



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2607379 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.10.13
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.05.28
(86)	Europeisk søknadsnr	13157694.4
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.02.04
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2013.06.26
(30)	Prioritet	2007.02.02, US, 899304 P 2007.05.01, US, 927088 P 2007.05.25, US, 931880 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 Massachusetts 01741, US-USA Kumar, Ravindra, 421 Arlington Street, Acton, MA Massachusetts 01720, US-USA Seehra, Jasbir, 3 Lincoln Terrace, Lexington, MA Massachusetts 02421-6818, US-USA
(74)	Fullmektig	Plougmann & Vingtoft, Postboks 1003 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Varianter avledet fra ActRIIB og anvendelser for disse
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A-2006/012627 GRAY P C ET AL: "Identification of a binding site on the type II activin receptor for activin and inhibin", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,; US, vol. 275, no. 5, 4 February 2000 (2000-02-04), pages 3206-3212, XP002366136, ISSN: 0021-9258 THOMPSON T B ET AL: "Structures of an ActRIIB:activin A complex reveal a novel binding mode for TGF-beta ligand:receptor interactions", EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 22, no. 7, 1 April 2003 (2003-04-01), pages 1555-1566, XP002366299, ISSN: 0261-4189 DIANNE SAKO ET AL: "Characterization of the Ligand Binding Functionality of the Extracellular Domain of Activin Receptor Type IIB", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 285, no. 27, 2 July 2010 (2010-07-02), pages 21037-21048, XP008148640, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M110.114959 [retrieved on 2010-04-12]

Beskrivelse

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

[0001] Superfamilien transformerende vekstfaktor beta (transforming growth factor beta, TGF-beta) inneholder en rekke vekstfaktorer som deler felles sekvenser og strukturelle motiver. Disse proteinene er kjent for å utøve biologiske virkninger på et stort utvalg av celletyper i både virveldyr og virvelløse dyr. Medlemmer av superfamilien utfører viktige funksjoner i løpet av embryonal utvikling i mønsterdannelse og vevsspesifisering og kan påvirke en rekke differensieringsprosesser, inkludert adipogenese, myogenese, kondrogenese, cardiogenese, hematopoiese, nevrogenese og epitelial celledifferensiering. Familien er delt inn i to generelle grener: grenene BMP/GDF og TGF-beta/aktivin/BMP10, hvor medlemmene har ulike, ofte komplementære effekter. Ved å manipulere aktiviteten til et medlem av TGF-beta-familien, er det ofte mulig å forårsake betydelige fysiologiske endringer i en organisme. F.eks. bærer storferasene Piedmontese og Belgian Blue en tap-av-funksjon-mutasjon i GDF8-genet (også kalt myostatin) som forårsaker en markert økning i muskelmasse. Grobet mfl., Nat Genet. 1997, 17(1):71-4. Videre, hos mennesker, er inaktive alleler av GDF8 forbundet med økt muskelmasse, og angivelig eksepsjonell styrke. Schuelke mfl., N Engl J Med 2004, 350:2682-8.

[0002] Lading i muskel, ben, brusk og annet vev kan oppnås ved agoniserende eller antagoniserende signalisering som formidles av et passende medlem av TGF-beta-familien. Det er dermed behov for midler som fungerer som potente regulatorer av TGF-beta-signaliseringen.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

[0003] I ett aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en variant av ActRIIB-proteinet som består av en aminosyresekvens som er minst 90 % lik aminosyrene 29-109 ifølge SEKV ID NR:2, hvor proteinet består av en sur aminosyre i posisjonen som tilsvarer posisjon 79 ifølge SEKV ID NR:2.

[0004] Foretrukne funksjoner av ActRIIB-proteinvarianten i henhold til oppfinnelsen er angitt i patentkravene heri.

[0005] Slike ActRIIB-polypeptider kan anvendes til behandling av en rekke lidelser eller tilstander, spesielt muskelrelaterte og nevromuskulære sykdommer (f.eks. muskeldystrofi, amyotrofisk lateralsklerose (ALS) og muskelatrofi) og muskelsvinn i forbindelse med alderdom (sarkopeni), prostatakreftbehandling og kakeksi ved kreft. Oppfinnelsen tilveiebringer et sett varianter avledet fra ActRIIB som har sterkt redusert affinitet for aktivin samtidig som de beholder bindingen til GDF11. Disse variantene utviser ønskelige effekter på muskler samtidig som de reduserer virkningene på andre

vev.

[0006] I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et farmasøytisk preparat som omfatter ActRIIB-proteinvarianten av oppfinnelsen. Alternativt bindes ActRIIB-proteinvarianten til en ActRIIB-ligand med en Kd mindre enn 10 mikromolar eller mindre enn 1 mikromolar, 100, 10 eller 1 nanomolar. Eventuelt inhiberer ActRIIB-proteinvarianten ActRIIB-signaliseringen, slik som intracellulære signaltransduksjonshendelser som utløses av en ActRIIB-ligand. En ActRIIB-proteinvariant av oppfinnelsen inkluderer én eller flere ytterligere endringer i aminosyresekvensen (f.eks. i det ligandbindende domenet) i forhold til et naturlig forekommende ActRIIB-polypeptid. Endringen i aminosyresekvensen kan f.eks. endre glykosyleringen av polypeptidet når det produseres i et pattedyr, insekt eller andre eukaryotiske celler, eller endre proteolytisk spalting av polypeptidet i forhold til det naturlig forekommende ActRIIB-polypeptidet. En ActRIIB-proteinvariant kan være et fusjonsprotein som har, som ett domene, et ActRIIB-protein og ett eller flere ytterligere domener som tilveiebringer en ønsket egenskap, slik som

[0007] forbedret farmakokinetikk, enklere rensing, målretting til spesielle vev, osv.

F.eks. kan et domene av et fusjonsprotein forbedre én eller flere av følgende: in vivo-stabilitet, in vivo-halveringstid, opptak/tilførsel, vevslokalisering eller -fordeling, dannelse av proteinkomplekser, multimerisering av fusjonsproteinet og/eller rensing.

En ActRIIB-fusjonsproteinvariant kan omfatte et immunglobulin Fc-domene (villtype eller mutant) eller et serumalbumin. I visse utførelsesformer omfatter en ActRIIB-Fc-fusjon relativt ustrukturerte linker plassert mellom Fc-domenet og det ekstracellulære ActRIIB-domenet. Denne ustrukturerte linkeren kan tilsvare det omtrent 15 aminosyrer lange ustrukturerte området i den C-terminerte enden av det ekstracellulære domenet til ActRIIB ("halen"), eller den kan være en kunstig sekvens på mellom 5 og 15, 20, 30, 50 eller flere aminosyrer som er relativt fri for sekundærstruktur. En linker kan være rik på glysin- og prolinrester og kan f.eks. inneholde repeterende sekvenser av treonin/serin og glysiner (f.eks. TG₄- eller SG₄-repetisjoner). Et fusjonsprotein kan omfatte en undersekvens for rensing, slik som en epitopetagg, en FLAG-tag, en polyhistidinsekvens og en GST-fusjon. Alternativt kan et oppløselig ActRIIB-polypeptid omfatte én 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 lipidmoiety og en aminosyre konjugert til et organisk derivatiseringsmiddel. Et farmasøytisk preparat kan også omfatte én eller flere andre forbindelser, slik som en forbindelse som anvendes for å behandle en ActRIIB-relatert sykdom. Et farmasøytisk preparat er hovedsakelig pyrogenfritt. Generelt foretrekkes det at et ActRIIB-protein uttrykkes i en pattedyrcellelinje som sørger for egnet, naturlig glykosylering av ActRIIB-proteinet, slik at sannsynligheten for en ufordelaktig immunrespons i en pasient reduseres.

Humane og CHO-cellelinjer har med hell blitt brukt, og det forventes at andre vanlige pattedyrekspresjonsvektorer vil kunne anvendes.

[0008] Beskrevet heri er pakkelegemidler som omfatter et farmasøytisk preparat beskrevet heri og merket for bruk til å fremme veksten av et vev eller redusere eller forebygge tap av et vev i et menneske. Eksempel på vev omfatter ben, brusk, muskel, fett og nevrontalt vev.

[0009] Oppfinnelsen tilveiebringer ActRIIB-proteinvarianter som omfatter et endret ligandbindende (f.eks. GDF8-bindende) domene. Slike endrede ligandbindende domener av en ActRIIB-reseptor omfatter en sur aminosyre i posisjon 79 og kan i tillegg omfatte én eller flere mutasjoner ved aminosyrerester slik som E37, E39, R40, K55, R56, Y60, A64, K74, W78, D80, F82 og F101 av humant ActRIIB.

