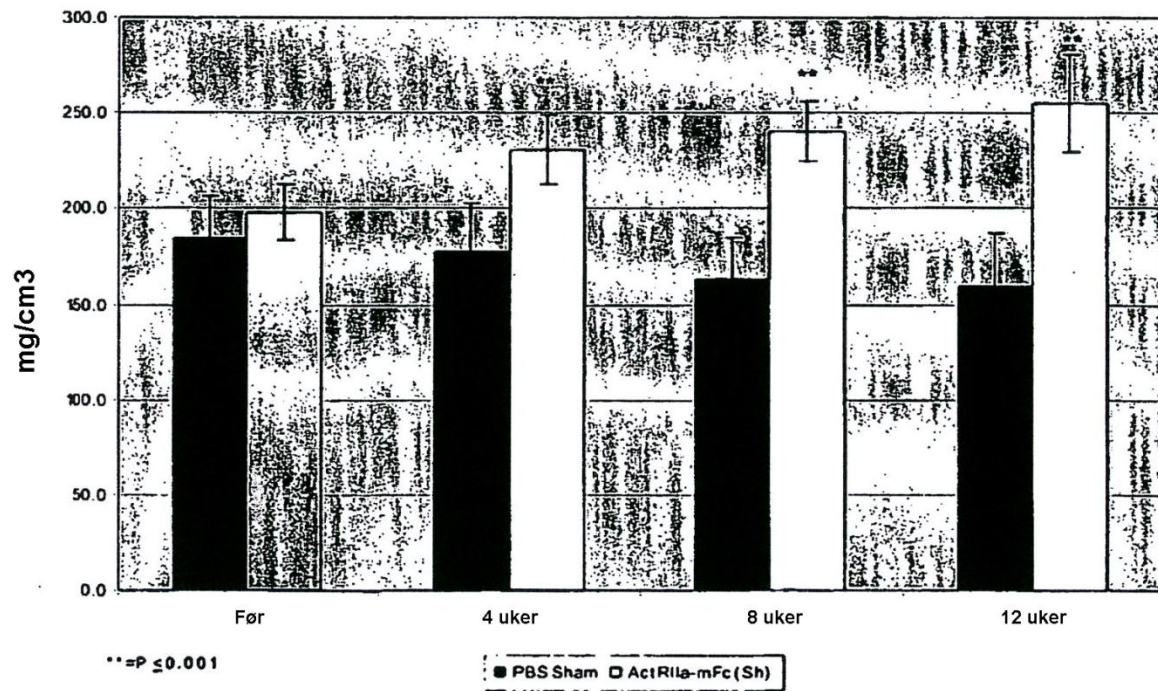


Figur 11

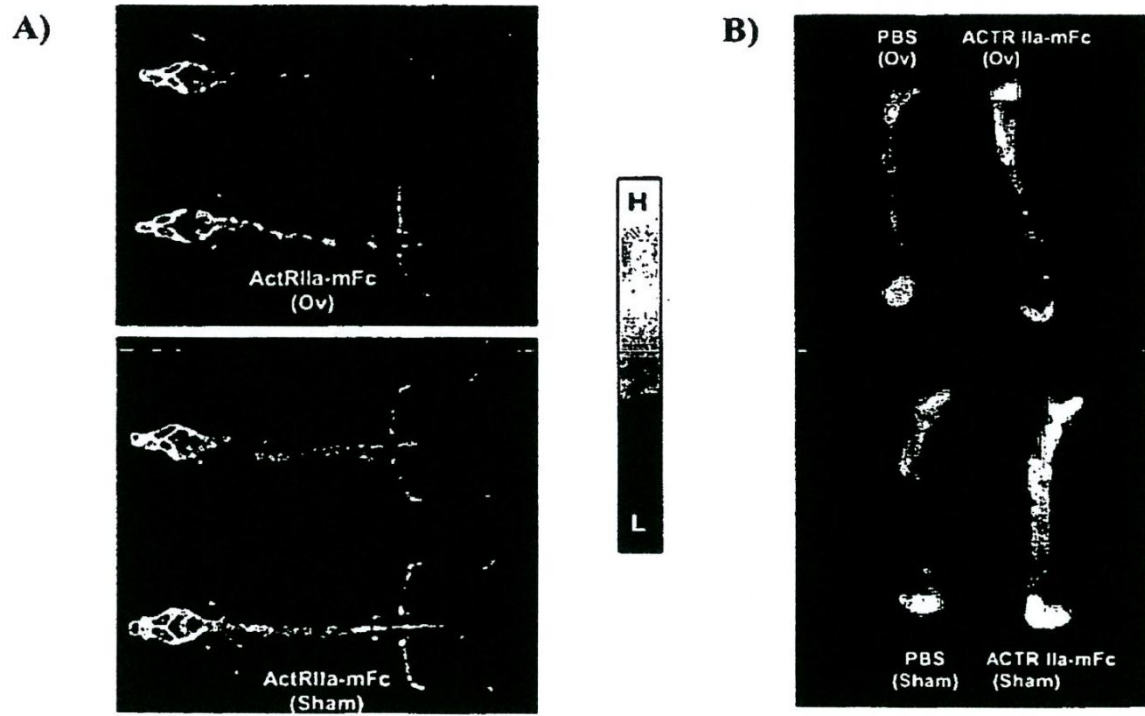


Figur 12

Tetthet av spongiøst metafysebein (narreopererte C57BL/6-mus)