(Nummerering er relativt til SEKV ID NR:2). Eventuelt kan det endrede ligandbindende domenet ha økt selektivitet for en ligand slik som GDF8/GDF11 i forhold til et ligandbindende villtypedomene av en ActRIIB-reseptor. For å illustrere er disse mutasjonene demonstrert heri for å øke selektiviteten til det endrede ligandbindende domenet for GDF11 (og dermed formodentlig også GDF8) over aktivin (presentert i forhold til ActRIIB): K74Y, K74F, K74I og D80I. De følgende mutasjonene har omvendt effekt, og øker forholdet av aktivinbinding over GDF11: D54A, K55A, L79A og F82A. Den totale (GDF11- og aktivin-) bindende aktiviteten kan økes ved å inkludere "hale"-området, eller formodentlig et ustrukturert linkerområde, og også ved å bruke en K74A-mutasjon. Andre mutasjoner som forårsaker en total reduksjon i den ligandbindende affiniteten omfatter: R40A, E37A, R56A, W78A, D80K, D80R, D80A, D80G, D80F, D80M og D80N. Mutasjoner kan kombineres for å oppnå ønskede effekter. F.eks. har mange av de mutasjonene som påvirker forholdet GDF11:aktivin-binding totalt en negativ effekt på ligandbindingen. Disse kan derfor kombineres med mutasjoner som generelt øker ligandbindingen for å produsere et forbedret bindende protein med ligandselektivitet.

[0010] Eventuelt inhiberer det endrede ligandbindende domenet GDF8/GDF11 med en IC_{50} på minst 2, 5, 10 eller til og med 100 ganger mindre enn IC_{50} for å inhibere aktivin. Disse oppløselige ActRIIB-polypeptidene kan være fusjonsproteiner som omfatter et immunoglobulin Fc-domene (enten villtype eller mutant). I visse tilfeller er de aktuelle løselige ActRIIB-polypeptidene antagonister (inhibitorer) av GDF8/GDF11.

[0011] Andre varianter av ActRIIB er tatt i betraktning, f.eks. følgende. En ActRIIB-fusjonsproteinvariant som omfatter en del avledet fra ActRIIB-sekvensen ifølge SEKV ID NR:2 og en annen polypeptiddel, hvor delen som er avledet fra ActRIIB tilsvarer en sekvens som begynner ved en hvilken som helst av aminosyrene 21-29 ifølge SEKV ID NR:2 (eventuelt begynner ved 22-25 ifølge SEKV ID NR:2) og slutter ved en hvilken som helst av aminosyrene 109-134 ifølge SEKV ID NR:2. Delen avledet fra

ActRIIB kan tilsvare (a) en sekvens som begynner ved en hvilken som helst av aminosyrene 20-29 ifølge SEKV ID NR:2 (eventuelt begynner ved 22-25 ifølge SEKV ID NR:2) og slutter ved en hvilken som helst av aminosyrene 109-133 ifølge SEKV ID NR:2; (b) en sekvens som begynner ved en hvilken som helst av aminosyrene 20-24 ifølge SEKV ID NR:2 (eventuelt begynner ved 22-25 ifølge SEKV ID NR:2) og slutter ved en hvilken som helst av aminosyrene 109-133 ifølge SEKV ID NR:2; (c) en sekvens som begynner ved en hvilken som helst av aminosyrene 21-24 ifølge SEKV ID NR:2 og slutter ved en hvilken som helst av aminosyrene 109-134 ifølge SEKV ID NR:2; (d) en sekvens som begynner ved en hvilken som helst av aminosyrene 20-24 ifølge SEKV ID NR:2 og slutter ved en hvilken som helst av aminosyrene 118-133 ifølge SEKV ID NR: 2; (e) en sekvens som begynner ved en hvilken som helst av aminosyrene 21-24 ifølge SEKV ID NR:2 og slutter ved en hvilken som helst av aminosyrene 118-134 ifølge SEKV ID NR:2; (f) en sekvens som begynner ved en hvilken som helst av aminosyrene 20-24 ifølge SEKV ID NR:2 og slutter ved en hvilken som helst av aminosyrene 128-133 ifølge SEKV ID NR:2; (g) en sekvens som begynner ved en hvilken som helst av aminosyrene 20-24 ifølge SEKV ID NR:2 og slutter ved en hvilken som helst av aminosyrene 128-133 ifølge SEKV ID NR:2; (h) en sekvens som begynner ved en hvilken som helst av aminosyrene 21-29 ifølge SEKV ID NR:2 og slutter ved en hvilken som helst av aminosyrene 118-134 ifølge SEKV ID NR:2; (i) en sekvens som begynner ved en hvilken som helst av aminosyrene 20-29 ifølge SEKV ID NR:2 og slutter ved en hvilken som helst av aminosyrene 118-133 ifølge SEKV ID NR:2; (j) en sekvens som begynner ved en hvilken som helst av aminosyrene 21-29 ifølge SEKV ID NR:2 og slutter ved en hvilken som helst av aminosyrene 128-134 ifølge SEKV ID NR:2; (k) en sekvens som begynner ved en hvilken som helst av aminosyrene 20-29 ifølge SEKV ID NR:2 og slutter ved en hvilken som helst av aminosyrene 128-133 ifølge SEKV ID NR:2. Overraskende nok har konstruksjoner som begynner ved 22-25 ifølge SEKV ID NR:2 større aktivitetsnivå enn proteiner som har det fulle ekstracellulære domenet av humant ActRIIB. Enhver av ActRIIB-fusjonsproteinvariantene over kan produseres som en homodimer. Ethvert av ActRIIB-fusjonsproteinene over kan ha en heterolog del som omfatter et konstant område fra en IgG-tungkjede, slik som et Fc-domene.

[0012] En ActRIIB-proteinvariant ifølge oppfinnelsen kan ha en R eller K ved posisjonen som tilsvarer posisjonen 64 ifølge SEKV ID NR:2. Minst én endring med hensyn til sekvensen ifølge SEKV ID NR:2 kan plasseres på utsiden av den ligandbindende lommen, en konservativ endring plasseres i den ligandbindende lommen, en endring ved en av posisjonene velges ut fra gruppen som består av K74, R40, Q53, K55 og F82. ActRIIB-proteinvarianten kan omfatte minst én N-X-SIT-sekvens ved en posisjon som ikke er en endogen N-X-SFT-sekvens av ActRIIB, og ved en posisjon på utsiden av den ligandbindende lommen.

[0013] ActRIIB-proteinvarianten kan omfatte en N ved posisjonen som tilsvarer posisjon 24 ifølge SEKV ID NR:2, og en S eller T ved posisjonen som tilsvarer posisjon 26 ifølge SEKV ID NR:2. ActRIIB-proteinvarianten kan være et fusjonsprotein som videre omfatter en heterolog del. Enhver av ActRIIB-

[0014] Ethvert av ActRIIB-fusjonsproteinene over kan ha en heterolog del som omfatter et konstant område fra en IgG-tungkjede, slik som et Fc-domene.

[0015] Heri beskrives nukleinsyrer som koder for et løselig ActRIIB-polypeptid, som ikke koder for et fullstendig ActRIIB-polypeptid. Et isolert polynukleotid kan omfatte en kodesekvens for et løselig ActRIIB-polypeptid, som beskrevet over. F.eks. kan en isolert nukleinsyre omfatte en sekvens som koder for et ekstracellulært domene (f.eks. ligandbindende domene) av en ActRIIB og en sekvens som ville ha kodet for en del av eller hele transmembrandomenet og/eller det cytoplasmatiske domenet til et ActRIIB, 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 f.eks. omfatte en ActRIIB-fullengdepolynukleotidsekvens slik som SEKV ID NR: 4, eller en delvis avkortet versjon, hvor det nevnte isolerte polynukleotidet videre omfatter et transkripsjonstermineringskodon minst sekshundre nukleotider før 3'-enden eller ellers plassert slik at translasjonen av polynukleotidet gir opphav til et ekstracellulært domene som eventuelt kan fusjoneres til en avkortet del av et fullengde-ActRIIB. Nukleinsyrer som beskrives heri kan være operativt koblet til en promoter for ekspresjon, og beskrivelsen tilveiebringer celler som er transformert med slike rekombinante polynukleotider. Fortrinnsvis er cellen en pattedyr-celle, slik som en CHO-celle.

[0016] Fremgangsmåter for å lage et løselig ActRIIB-polypeptid beskrives også heri.