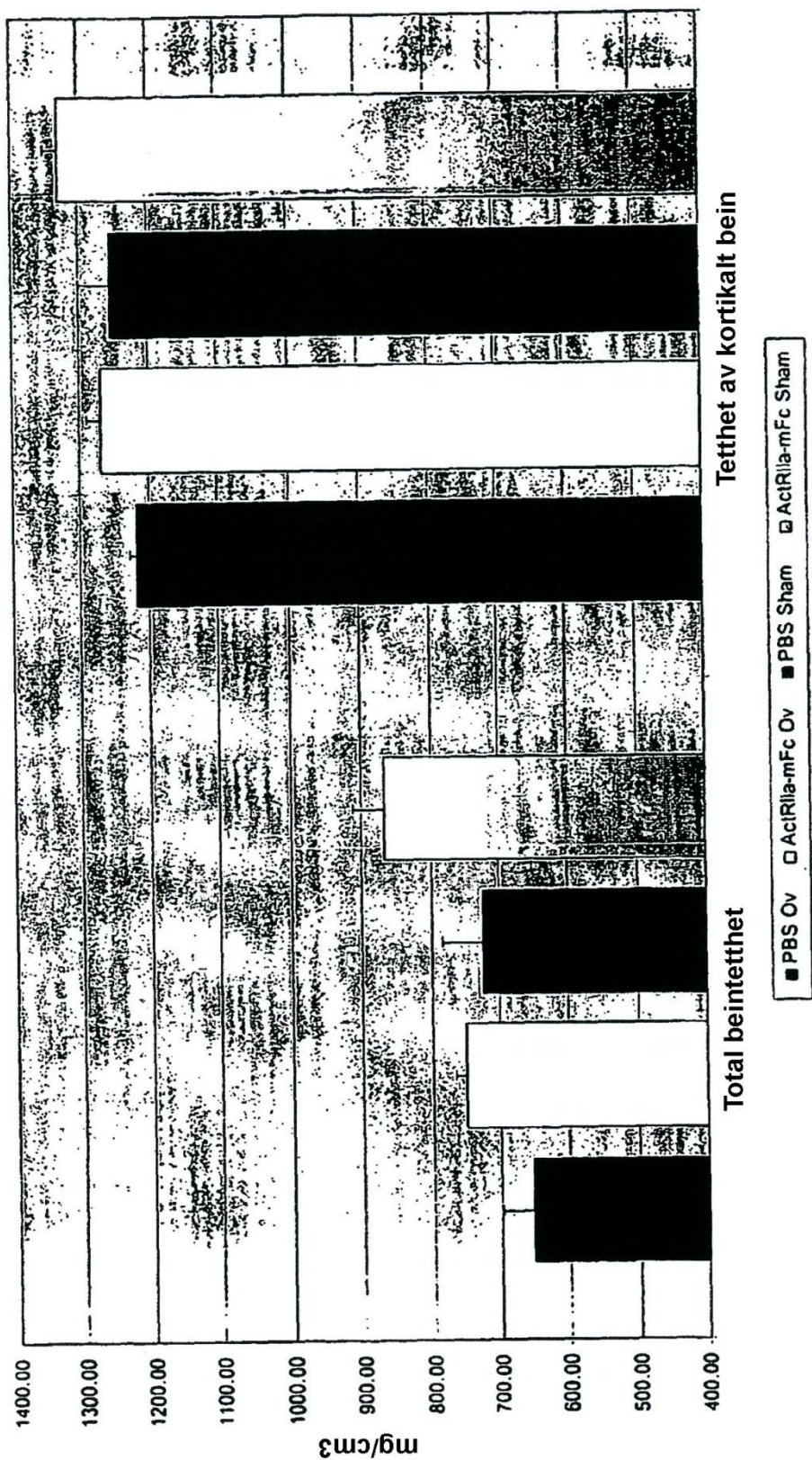


Figur 13



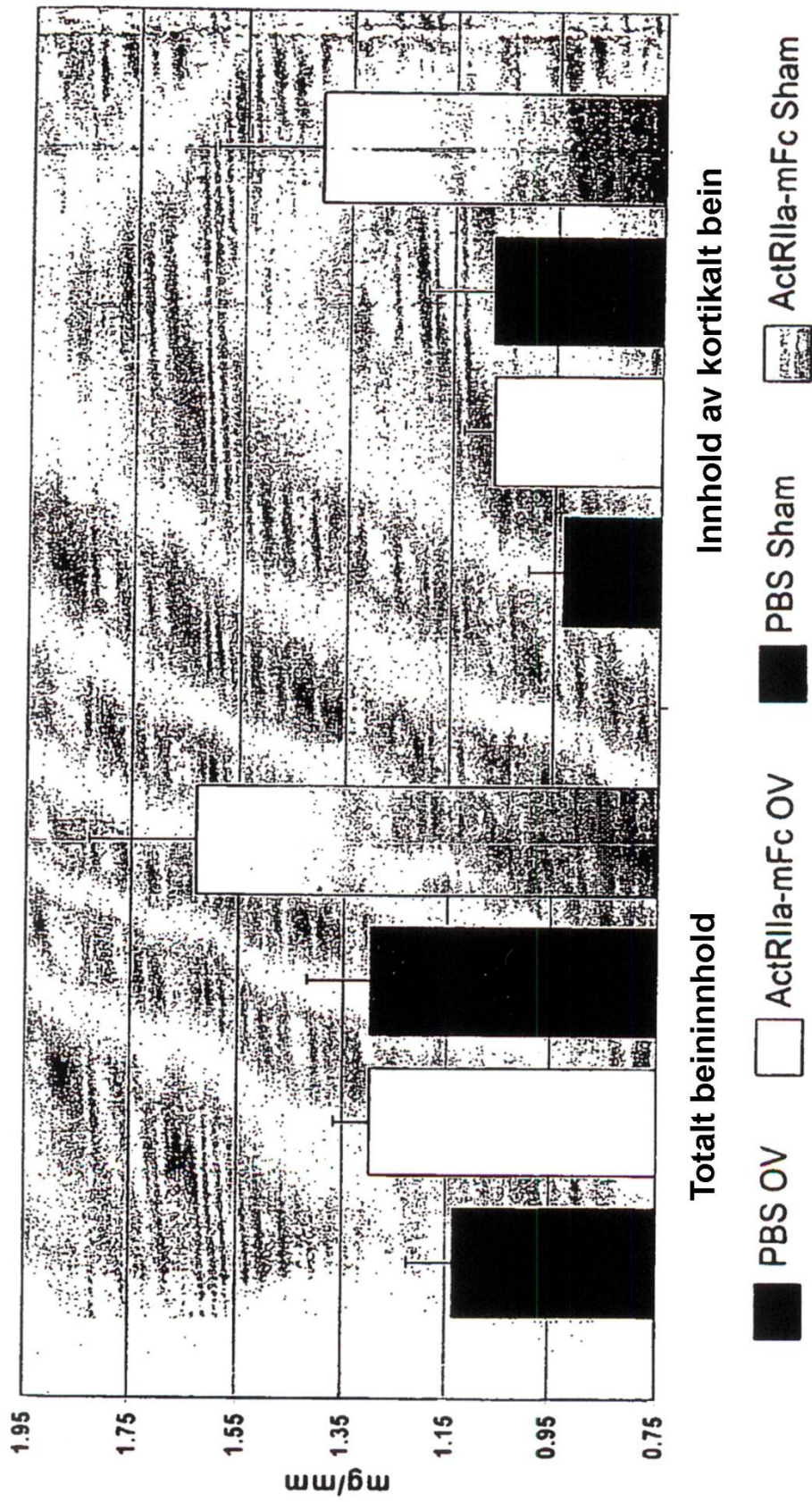
Figur 14

Ex vivo-beintetthet i lårbein



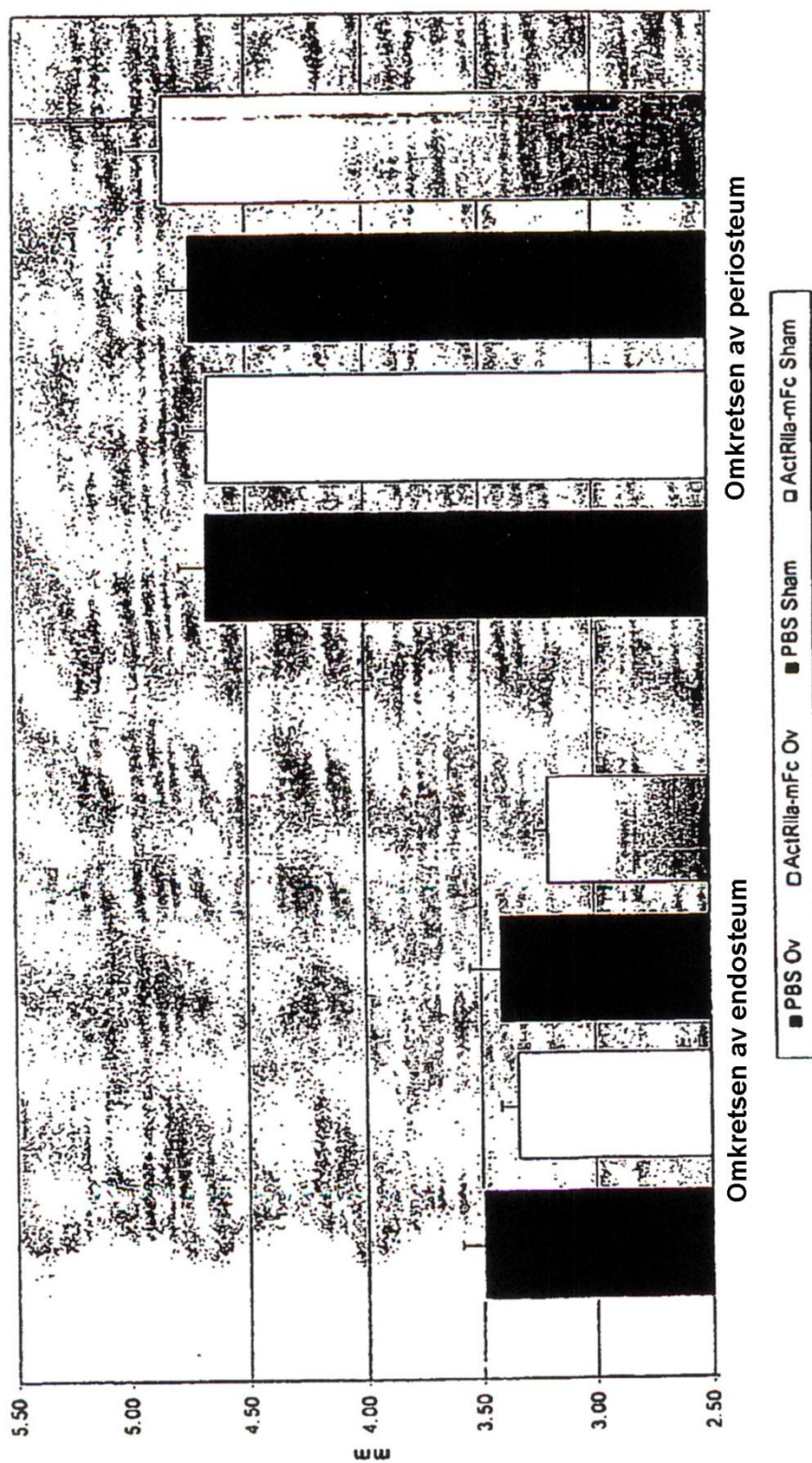
Figur 15