En slik fremgangsmåte kan omfatte ekspresjon av en hvilken som helst av nukleinsyrene (f.eks. SEKV ID NR: 3) som beskrives heri i en egnet celle, slik som en ovariecelle (CHO-celle) fra en kinesisk hamster. En slik fremgangsmåte kan omfatte:

a) å dyrke en celle under forhold som er egnede for ekspresjon av det løselige ActRIIB-polypeptidet, hvor den nevnte cellen er transformert med en løselig ActRIIB-ekspresjonskonstruksjon; og b) å gjenvinne det således uttrykte, løselige ActRIIB-polypeptidet. Løselige ActRIIB-polypeptider kan gjenvinnes som uforedledede, delvis rensede eller høyrensede fraksjoner ved bruk av enhver av de velkjente teknikkene for å oppnå protein fra cellekulturer.

[0017] Et løselig ActRIIB-polypeptid beskrevet heri kan brukes i en fremgangsmåte for å behandle et individ som har en sykdom relatert til muskeltap eller utilstrekkelig muskelvekst. Slike sykdommer inkluderer muskelatrofi, muskeldystrofi, amyotrofisk lateralsklerose (ALS) og muskelsvinnsykdommer (f.eks. kakeksi, anoreksia, DMD-

syndrom, BMD-syndrom, AIDS-muskelsvinnsyndrom, muskeldystrofier, nevromuskulære sykdommer, motornevro sykdommer, sykdommer i den nevromuskulære endeplaten og inflammatoriske myopater). En fremgangsmåte kan omfatte å administrere en effektiv mengde løselig ActRIIB-polypeptid til et individ som behøver det.

[0018] Et løselig ActRIIB-polypeptid beskrevet heri kan brukes i en fremgangsmåte for å redusere kropps fettinnholdet eller redusere økningstakten for kropps fettinnholdet, og for å behandle en sykdom forbundet med uønsket kroppsvektøkning, slik som overvekt, ikke-insulinavhengig diabetes mellitus (NIDDM), kardiovaskulær sykdom, kreft, hypertensjon, osteoartrose, slag, pusteproblemer og sykdom i galleblæren. Disse fremgangsmåtene kan omfatte å administrere en effektiv mengde løselig ActRIIB-polypeptid til et individ som behøver det.

[0019] Et løselig ActRIIB-polypeptid beskrevet heri kan brukes i en fremgangsmåte for å behandle en sykdom forbundet med unormal GDF8-aktivitet. Slike sykdommer omfatter metabolske sykdommer slik som type 2 diabetes, svekket glukosetoleranse, metabolsk syndrom (f.eks. X-syndrom) og insulinresistens induisert av traumer (f.eks. brannskår eller nitrogenubalanse); sykdommer i adipøst vev (f.eks. overvekt); muskeldystrofi (inkludert Duchennes muskeldystrofi); amyotrofisk lateralsklerose (ALS); muskelatrofi; organatrofi; svakhet; karpaltunnelsyndrom; kongestiv obstruktiv lungesykdom; sarkopeni, kakeksi og andre muskelsvinnsyndromer; osteoporose; glukokortikoidindusert osteoporose; osteopeni; osteoartrose; osteoporoserelaterte brudd; lav benmasse på grunn av kronisk glukokortikoidbehandling, prematur gonadesvikt, androgen undertrykkelse, mangel på vitamin D, sekundær hyperparatyreoidisme, ernæringsmessige mangler og anorexia nervosa. Fremgangsmåten kan omfatte å administrere en effektiv mengde løselig ActRIIB-polypeptid til et individ som behøver det.

[0020] Beskrevet heri er en fremgangsmåte for å identifisere et middel som stimulerer veksten av et vev slik som ben, brusk, muskel og fett. Fremgangsmåten består av: a) å identifisere et testmiddel som bindes til et ligandbindende domene av et ActRIIB-polypeptid kompetitivt med et løselig ActRIIB-polypeptid; og b) å evaluere effekten av midlet på vevsveksten.

[0021] Også beskrevet heri er fremgangsmåter for å antagonisere aktiviteten av et ActRIIB-polypeptid eller en ActRIIB-ligand (f.eks. GDF8, GDF11, aktivin, BMP7 og Nodal) i en celle. Fremgangsmåten omfatter å kontakte cellen med et løselig ActRIIB-polypeptid. Eventuelt overvåkes aktiviteten til ActRIIB-polypeptidet eller ActRIIB-liganden med en signaltransduksjon formidlet av ActRIIB/ActRIIB-ligandkomplekset, f.eks. ved å overvåke celleproliferasjonen. Cellene i fremgangsmåten inkluderer en osteoblast, en kondrocytt, en myocyt, en adipocyt og en muskelcelle.

[0022] Beskrevet er også anvendelser for et løselig ActRIIB-polypeptid for å lage et legemiddel for behandling av en sykdom eller tilstand som beskrevet heri.

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

[0023]

Figur 1 viser en human, løselig (ekstracellulær) ActRIIB-polypeptidsekvens (SEKV ID NR: 1). Den C-terminale "halen" er understreket.

Figur 2 viser en human ActRIIB-forløperproteinsekvens (SEKV ID NR: 2).

Signalpeptidet er understreket, det ekstracellulære domenet er uthevet (også referert til som SEKV ID NR: 1) og de potensielle N-koblede glykosyleringssetene er innrammet.

Figur 3 viser en nukleinsyresekvens som koder et humant, løselig (ekstracellulært) ActRIIB-polypeptid, utformet som SEKV ID NR: 3.

Figur 4 viser en nukleinsyresekvens som koder for et humant ActRIIB-forløperprotein, utformet som SEKV ID NR: 4.

Figur 5 viser kroppsvektøkning for mus behandlet med vehikkel (romber), ActRIIB(R64 20-134)-mFc (kvadrater) eller den lange halveringstidsformen, ActRIIB(R64 A24N 20-134) (triangler).

Figur 6 viser vekten av dissekerte muskler på slutten av studien. Vehikkel: venstre kolonne (lys skygge) for hver gruppe; ActRIIB(R64 20-134)-mFc: midtre kolonne (middels skygge) for hver gruppe; ActRIIB(R64 A24N 20-134): høyre kolonne (mørk skygge) for hver gruppe.

Figur 7 viser gripestyrkemålinger for SOD-mus behandlet med PBS og murint ActRIIB (R64 K74A 20-134)-mFc (eller "K74A+15-hale") (henholdsvis hvite og svarte stolper).

Figuren illustrerer den økte styrken til gruppen behandlet med murint ActRIIB (R64 K74A 20-134)-mFc i forhold til PBS-gruppen både i løpet av det tidligere (dag 117) og det senere (dag 149) stadiet av sykdommen. * $P < 0,05$, tosidig Students t-test.

Figur 8 viser Kaplan-Meier overlevelsessammenligning av SOD-mus behandlet med PBS og ActRIIB (R64 K74A 20-134)-mFc (henholdsvis hvite og svarte stolper).

Gruppen behandlet med ActRIIB (R64 K74A 20-134)-mFc har økt antall dagers overlevelse i gjennomsnitt i forhold til PBS-gruppen.

Figur 9 viser prosentandelen av endring i kroppssammensetning i mus føret med HFD i henholdsvis PBS- og ActRIIB(R64 20-134)-mFc-gruppen (henholdsvis hvite og svarte stolper). Behandling med murint ActRIIB(R64 20-134)-Fc-protein reduserer fettmassen og øker magert vev betydelig.

Figur 10 viser muskeltverrsnitt av femoris-muskler (4x forstørrelse) fra gamle mus (A) eller mus behandlet med ActRIIB(R64 20-134)-mFc (B).

Figur 11 viser gjennomsnittlig kroppsvekt for mus i et kreftkakeksieksperiment ved bruk av CT26-tykktarmskreftceller. Romber: dyr uten tumorer behandlet med saltløsning; kvadrater: mus uten tumorer behandlet med ActRIIB(R64 20-134)-mFc;

triangler: dyr med tumorer behandlet med saltløsning; "x": mus med tumorer behandlet med ActRIIB(R64 20-134)-mFc (10 mg/kg); "*": mus med tumorer behandlet med ActRIIB(R64 20-134)-mFc (30 mg/kg); sirkel: mus med tumorer behandlet med ActRIIB(R64 20-134)-mFc (10 mg/kg), behandling iverksatt på tidspunktet for tumorimplantat for en forebyggende modalitet.

Figur 12 viser en sammenstilling av humant ActRIIA og ActRIIB med restene som er avledet heri, basert på sammensatt analyse av flere ActRIIB- og ActRIIA-krystallstrukturer for å kontakte liganden direkte (den ligandbindende lommen) indikert med bokser.

Figur 13 viser en flersekvenssammenstilling av ulike ActRIIB-virveldyrproteiner og humant ActRIIA.

DETALJERT BESKRIVELSE

1. Oversikt

[0024] Den foreliggende oppfinnelsen er generelt relatert til ActRIIB-polypeptider. Slik det anvendes her, viser begrepet "ActRIIB" til en familie av aktivinreseptortype IIB-proteiner (ActRIIB) og ActRIIB-relaterte proteiner, avledet fra enhver art.

Medlemmer av ActRIIB-familien er generelt bare transmembranproteiner, som består av et ligandbindende, ekstracellulært domene med cysteinrikt område, et transmembrandomene og et cytoplasmatiske domene med prediktert serin/treonin-kinasespesifisitet. Aminosyresekvenser av humant ActRIIA-forløperprotein (gitt for sammenligning) og ActRIIB-forløperprotein illustreres i henholdsvis figur 1 (SEKV ID NR: 1) og figur 2 (SEKV ID NR: 2).

[0025] Begrepet "ActRIIB-polypeptid" brukes for å referere til polypeptider som omfatter ethvert naturlig forekommende polypeptid av et medlem i ActRIIB-familien, samt enhver variant derav (inkludert mutanter, fragmenter, fusjoner og peptidomimetiske former) som opprettholder en nyttig aktivitet. F.eks. inkluderer ActRIIB-polypeptider polypeptider avledet fra sekvensen av ethvert kjent ActRIIB som har en sekvens som er minst ca. 80 % lik sekvensen av et ActRIIB-polypeptid, og fortrinnsvis 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % eller større likhet.

[0026] I en spesiell utførelsesform angår oppfinnelsen visse løselige ActRIIB-polypeptider. Som beskrevet heri refererer begrepet "løselig ActRIIB-polypeptid" hovedsakelig til polypeptider som omfatter et ekstracellulært domene av et ActRIIB-protein. Begrepet "løselig ActRIIB-polypeptid" slik det anvendes heri, inkluderer ethvert naturlig forekommende, ekstracellulært domene av et ActRIIB-protein, samt enhver variant derav (inkludert mutanter, fragmenter og peptidomimetiske former) som opprettholder en nyttig aktivitet. F.eks. bindes det ekstracellulære domenet av et

ActRIIB-protein til en ligand, og er generelt løselig. Eksempler på løselige ActRIIB-polypeptider inkluderer ActRIIB-løselige polypeptider illustrert i figur 1 (SEKV ID NR:1). Andre eksempler på løselige ActRIIB-polypeptider omfatter en signalsekvens i tillegg til det ekstracellulære domenet av et ActRIIB-protein, se eksempel 1.

5 Signalsekvensen kan være en opprinnelig signalsekvens av et ActRIIB, eller en signalsekvens fra et annet protein, slik som en vevsplasminogenaktivatorsignalsekvens (TPA-signalsekvens) eller en honningbiemelatinsignalsekvens (HBM-signalsekvens).

[0027] TGF- β -signaler formidles av heteromere komplekser av type I- og type II-serin/treonin-kinasereseptorer, som fosforylerer og aktiverer nedstrøms Smad-proteiner etter ligandstimulering (Massagué, 2000, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:169-178). Disse 10 type I- og type II-reseptorene er alle 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 15 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.

[0028] To beslektede type II-reseptorer, ActRIIA og ActRIIB er identifisert som type II-reseptorer for aktiviner (Mathews og Vale, 1991, Cell 65:973-982; Attisano mfl., 20 1992, Cell 68: 97-108). I tillegg til aktiviner kan ActRTIA og ActRIIB interagere biokjemisk med flere andre proteiner i TGF- β -familien, deriblant BMP7, Nodal, GDF8 og GDF11 (Yamashita mfl., 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 mfl., 2002, Genes Dev. 16:2749-54). Søkerne har oppdaget at løselige 25 ActRIIA-Fc-fusjonsproteiner og ActRIIB-Fc-fusjonsproteiner har vesentlig ulike effekter in vivo. ActRIIA-Fc virker hovedsakelig på ben, og ActRIIB-Fc virker hovedsakelig på skjelettmuskler.

[0029] ActRIIB-polypeptider kan anvendes til å antagonisere en ligand av ActRIIB-reseptorer (også referert til som en ActRIIB-ligand). Dermed er slike polypeptider 30 anvendelige for å behandle sykdommer assosiert med unormal aktivitet av én eller flere ligander av

[0030] ActRIIB-reseptorer. Eksempler på ligander av ActRIIB-reseptorer omfatter noen medlemmer av TGF- β -familien, slik som aktivin, Nodal, GDF8, GDF11 og BMP7.

35 **[0031]** Aktiviner er dimere vekstfaktor-polypeptider som tilhører TGF-beta-superfamilien. Det finnes tre aktiviner (A, B, og AB) som er homo-/heterodimerer av to nært beslektede β -subenheter ($\beta_A\beta_A$, $\beta_B\beta_B$, og $\beta_A\beta_B$). I TGF-beta-superfamilien er aktivinene unike og multifunksjonelle faktorer som kan stimulere hormonproduksjonen i ovarie- og placentaceller, understøtte overlevelsen av nevronceller, påvirke

fremgangen i cellesyklusen positivt eller negativt avhengig av celletype, og indusere mesodermal differensiering, i det minste i amfibiembryoer (DePaolo mfl., 1991, Proc SocEp Biol Med. 198:500-512; Dyson mfl., 1997, Curr Biol. 7:81-84; Woodruff, 1998, Biochem Pharmacol. 55:953-963). Videre ble erytroid differensieringsfaktor (EDF) isolert fra de stimulerte humane monocytteleukemicellene funnet å være identiske til aktivin A (Murata mfl., 1988, PNAS, 85:2434). Det ble foreslått at aktivin A virker som en naturlig regulator av erytropoesen i benmargen. I flere vev antagoniseres aktivinsignaliseringen av den beslektede heterodimeren inhibin. Under f.eks. frigjøringen av det follikkelstimulerende hormonet (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, Cerberus og endoglin, som beskrives under.

[0032] Nodalproteiner har funksjoner innen mesoderm og endoderm induksjon og dannelse, samt påfølgende organisering av aksiale strukturer slik som hjerte og mage i tidlig embryogenese. Det har blitt demonstrert at dorsalt vev i virveldyrembryoer under utvikling bidrar hovedsakelig til de aksiale strukturene til notokorden og pre-kordplaten mens det rekrutterer omkringliggende celler til å danne ikke-aksiale embryonale strukturer. Det ser ut som om Nodal signaliserer gjennom både type I- og type II-reseptorer og intracellulære effektorer kjent som Smad-proteiner. Nylige studier støtter ideen om at ActRIIA og ActRIIB tjener som type II-reseptorer for Nodal (Sakuma mfl., Genes Cells. 2002, 7:401-12). Det foreslås at Nodal-ligander samhandler med sine kofaktorer (f.eks. cripto) for å aktivere aktivin type I- og type II-reseptorer, som fosforylerer Smad2. Nodal-proteiner er innblandet i mange hendelser som er kritiske for virveldyrembryoer i tidlige stadier, inkludert mesoderm formasjon, anterior mønsterdannelse og spesifikasjon av venstre-høyre-akse. Eksperimentelle bevis har vist at Nodal-signalisering aktiverer pAR3-Lux, en luciferaserapportør som tidligere er vist å reagere spesifikt på aktivin og TGF-beta. Imidlertid er ikke Nodal i stand til å indusere pTlx2-Lux, en rapportør som er spesielt responsiv ovenfor benmorfogenetiske proteiner. Nyere resultater tilveiebringer direkte biokjemiske bevis på at Nodal-signalisering formidles av begge aktivin-TGF-beta-Smad-veiene, Smad2 og Smad3. Ytterligere bevis viser at det ekstracellulære cripto-proteinet kreves for Nodal-signalisering, som skiller det fra aktivin eller TGF-beta-signalisering.