Rørknokkelinnhold i lårbein



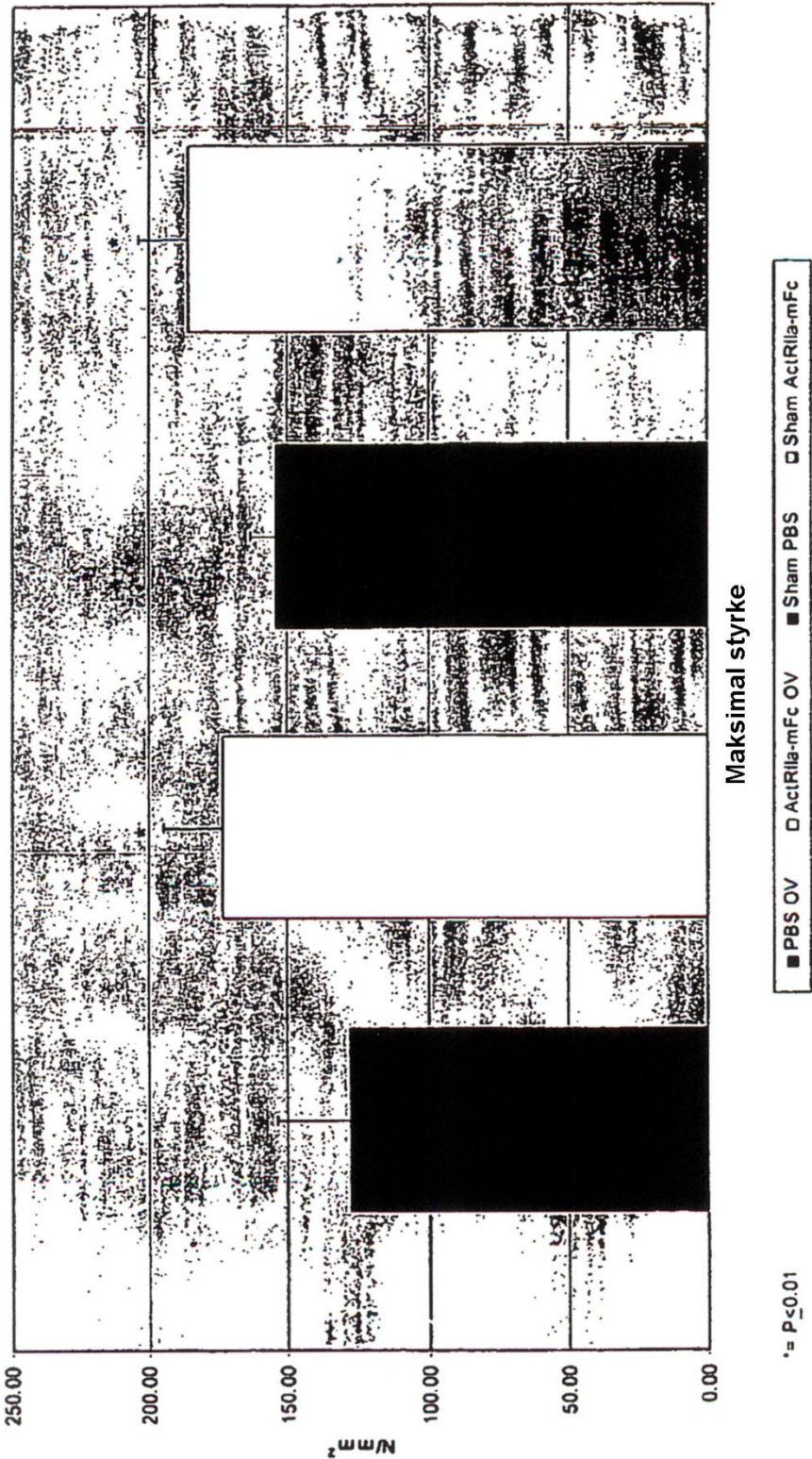
Figur 16

Ex vivo-tykkelse av lårbeinets kortikale bein

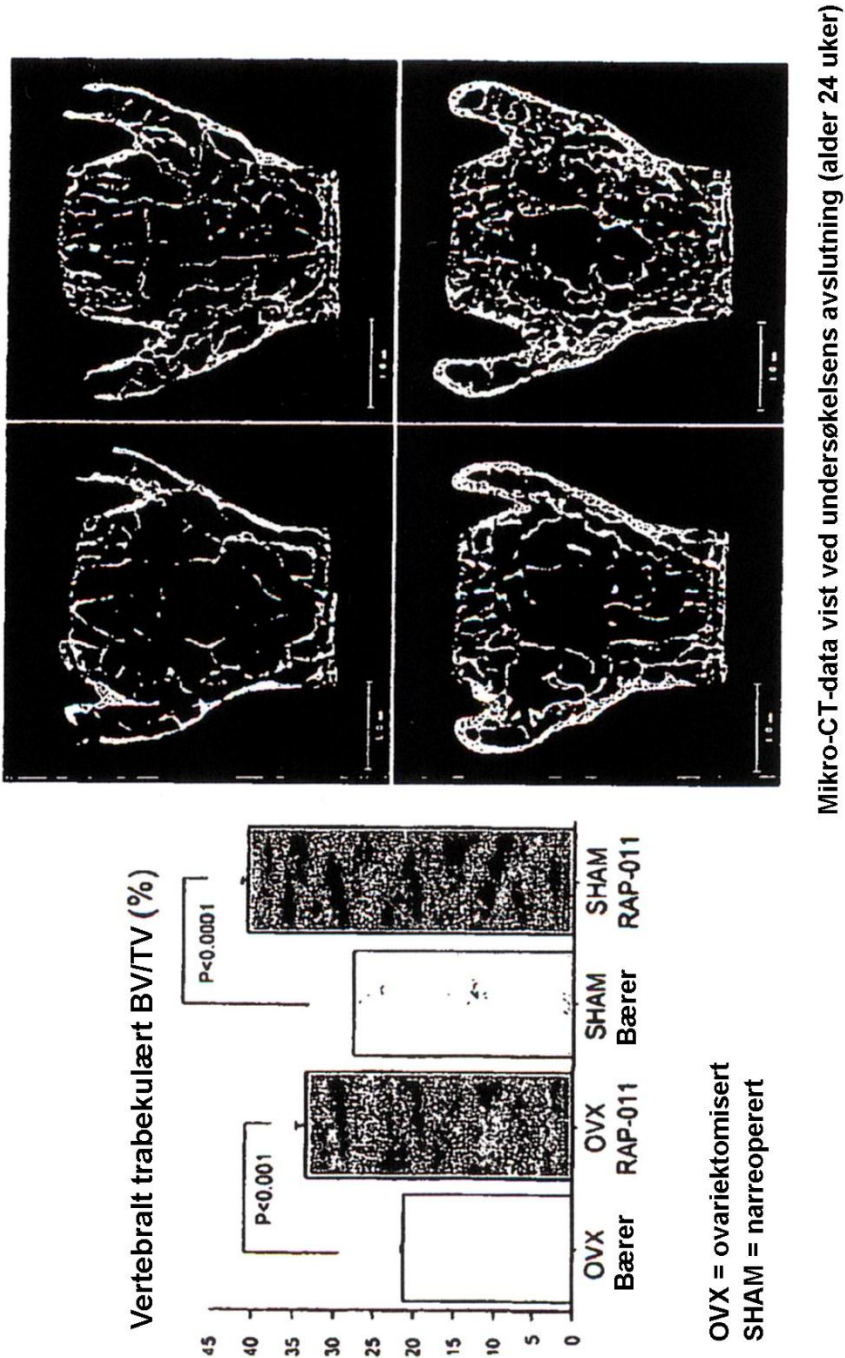


Figur 17

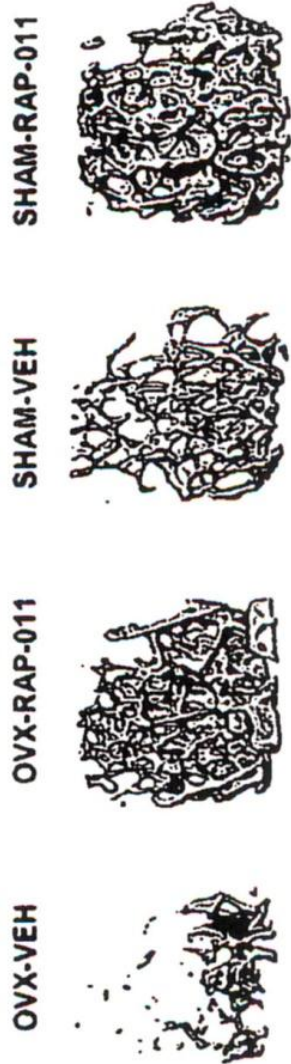