[0033] Vekst- og differensieringsfaktor-8 (GDF8) er også kjent som myostatin. GDF8 er en negativ regulator av skjelettmuskelmasse. GDF8 er sterkt uttrykt i utviklende og voksne skjelettmuskler. GDF8-nullmutasjonen i transgene mus kjennetegnes ved markert hypertrofi og hyperplasi av skjelettmusklene (McPherron mfl., Nature, 1997, 387:83-90). Lignende økning i skjelettmuskelmasse er tydelig i naturlig forekommende mutasjoner av GDF8 i storfe (Ashmore mfl., 1974, Growth, 38:501-507; Swatland og

Kieffer, J. Anim. Sci., 1994, 38:752-757; McPherron og Lee, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94:12457-12461; og Kambadur mfl., Genome Res., 1997, 7:910-915) og, påfallende, i mennesker (Schuelke mfl., N Engl J Med 2004;350:2682-8). Studier har også vist at muskelsvinn assosiert med HIV-infeksjon i mennesker er ledsaget av en økning i GDF8-proteinekspresjonen (Gonzalez-Cadavid mfl., PNAS, 1998, 95:14938-43). I tillegg kan GDF8 modulere produksjonen av muskelspesifikke enzymer (f.eks. kreatinkinase) og modulere myoblastcelleproliferasjonen (WO 00/43781). GDF8-propeptidet kan bindes ikke-kovalent til den modne GDF8-domenedimeren, og dermed deaktivere dens biologiske aktivitet (Miyazono mfl. (1988) J. Biol. Chem., 263: 6407-6415; Wakefield mfl. (1988) J. Biol. Chem., 263: 7646-7654; og Brown mfl. (1990) Growth Factors, 3: 35-43). Andre proteiner som bindes til GDF8 eller strukturelt relaterte proteiner og hemmer deres biologiske aktivitet omfatter follistatin, og eventuelt follistatin-relaterte proteiner (Gamer mfl. (1999) Dev. Biol., 208: 222-232).

[0034] Vekst- og differensieringsfaktor-11 (GDF11), også kjent som BMP11, er et utskilt protein (McPherron mfl., 1999, Nat. Genet. 22: 260-264). GDF11 er uttrykt i haleknoppen, lemknoppen, overkjevens og underkjevens buer og spinalgangliene i løpet av museutviklingen (Nakashima mfl., 1999, Mech. Dev. 80: 185-189). GDF11 spiller en unik rolle i mønsterdannelsen i både mesodermalt vev og nervevev (Gamer mfl., 1999, Dev Biol., 208:222-32). GDF11 ble vist å være en negativ regulator av kondrogenesen og myogenesen i kyllinglemmer under utvikling (Gamer mfl., 2001, Dev Biol. 229:407-20). Ekspresjonen av GDF11 i muskler tyder også på at den har en rolle når det gjelder å regulere muskelvekst på en lignende måte som GDF8. I tillegg tyder ekspresjonen av GDF11 i hjernen på at GDF11 også kan inneha aktiviteter som er relatert til funksjonen av nervesystemet. Interessant nok ble GDF11 funnet å inhibere neurogenesen i luktepitelet (Wu mfl., 2003, Neuron. 37:197-207). Derfor kan GDF11 ha in vitro- og in vivo-anvendelser i behandlingen av sykdommer slik som muskelsykdommer og nevrodegenerative sykdommer (f.eks. amyotrofisk lateralsklerose).

[0035] Benmorfogenetiske proteiner (BMP7), også kalt osteogenisk protein-1 (OP-1), er velkjent for å indusere brusk- og bendannelse. I tillegg regulerer BMP7 et bredt spekter av fysiologiske prosesser. F.eks. kan BMP7 være den osteoinduktive faktoren ansvarlig for fenomenet epitelial osteogenese. Det er også funnet at BMP7 spiller en rolle i kalsiumreguleringen og benhomeostasen. I likhet med aktivin, bindes BMP7 til type II-reseptorene, ActRIIA og IIB. Imidlertid rekrutterer BMP7 og aktivin ulike type I-reseptorer i heteromeriske reseptorkomplekser. Den viktigste BMP7 type I-reseptoren som ble observert var ALK2, mens aktivin ble bundet utelukkende til ALK4 (ActRIIB). BMP7 og aktivin fremkalte forskjellige biologiske reaksjoner og aktiverte ulike Smad-veier (Macias-Silva mfl., 1998, J Biol Chem. 273:25628-36).

[0036] Visse ActRIIB-polypeptider (f.eks. løselige ActRIIB-polypeptider) kan brukes

til å antagonisere signaliseringen av ActRIIB-ligander generelt i enhver prosess assosiert med ActRIIB-aktivitet. Eventuelt kan ActRIIB-polypeptider antagonisere én eller flere ligander av ActRIIB-reseptorer, slik som aktivin, Nodal, GDF8, GDF11 og BMP7, og kan derfor ha anvendelser ved behandling av ytterligere lidelser.

[0037] Derfor kan ActRIIB-polypeptider brukes til behandling eller forebyggelse av sykdommer eller tilstander i forbindelse med unormal aktivitet av ActRIIB eller en ActRIIB-ligand. ActRIIB eller ActRIIB-ligander er involvert i reguleringen av mange kritiske biologiske prosesser. På grunn av de viktige funksjonene i disse prosessene, kan de være attraktive mål for terapeutisk intervensjon. F.eks. ActRIIB-polypeptider (f.eks. løselige ActRIIB-polypeptider) kan brukes til å behandle sykdommer eller tilstander i mennesker eller dyr. Eksempler på slike sykdommer eller tilstander kan omfatte, men er ikke begrenset til, metabolske sykdommer slik som type 2 diabetes, svekket glukosetoleranse, metabolsk syndrom (f.eks. X-syndrom), insulinresistens induisert av traumer (f.eks. brannsåre eller nitrogenubalanse); sykdommer i adipøst vev (f.eks. overvekt); muskel- og nevromuskulære sykdommer slik som muskeldystrofi (inkludert Duchennes muskeldystrofi); amyotrofisk lateralsklerose (ALS); muskelatrofi; organatrofi; svakhet; karpaltunnelsyndrom; kongestiv obstruktiv lungesykdom; sarkopeni, kakeksi og andre muskelsvinnsyndromer. Andre eksempler omfatter osteoporose, spesielt i eldre og/eller postmenopausale kvinner; glukokortikoidindusert osteoporose; osteopeni; osteoartrose; og osteoporoserelaterte brudd. Enda ytterligere eksempler inkluderer lav benmasse på grunn av kronisk glukokortikoidbehandling, prematur gonadesvikt, androgen undertrykkelse, mangel på vitamin D, sekundær hyperparatyreoidisme, ernæringsmessige mangler og anorexia nervosa. Disse sykdommene og tilstandene omtales nedenfor under "Eksempler på terapeutiske anvendelser".

[0038] Begrepene som benyttes i denne beskrivelsen har generelt deres vanlige betydninger innen faget, innenfor rammen av denne oppfinnelsen, og i den spesifikke sammenhengen hvor hvert begrep brukes. Visse begreper omtales nedenfor eller annensteds i beskrivelsen for å gi ytterligere veiledning til den praktiserende ved å beskrive sammensetningene og fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen og hvordan de fremstilles og anvendes. Omfanget og betydningen av ethvert begreps anvendelse vil fremgå av den spesifikke sammenhengen hvor begrepet brukes.

[0039] "Tilnærmet" og "omtrent" skal generelt bety en akseptabel grad av feil for den målte mengden i henhold til målingens art eller presisjon. Eksempler på grader av feil er typisk innenfor 20 prosent (%), fortrinnsvis innenfor 10 %, og mer foretrukket innen 5 % av en gitt verdi eller et gitt verdiområde.

[0040] Eventuelt, og spesielt i biologiske systemer, kan begrepene "tilnærmet" og "omtrent" bety verdier som ligger innenfor en størrelsesorden, fortrinnsvis innenfor 5 ganger og mer foretrukket innenfor 2 ganger av en gitt verdi. Numeriske kvantiteter

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

[0041] Fremgangsmåtene beskrevet heri kan omfatte trinn hvor sekvenser sammenlignes med hverandre, innbefattet villtypesekvens med én eller flere mutanter (sekvensvarianter). Slike sammenligninger omfatter typisk 5 sammenstillinger av polymersekvenser, f.eks. anvendelse av sekvenssammenstillingsprogrammer og/eller -algoritmer som er velkjente innen faget (f.eks. BLAST, FASTA og MEGALIGN for å nevne noen få). En erfaren 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 resten.

[0042] "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 nukleinsyrener som koder for dem) har sekvenshomologi, som gjenspeilt i deres sekvenslikhet, enten uttrykt som prosent identitet eller ved nærvær av spesifikke rester eller motiver og konserverte posisjoner.

[0043] Begrepet "sekvenslikhet" viser i alle sine grammatiske former til graden av identitet eller samsvar mellom nukleinsyre- eller aminosyresekvenser som kan, men ikke må dele et felles evolusjonært opphav.

[0044] I vanlig bruk og i den foreliggende søknaden kan imidlertid begrepet "homolog" når det er modifisert med et adverb, slik som "svært", vise til sekvenslikhet, og det kan, men må ikke, vise til et felles evolusjonært opphav.

2. ActRIIB-polypeptider

[0045] Beskrevet heri er ActRIIB-polypeptidvarianter (f.eks. løselige ActRIIB-polypeptider). Eventuelt har fragmentene, de funksjonelle variantene og de modifiserte formene lignende eller de samme biologiske aktivitetene til de tilsvarende villtype-ActRIIB-polypeptidene. F.eks. kan en ActRIIB-variant ifølge oppfinnelsen binde til og inhibere funksjonen til en ActRIIB-ligand (f.eks. aktivin A, aktivin AB, aktivin B, Nodal, GDF8, GDF11 eller BMP7). Eventuelt modulerer et ActRIIB-polypeptid veksten av vev slik som ben, brusk, muskel eller fett. Eksempler på polypeptider omfatter humant ActRIIB-forløperpolypeptid (SEKV ID NR: 2) og løselige, humane ActRIIB-polypeptider (f.eks. SEKV ID NR: 1, 5, 6 og 12).

[0046] Beskrivelsen identifiserer funksjonelt aktive deler og varianter av ActRIIB. Søkerne har konstatert at et Fc-fusjonsprotein som har sekvensen beskrevet av Hilden mfl. (Blood. 1994 apr. 15;83(8):2163-70) og som har alanin i posisjonen som tilsvarer aminosyre 64 ifølge SEKV ID NR: 2 (A64) har en relativt lav affinitet for aktivin og

GDF-11. I motsetning til dette har det samme Fc-fusjonsproteinet med arginin i posisjon 64 (R64) en affinitet for aktivin og GDF-11 i det lave nanomolare til høye pikomolare området. Derfor er en sekvens med en R64 brukt som villtypereferansesekvens for humant ActRIIB i denne beskrivelsen.

5 **[0047]** Attisano mfl. (Cell. 1992 jan. 10;68(1):97-108) viste at en delesjon av prolinknuten ved C-enden til det ekstracellulære domenet av ActRIIB reduserte affiniteten for aktivinreseptoren. Data som presenteres her viser at et ActRIIB-Fc-fusjonsprotein som inneholder aminosyrene 20-119 ifølge SEKV ID NR:2, "ActRIIB(20-119)-Fc" har redusert binding til GDF-11 og aktivin i forhold til et
10 ActRIIB(20-134)-Fc, som inkluderer prolinknuteområdet og det fullstendige juxtamembrandomenet. Imidlertid opprettholder ActRIIB(20-129)-Fc-proteinet en lignende men noe redusert aktivitet i forhold til villtypen, selv om prolinknuteområdet er avbrutt. Dermed forventes det at alle ekstracellulære ActRIIB-domener som stopper ved aminosyre 134, 133, 132, 131, 130 og 129 er aktive, men konstruksjoner som
15 stopper ved 134 eller 133 kan være mest aktive. På samme måte er det ikke forventet at mutasjoner ved noen av restene 129-134 endrer ligandbindende affinitet med store marginer. Til å støtte dette reduserer ikke mutasjoner av P129 og P130 ligandbindingen vesentlig. Derfor kan et ActRIIB-Fc-fusjonsprotein ende så tidlig som aminosyre 109 (det siste cysteinet). Det forventes allikevel at former som ender ved eller mellom 109
20 og 119 har redusert ligandbinding. Aminosyre 119 er dårlig konserverert, så den er lett å endre eller avkorte. Former som ender ved 128 eller senere opprettholder den ligandbindende aktiviteten. Former som ender ved eller mellom 119 og 127 vil ha en mellomliggende bindingsevne. Enhver av disse formene kan være ønskelig å bruke, avhengig av den kliniske eller eksperimentelle innstillingen.

25 **[0048]** Ved N-enden av ActRIIB forventes det at et protein som begynner ved aminosyre 29 eller før vil opprettholde den ligandbindende aktiviteten. Aminosyre 29 representerer den første cysteinen. En mutasjon fra alanin til asparagin ved posisjon 24 introduserer en N-koblet glykosyleringssekvens uten å vesentlig påvirke ligandbindingen. Dette bekrefter at mutasjoner i området mellom
30 signalspaltingspeptidet og det tverrbundede cysteinområdet, som tilsvarer aminosyrene 20-29, tolereres bra. Spesielt konstruksjoner som begynner ved posisjonene 20, 21, 22, 23 og 24 vil opprettholde aktiviteten, og det forventes også at konstruksjoner som begynner ved posisjonene 25, 26, 27, 28 og 29 opprettholder aktiviteten. Dataene som vises i eksemplene viser at, overraskende nok, en konstruksjon som begynner ved 22,
35 23, 24 eller 25 vil ha den høyeste aktiviteten.

[0049] Samlet utgjør en aktiv del av ActRIIB aminosyrene 29-109 ifølge SEKV ID NR:2, og konstruksjoner kan f.eks. begynne ved en rest som tilsvarer aminosyrene 20-29 ved enden av posisjonen som tilsvarer aminosyrene 109-134. Andre eksempler omfatter konstruksjoner som begynner ved en posisjon fra 20-29 eller 21-29 og slutter

ved en posisjon fra 119-134, 119-133 eller 129-134, 129-133. Andre eksempler omfatter konstruksjoner som begynner ved en posisjon fra 20-24 (eller 21-24, eller 22-25) og slutter ved en posisjon fra 109-134 (eller 109-133), 119-134 (eller 119-133) eller 129-134 (eller 129-133). Varianter innenfor disse områdene er også tatt i betraktning, spesielt de som har minst 80 %, 85 %, 90 %, 95 % eller 99 % identitet til den tilsvarende delen ifølge SEKV ID NR:2.

[0050] Beskrivelsen omfatter resultatene av en analyse av ActRIIB-

komposisjonsstrukturer, vist i figur 13, som demonstrerer at den ligandbindende lommen er definert av restene Y31, N33, N35, L38 til T41, E47, E50, Q53 til K55, L57, H58, Y60, S62, K74, W78 til N83, Y85, R87, A92 og E94 til F101. Ved disse posisjonene er det forventet at konservative mutasjoner vil tolereres, selv om en K74A-mutasjon tolereres godt, slik som R40A, K55A, F82A og mutasjoner i posisjonen L79. R40 er en K i *Xenopus*, som indikerer at basiske aminosyrer ved denne posisjonen vil tolereres. Q53 er R i bovint ActRIIB og K i *Xenopus* ActRIIB, og derfor vil aminosyrer inkludert R, K, Q, N og H tolereres ved denne posisjonen. Dermed er en generell formel for en aktiv ActRIIB-proteinvariant en som omfatter aminosyrene 29-109, men eventuelt begynner ved en posisjon som strekker seg fra 20-24 eller 22-25 og slutter ved en posisjon som strekker seg fra 129-134, og ikke omfatter mer enn 1, 2, 5, 10 eller 15 konservative aminosyreendringer i den ligandbindende lommen, og null, én eller flere ikke-konservative endringer ved posisjonene 40, 53, 55, 74, 79 og/eller 82 i den ligandbindende lommen. Et slikt protein kan opprettholde mer enn 80 %, 90 %, 95 % eller 99 % sekvensidentitet til sekvensen av aminosyrene 29-109 ifølge SEKV ID NR:2. Steder utenfor den bindende lommen, hvor variasjoner kan tolereres spesielt godt, omfatter amino- og karboksylenden av det ekstracellulære domenet (som nevnt ovenfor), og posisjonene 42-46 og 65-73. En endring fra asparagin til alanin ved posisjonen 65 (N65A) forbedrer faktisk ligandbindingen i A64-bakgrunnen, og forventes derfor ikke å ha noen skadelig effekt på ligandbindingen i R64-bakgrunnen. Denne endringen eliminerer antageligvis glykosyleringen ved N65 i A64-bakgrunnen, og demonstrerer dermed at det er sannsynlig at en vesentlig endring i dette området tolereres. Selv om en R64A-endring tolereres dårlig, tolereres R64K godt, og dermed kan en annen basisk rest, slik som H, tolereres ved posisjon 64.

[0051] ActRIIB er godt konservert i nesten alle virveldyr, med store strekninger av det ekstracellulære domenet fullstendig konservert. Mange av ligandene som bindes til ActRIIB konserveres også i høy grad. Følgelig gir sammenligninger av ActRIIB-sekvenser fra ulike virveldyrorganismer innsikt i rester som kan endres. Derfor kan en aktiv, human ActRIIB-variant omfatte én eller flere aminosyrer ved tilsvarende posisjoner fra sekvensen av andre virveldyr-ActRIIB, eller kan omfatte en rest som er lignende den i mennesket eller andre virveldyrsekvenser. Følgende eksempel illustrerer denne fremgangsmåten for å definere en aktiv ActRIIB-variant. L46 er en valin i

Xenopus ActRIIB, så denne posisjonen kan endres, og kan eventuelt endres til en annen hydrofob rest, slik som V, I eller F, eller en ikke-polar rest slik som A. E52 er en K i Xenopus, som indikerer at dette stedet kan være tolerant ovenfor et bredt spekter av endringer, inkludert polare rester, slik som E, D, K, R, H, S, T, P, G, Y og

5 sannsynligvis A. T93 er en K i Xenopus, som indikerer at en bred strukturell variasjon tolereres ved posisjonen, og polare rester foretrekkes, slik som S, K, R, E, D, H, G, P, G og Y. F108 er en Y i Xenopus, og derfor bør Y eller andre hydrofobe grupper, slik som I, V eller L tolereres. E111 er K i Xenopus, som indikerer at ladede rester vil tolereres ved denne posisjonen, inkludert D, R, K og H, samt Q og N. R112 er K i

10 Xenopus, som indikerer at basisk rester tolereres ved denne posisjonen, inkludert R og H. A ved posisjon 119 er relativt dårlig konserverert, og dukker opp som P i gnagere og V i Xenopus, dermed bør nesten enhver aminosyre tolereres ved denne posisjonen.