Firepunkters biomekanisk analyse



Figur 18



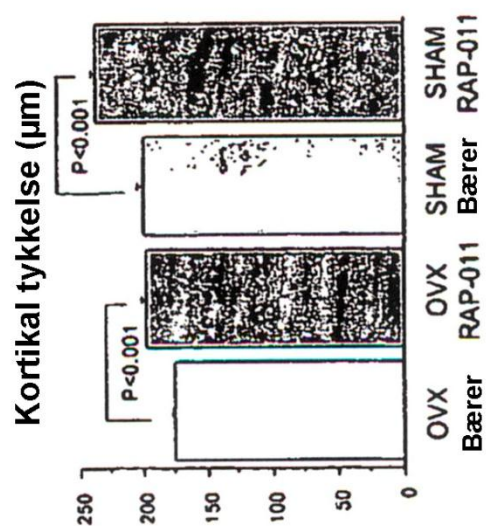
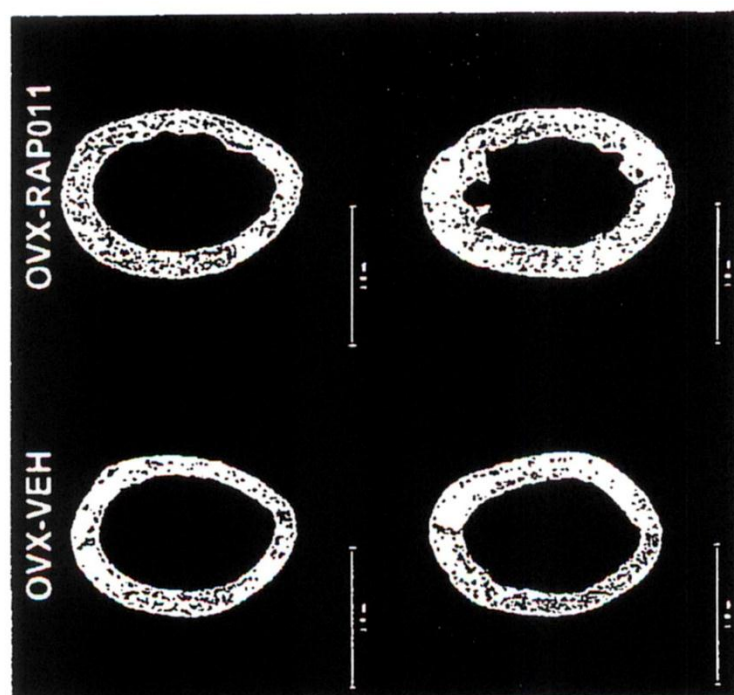
Figur 19



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