[0052] Beskrivelsen demonstrerer at tilsetningen av et ytterligere N-koblet glykosyleringssete (N-X-S/T) øker halveringstiden for serumet til et ActRIIB-Fc-fusjonsprotein, i forhold til ActRIIB(R64)-Fc-formen. Ved å introdusere asparagin ved

15 posisjon 24 (A24N-konstruksjon), dannes en NXT-sekvens som gir lengre halveringstid. Andre NX(T/S)-sekvenser finnes ved 42-44 (NQS) og 65-67 (NSS), selv om sistnevnte ikke kan glykosyleres effektivt med R ved posisjon 64. N-X-S/T-sekvensene kan generelt introduseres ved posisjoner på utsiden av den ligandbindende

20 lommen definert i figur 12. Spesielt egnede steder for introduksjon av ikke-endogene N-X-S/T-sekvenser inkluderer aminosyrene 20-29, 20-24, 22-25, 109-134, 120-134 eller 129-134. N-X-S/T-sekvensene kan også introduseres inn i linkerens mellom ActRIIB-sekvensen og Fc- eller andre fusjonskomponenter. Et slikt sted kan introduseres ved minimal anstrengelse ved å introdusere en N i den riktige posisjonen i

25 forhold til en eksisterende S eller T, eller ved å introdusere en S eller T ved en posisjon som tilsvarer en eksisterende N. Dermed er ønskelige endringer som vil danne et N-koblet glykosyleringssete: A24N, R64N, S67N (eventuelt kombinert med en N65A-endring), E106N, R112N, G120N, E123N, P129N, A132N, R112S og R112T. Enhver S som er prediktert til å bli glykosylert kan endres til en T uten å danne et immunogent

30 sted, pga. den beskyttelsen glykosyleringen gir. Likeledes kan enhver T som er prediktert til å bli glykosylert endres til en S. Dermed betraktes endringene S67T og S44T. Likeledes kan en S26T-endring brukes i en A24N-variant. Følgelig kan en ActRIIB-variant omfatte én eller flere ytterligere ikke-endogene N-koblede glykosyleringskonsensussekvenser.

35 **[0053]** Posisjon L79 kan endres for å gi bindende egenskaper til endret aktivin - myostatin (GDF-11). L79A eller L79P reduserer GDF-11 bindingen i større grad enn aktivinbindingen. L79E eller L79D opprettholder GDF-11-bindingen. Bemerkelsesverdig nok har L79D- og L79E-varianter ifølge oppfinnelsen redusert aktivinbindingen vesentlig. In vivo-eksperimenter indikerer at disse ikke-

aktivinreseptorene opprettholder stor evne til å øke muskelmassen, men viser redusert effekt på andre vev. Disse dataene viser hvor ønskelig og gjennomførbart det er å oppnå polypeptider med redusert effekt på aktivin.

[0054] Variantene som er beskrevet kan kombineres på flere måter. I tillegg indikerer resultatene av mutageneseprogrammet beskrevet heri at det finnes aminosyreposisjoner i ActRIIB som det ofte er fordelaktig å bevare. Disse omfatter posisjon 64 (basisk aminosyre), posisjon 80 (sur eller hydrofob aminosyre), posisjon 78 (hydrofob, og spesielt tryptofan), posisjon 37 (sur, og spesielt asparaginsyre eller glutaminsyre), posisjon 56 (basisk aminosyre), posisjon 60 (hydrofob aminosyre, spesielt fenylalanin eller tyrosin). Således, i hver av variantene som beskrives heri, tilveiebringer beskrivelsen et rammeverk av aminosyrer som kan konserveres. Andre posisjoner som kan være ønskelige å konservere er følgende: posisjon 52 (sur aminosyre), posisjon 55 (basisk aminosyre), posisjon 81 (sur), 98 (polar eller ladet, spesielt E, D, R eller K).

[0055] Isolerte fragmenter av ActRIIB-polypeptidene kan oppnås ved å gjennomføre polypeptider som er rekombinant fremstilt fra det tilsvarende fragmentet av nukleinsyren som koder et ActRIIB-polypeptid (f.eks. SEKV ID NR: 3 og 4). I tillegg kan fragmenter syntetiseres kjemisk ved anvendelse av teknikker som er kjente innen faget, slik som 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 f.eks. kan fungere som antagonister (inhibitorer) eller agonister (aktivatorer) av et ActRIIB-protein eller en ActRIIB-ligand.

[0056] I visse utførelsesformer kontemplerer den foreliggende oppfinnelsen å fremstille funksjonelle varianter ved å endre strukturen av et ActRIIB-polypeptid for slike formål som å forbedre terapeutisk effektivitet eller stabilitet (f.eks. ex vivo-holdbarhet og -motstand mot proteolytisk nedbrytning in vivo). Modifiserte ActRIIB-polypeptider kan også produseres f.eks. ved substitusjon, delesjon eller addisjon av aminosyrer. Det er f.eks. 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 molekylets biologiske aktivitet. Konservative utskiftninger er utskiftninger som finner sted innen en familie av aminosyrer som har sidekjeder som ligner hverandre. Hvorvidt en endring i aminosyresekvensen til et ActRIIB-polypeptid fører til en funksjonell homolog kan lett fastslås ved å vurdere ActRIIB-polypeptidvariantens evne til å gi en respons i celler på en måte som ligner på villtype-ActRIIB-polypeptidets, eller til å binde til én eller flere ligander, slik som aktivin, GDF-11 eller myostatin, på en måte som ligner på villtypen.

[0057] I visse utførelsesformer kontemplerer den foreliggende oppfinnelsen å fremstille mutasjoner i det ekstracellulære domenet (også kalt det ligandbindende domenet) til et ActRIIB-polypeptid, slik at ActRIIB-polypeptidvarianten (eller -

mutanten) har endrede ligandbindende aktiviteter (f.eks. bindingsaffinitet eller spesifisitet). I visse tilfeller har slike ActRIIB-polypeptidvarianter endret (hevet eller redusert) bindingsaffinitet for en enkelt ligand. I andre tilfeller har ActRIIB-polypeptidvarianten endret bindingsspesifisitet for sine ligander.

[0058] F.eks. tilveiebringer beskrivelsen ActRIIB-polypeptidvarianter som fortrinnsvis bindes til GDF8/GDF11 relativt til aktiviner. Videre etablerer beskrivelsen om det er ønskelig for slike polypeptider å redusere ikke-tiltenkte effekter, selv om slike selektive varianter kan være mindre ønskelig for behandling av alvorlige sykdommer hvor veldig stor økning i muskelmassen kan være nødvendig for terapeutisk effekt og hvor en viss grad av ikke-tiltenkt effekt er akseptabelt. F.eks. aminosyrerester av ActRIIB-proteinet, slik som E39, K55, Y60, K74, W78, D80 og F101, finnes i den ligandbindende lommen og formidler bindinger til ligandene, slik som aktivin og GDF8. Dermed kan et endret ligandbindende domene (f.eks. GDF8-bindende domene) av en ActRIIB-reseptor omfatte én eller flere mutasjoner ved de aminosyrerestene. Eventuelt kan det endrede ligandbindende domenet ha økt selektivitet for en ligand, slik som GDF8 i forhold til et villtype-ligandbindende domene av en ActRIIB-reseptor. Som et eksempel øker disse mutasjonene selektiviteten av det endrede ligandbindende domenet for GDF8 over aktivin. Eventuelt har det endrede ligandbindende domenet et forhold på K_d for aktivinbinding til K_d for GDF8-binding som er minst 2, 5, 10 eller til og med 100 ganger større i forhold til forholdet for det villtype-ligandbindende domenet. Eventuelt har det endrede ligandbindende domenet et forhold på IC_{50} for å inhibere aktivin til IC_{50} for å inhibere GDF8 som er minst 2, 5, 10 eller til og med 100 ganger større i forhold til det villtype ligandbindende domenet. Eventuelt inhiberer det endrede ligandbindende domenet GDF8 med en IC_{50} på minst 2, 5, 10 eller til og med 100 ganger mindre enn IC_{50} for å inhibere aktivin.