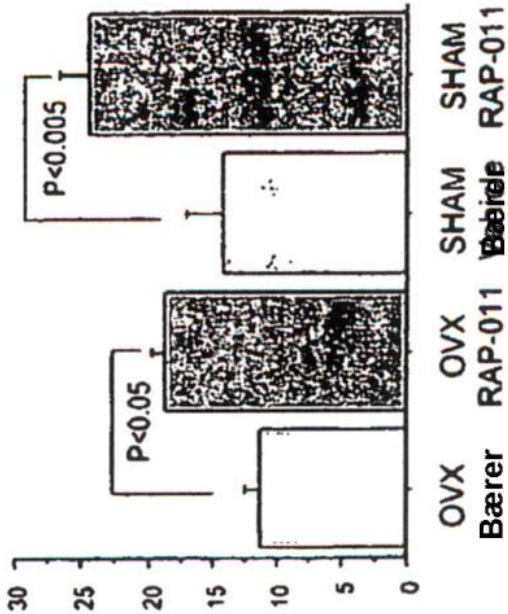
** p< 0.01 vs VEH

Figur 20

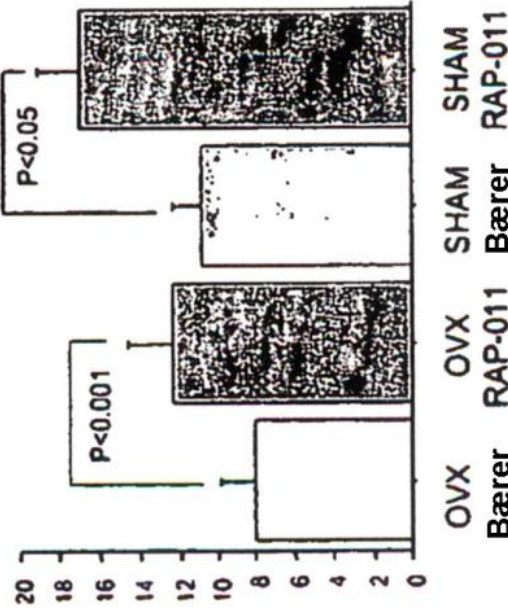


Figur 21

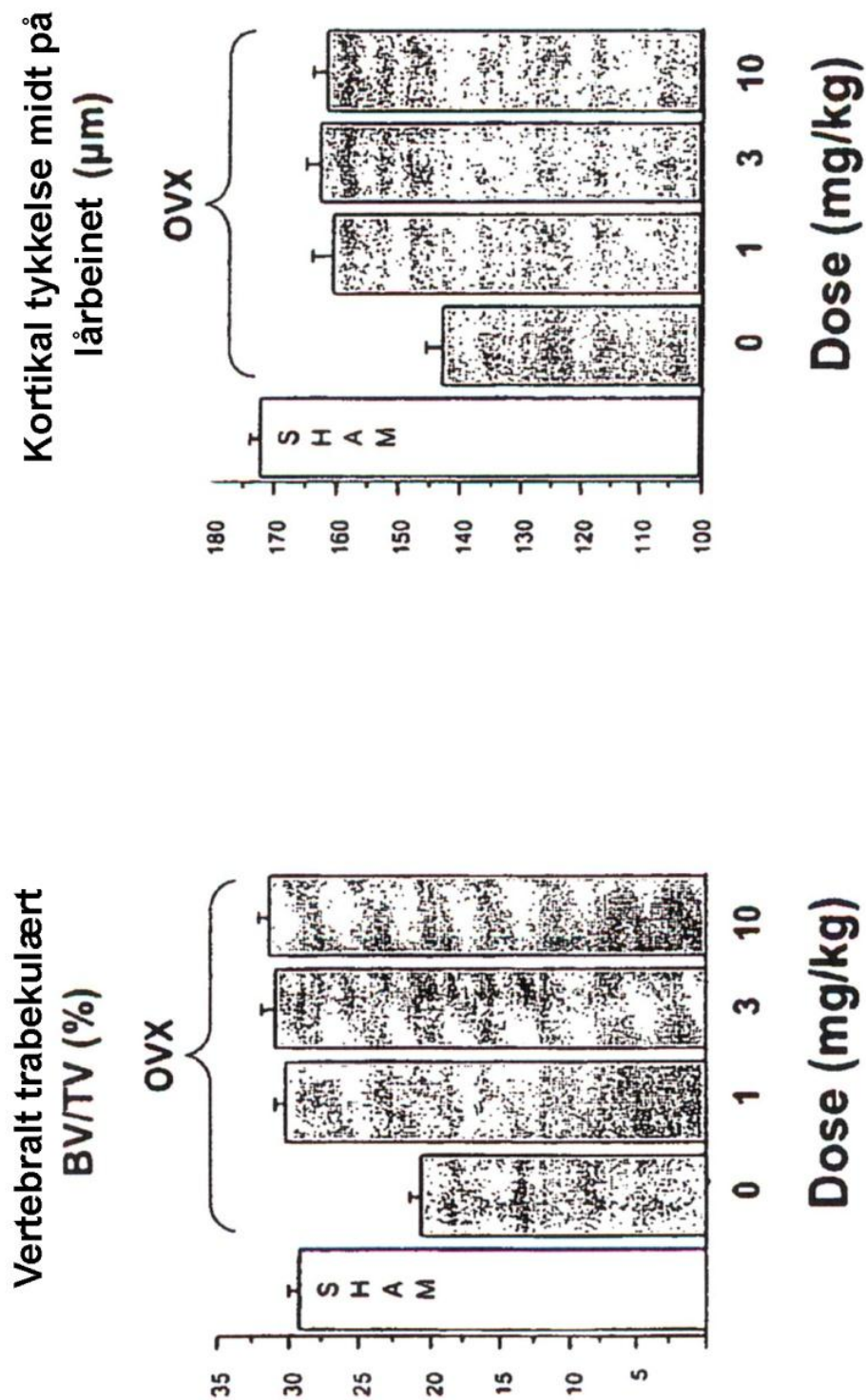
Femoral energitilførsel før brudd (N•mm)



Vertebral energitilførsel før brudd (N•mm)



Figur 22



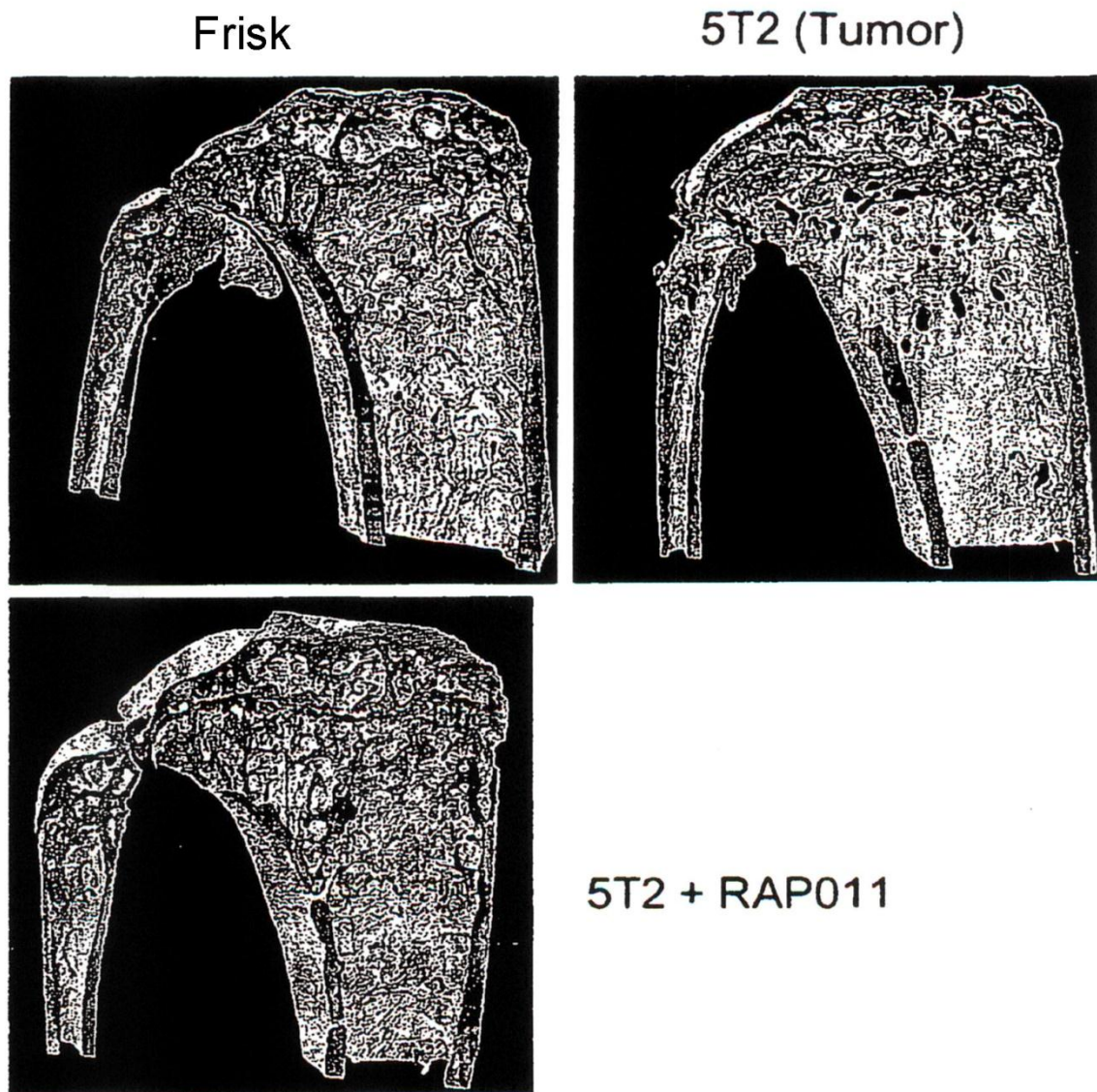
Figur 23

	BV/TV (%)	ES/BS (%)	Nob/BPm (/mm)	Noc/BPm (/mm)	Ms/Bs (%)	MAR (um/dag)	BFR/BSd (um ³ /um ² /dag)
PBS middelverdi	7.53	17.36	49.33	7.55	4.206	0.704	0.029
RAP-011 middel- verdi	10.88	13.93	40.89	5.34	7.546	0.852	0.065
<i>P-verdi</i>	0.002	0.03	0.02	0.01	0.008	0.03	0.002

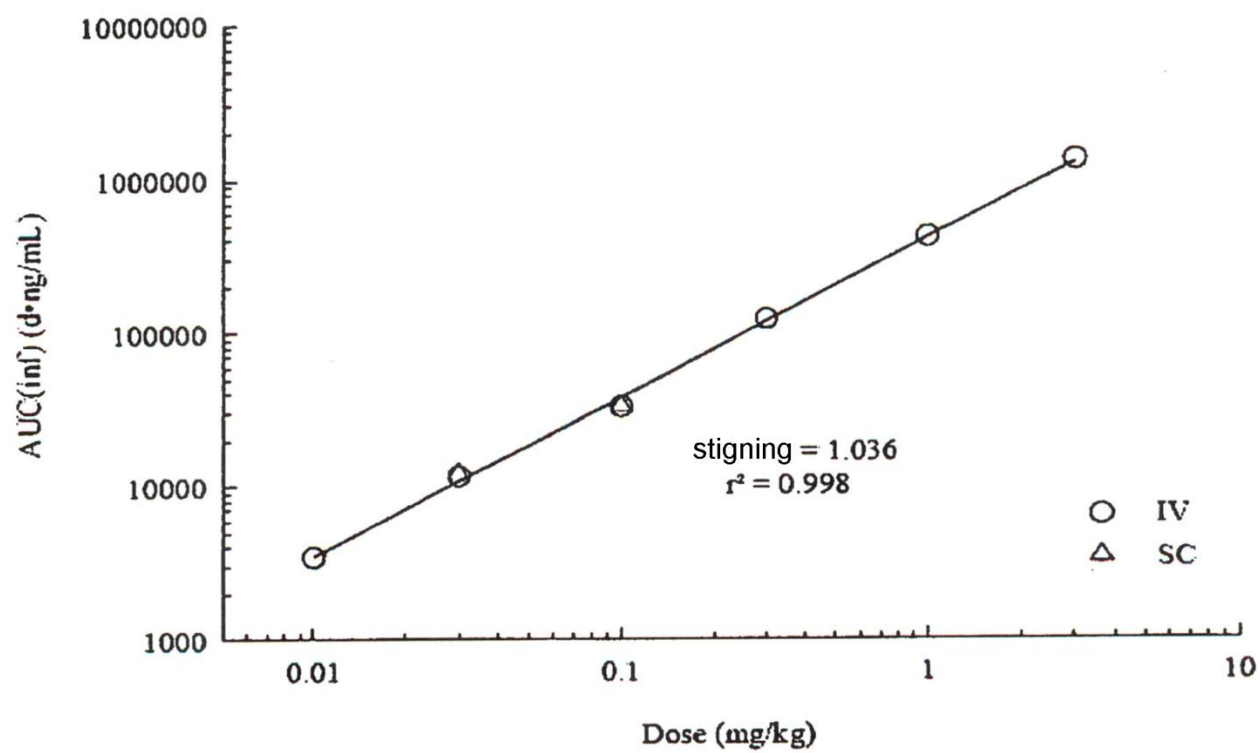
Figur 24

Parameter	2 uker bærer (N=6)	4 uker bærer (N=6)	6 uker bærer (N=8)	12 uker bærer (N=6)	12 uker RAP-011 (N=6)
Beinvolum (BV/TV), %	7.53 ± 0.35	7.04 ± 0.51	6.14 ± 0.41	4.39 ± 0.42	15.24 ± 1.08 *
Osteoid overflate (OS/BS), %	4.86 ± 0.34	3.95 ± 0.51	3.26 ± 0.34	2.1 ± 0.46	1.91 ± 0.08
Eroderet overflate (ES/BS), %	17.36 ± 0.99	13.61 ± 1.6	12.38 ± 1.31	8.56 ± 0.77	10.0 ± 0.34
Antall osteoblaster/areal (Ob/Tar), antall/mm	429.89 ± 25.33	411.84 ± 44.61	405.22 ± 24.2	238.69 ± 14.2	521.86 ± 22.77 *
Osteoblastoverflate/beinoverflate (Obs/BS), %	36.12 ± 2.42	33.5 ± 2.53	35.5 ± 1.27	28.45 ± 1.32	30.24 ± 1.6 *
Osteoblast på beinperimeter (Nob/BPm), %	49.33 ± 2.52	48.52 ± 4.16	49.61 ± 2.87	39.4 ± 2.03	36.64 ± 2.53 *
Antall osteoklaster/areal (Oc/Tar), antall/mm	65.81 ± 4.97	51.42 ± 3.58	45.23 ± 3.98	28.07 ± 1.85	61.15 ± 1.87 *
Osteoklast på beinperimeter (Noc/BPm), %	7.66 ± 0.53	6.26 ± 0.66	5.74 ± 0.58	4.65 ± 0.32	4.49 ± 0.17
Osteoklastoverflate/beinoverflate (OcS/BS), %	8.78 ± 0.78	6.86 ± 0.67	6.38 ± 0.67	8.56 ± 0.77	10.0 ± 0.34
Trabekulær tykkelse (TbTh), -m	13.59 ± .48	13.11 ± 0.46	12.04 ± 0.5	11.18 ± 0.52	17.49 ± 1.02 *
Trabekulær separasjon (TbSp), -m	167.74 ± 5.88	175.98 ± 9.3	187 ± 7.13	251.79 ± 18.14	98.07 ± 4.27 *
Trabekeltall (TbN), antall/mm	5.55 ± 0.19	5.34 ± 0.23	5.07 ± 0.18	3.89 ± 0.27	8.7 ± 0.29 *
Mineraliserende overflate (MS/BS), %	4.21 ± 0.7	4.15 ± 1.02	3.6 ± 0.66	3.86 ± 0.4	6.66 ± 0.51 *
Mineralapposisjons hastighet (mm/dag)	0.704 ± 0.049	0.566 ± 0.042	0.517 ± 0.02	0.425 ± 0.009	0.533 ± 0.013 *
Beindannelseshastighet (-m3/um2/dag)	0.029 ± 0.004	0.026 ± 0.008	0.019 ± 0.003	0.016 ± 0.002	0.035 ± 0.002 *

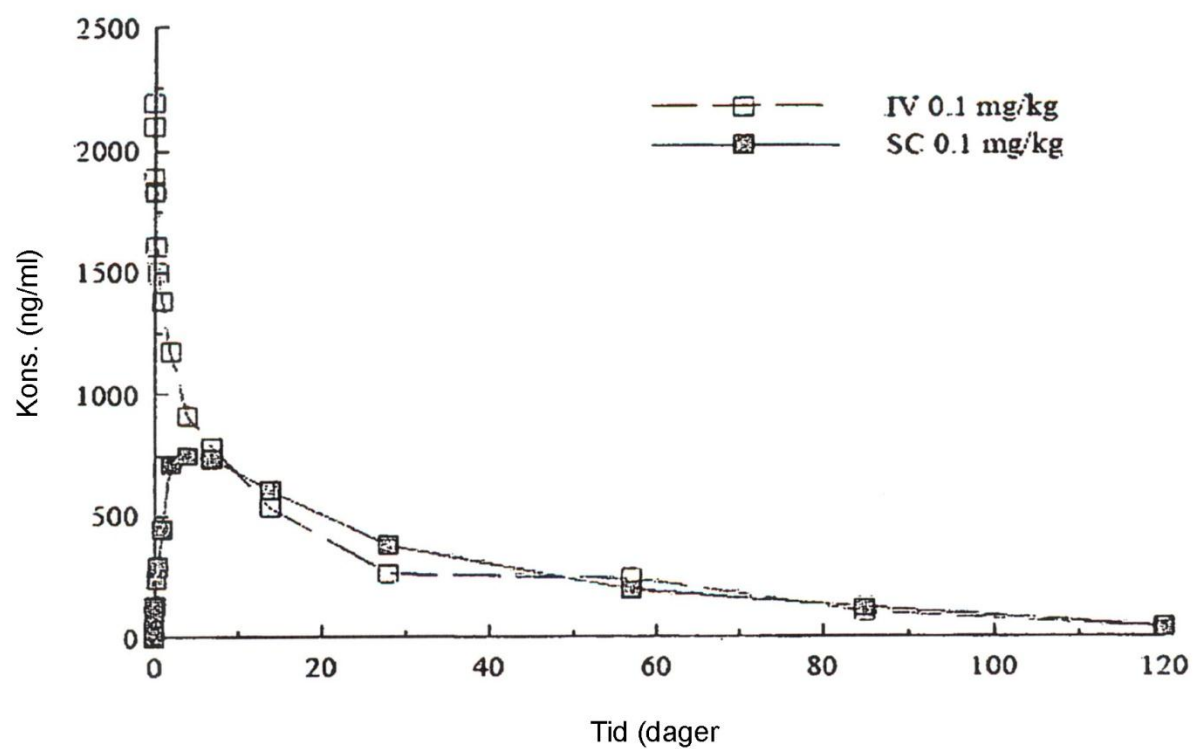
Figur 25



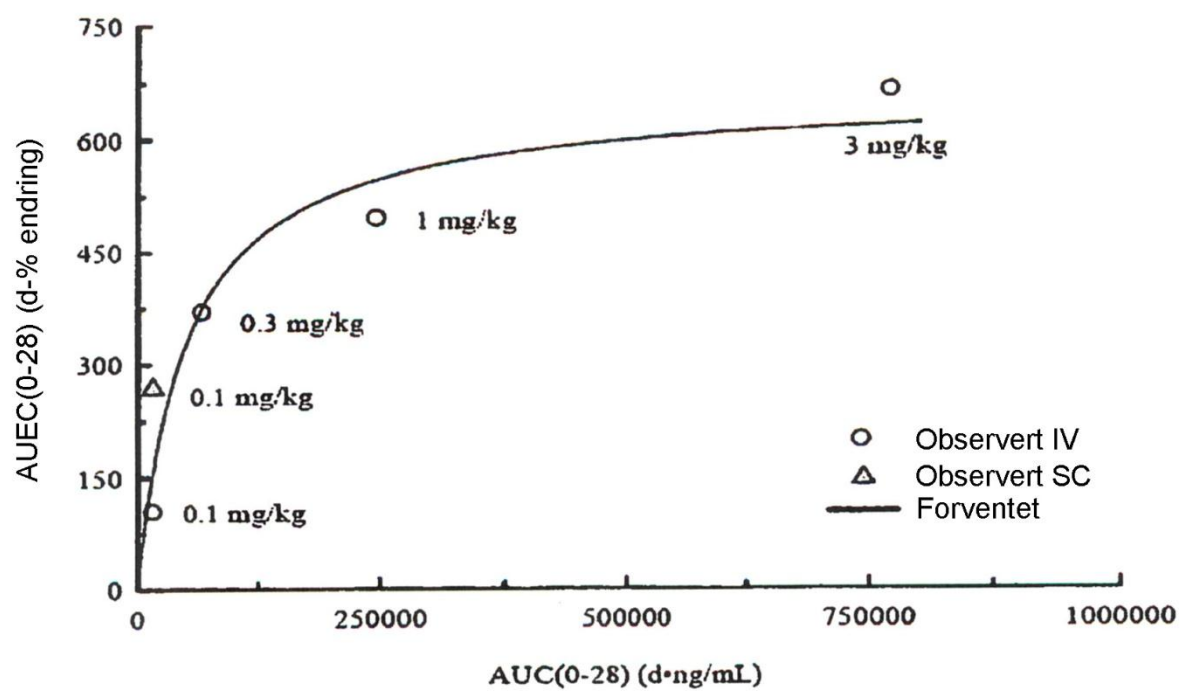
Figur 26



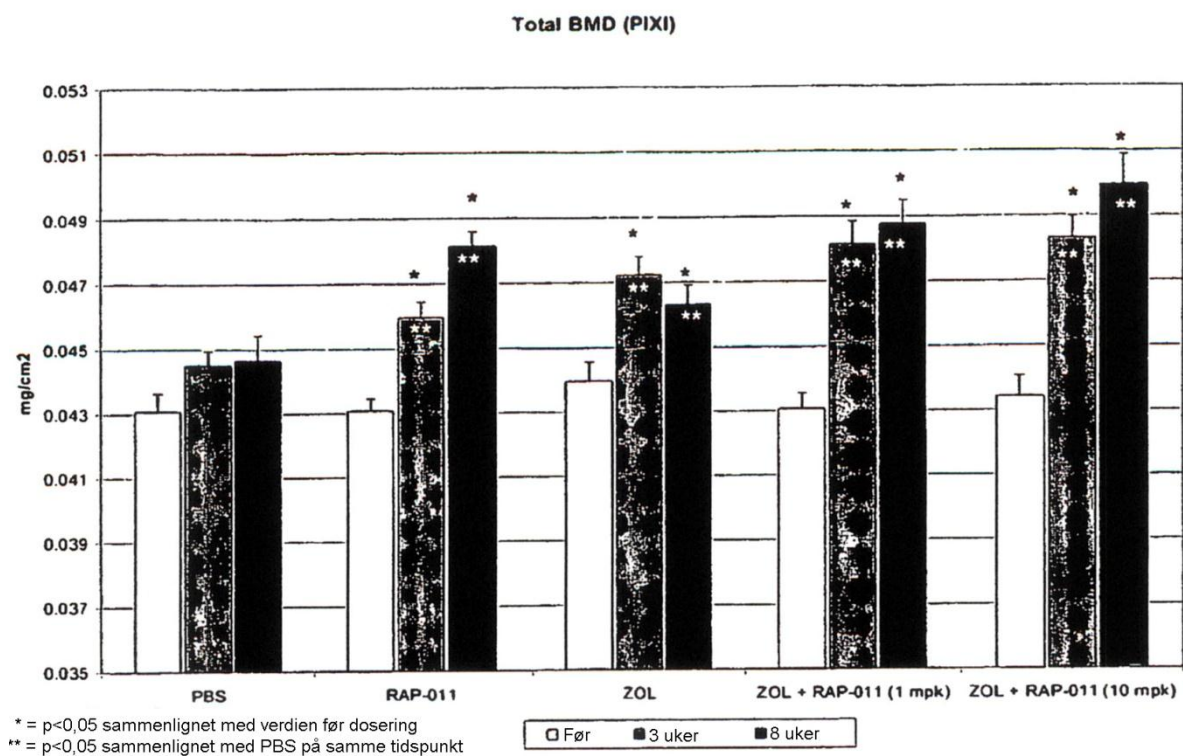
Figur 27



Figur 28



Figur 29



Figur 30