[0059] Som et spesifikt eksempel kan den positivt ladede aminosyreresten Asp (D80) i det ligandbindende domenet til ActRIIB muteres til en annen aminosyrerest, slik at ActRIIB-polypeptidvarianten fortrinnsvis bindes til GDF8, men ikke til aktivin. Fortrinnsvis endres D80-resten til en aminosyrerest utvalgt fra gruppen som består av: en uladet aminosyrerest, en negativ aminosyrerest og en hydrofob aminosyrerest. Ifølge oppfinnelsen kan den hydrofobe resten L79 endres til de sure aminosyrene asparaginsyre eller glutaminsyre for å redusere aktivinbindingen vesentlig, mens GDF11-bindingen opprettholdes. En fagperson vil anerkjenne at de fleste mutasjonene, variantene eller modifikasjonene beskrevet heri kan utføres på nukleinsyrenivåene, eller i enkelte tilfeller ved posttranslasjonell modifikasjon eller kjemisk syntese. Slike teknikker er velkjente i faget.

[0060] I enkelte utførelsesformer kontemplerer den foreliggende oppfinnelsen spesifikke mutasjoner av ActRIIB-polypeptidene for å endre glykosyleringen av polypeptidet. Eksempler på glykosyleringsseter i ActRIIB-polypeptider vises i figur 2.

Slike mutasjoner kan velges for å introdusere eller eliminere én eller flere glykosyleringssteder, slik som O-koblede eller N-koblede glykosyleringssteder.

Gjenkjenningssteder for asparaginkoblet glykosylering omfatter generelt en

tripeptidsekvens, asparagin-X-treonin (hvor "X" er hvilken som helst aminosyre) som

5 spesifikt gjenkjennes av egnede cellulære glykosyleringsenzymer. Endringen kan også utføres ved addisjon eller substitusjon av én eller flere serin- eller treoninrester til

sekvensen til villtype-ActRIIB-polypeptidet (for seter for O-koblet glykosylering). En

rekke forskjellige aminosyresubstitusjoner eller -delesjoner i enten den første eller

tredje aminosyreposisjonen, eller begge, i et glykosyleringsgjenkjenningssete (og/eller

10 aminosyredelesjon i posisjon to) fører til at den modifiserte tripeptidsekvensen ikke glykosyleres. En annen måte å øke antallet karbohydratgrupper på et ActRIIB-

polypeptid på, er ved kjemisk eller enzymatisk kobling av glykosider til ActRIIB-

polypeptidet. Avhengig av den benyttede koblingsmåten kan sukkeret eller sukkerene

kobles til (a) arginin og histidin; (b) frie karboksylgrupper; (c) frie sulfhydrylgrupper,

15 slik som i cystein; (d) frie hydroksylgrupper, slik som i serin, treonin eller

hydroksyprolin; (e) aromatiske rester, slik som i fenylalanin, tyrosin eller tryptofan;

eller (f) amidgruppen i glutamin. Disse metodene beskrives i WO 87/05330

offentliggjort 11. sep. 1987, og i Aplin og Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., s.

259-306. Fjerning av én eller flere karbohydratgrupper som foreligger på et ActRIIB-

20 polypeptid kan oppnås kjemisk og/eller enzymatisk. Kjemisk deglykosylering kan f.eks. omfatte å eksponere ActRIIB-polypeptidet for forbindelsen

trifluormetansulfonsyre eller en ekvivalent forbindelse. Denne behandlingen fører til

avspalting av de fleste eller alle sukkere bortsett fra det tilkoblede sukkeret (N-

acetylglukosamin eller N-acetylgalaktosamin), mens aminosyresekvensen forblir

25 intakt. Kjemisk deglykosylering beskrives mer utførlig av Hakimuddin mfl. (1987)

Arch. Biochem. Biophys. 259:52 og av Edge mfl. (1981) Anal. Biochem. 118:131.

Enzymatisk avspalting av karbohydratgrupper på ActRIIB-polypeptider kan oppnås

ved anvendelse av en rekke forskjellige endo- og eksoglykosidaser, som beskrevet av

Thotakura mfl. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. Sekvensen til et ActRIIB-polypeptid

30 kan justeres på egnet vis, avhengig av typen ekspresjonssystem som benyttes, siden

pattedyr-, gjær-, insekt- og planteceller alle kan innføre forskjellige

glykosyleringsmønstre som kan påvirkes av peptidets aminosyresekvens. Generelt vil

ActRIIB-proteiner for anvendelse i mennesker uttrykkes i en pattedyrcellelinje som

sørger for korrekt glykosylering, slik som HEK293- eller CHO-cellelinjer, selv om

35 andre pattedyrcellelinjer for ekspresjon også forventes å være anvendbare.

[0061] Denne beskrivelsen kontemplerer videre en fremgangsmåte for å frembringe

varianter, spesielt sett av kombinatoriske varianter av ActRIIB-polypeptid, eventuelt

inkludert avkortede varianter. Samlinger av kombinatoriske mutanter er spesielt nyttige

for påvisning av funksjonelle sekvensvarianter. Formålet med å gjennomføre slike

kombinatoriske biblioteker kan f.eks. være å frembringe ActRIIB-polypeptidvarianter som har endrede egenskaper, slik som endret farmakokinetikk eller endret ligandbinding. En rekke forskjellige gjennom søkningsanalyser tilveiebringes nedenfor, og slike analyser kan anvendes for evaluering av varianter. F.eks. kan en ActRIIB-polypeptidvariant gjennom søkes for evne til å bindes til et ActRIIB-polypeptid for å hindre at en ActRIIB-ligand bindes til et ActRIIB-polypeptid.

[0062] Aktiviteten til et ActRIIB-polypeptid eller dets varianter kan også analyseres i en cellebasert analyse eller in vivo-analyse. F.eks. kan man vurdere virkningen av en ActRIIB-polypeptidvariant på ekspresjonen av gener som deltar i bendannelse i en osteoblast eller forløper. Dette kan etter behov utføres i nærvær av ett eller flere rekombinante ActRIIB-ligandproteiner (f.eks. BMP7), og celler kan transfekteres slik at de produserer et ActRIIB-polypeptid og/eller varianter av dette, og eventuelt en ActRIIB-ligand. Likeså kan et ActRIIB-polypeptid administreres til en mus eller et annet dyr, og én eller flere egenskaper av ben, slik som tetthet eller volum, kan evalueres. Hastigheten for heling av benbrudd kan også evalueres. Likeledes kan aktiviteten av et ActRIIB-polypeptid eller dets varianter analyseres i muskelceller, adipocytter og nerveceller for effekt på veksten av disse cellene, f.eks. ved bruk av analysene som beskrives under. Slike analyser er velkjente i faget, og anses som rutiner. Et SMAD-responsivt rapporteringsgen kan brukes i slike cellelinjer for å overvåke effekten på nedstrøms signalisering.

[0063] Det kan frembringes kombinatorisk avledede varianter som har en selektiv effekt sammenlignet med et naturlig forekommende ActRIIB-polypeptid. Slike proteinvarianter kan brukes i genterapiprotokoller når de er en ekspresjon av rekombinante DNA-konstruksjoner. Likeledes kan mutagenese gi opphav til varianter som har en intracellulær halveringstid som er dramatisk forskjellig fra det tilsvarende villtype-ActRIIB-polypeptidet. F.eks. kan det endrede proteinet gjøres enten mer stabilt eller mindre stabilt overfor proteolytisk degradering eller andre prosesser som fører til ødeleggelse eller inaktivering på annet vis av et nativt ActRIIB-polypeptid. Slike varianter og genene som koder for dem kan benyttes for å endre nivået av ActRIIB-polypeptid ved å modulere ActRIIB-polypeptidenes halveringstid. F.eks. kan en kort halveringstid gi opphav til mer forbigående biologiske virkninger, og tillate en tettere kontroll av nivået av rekombinant ActRIIB-polypeptid i cellen når det er en del av et induserbart ekspresjonssystem.

[0064] I enkelte utførelsesformer kan ActRIIB-polypeptidene i oppfinnelsen videre omfatte posttranslasjonelle modifikasjoner i tillegg til de som eventuelt foreligger naturlig i ActRIIB-polypeptidene. Slike modifikasjoner omfatter, men er ikke begrenset til, acetylering, karboksylering, glykosylering, fosforylering, lipidering og acylering. Som et resultat kan de modifiserte ActRIIB-polypeptidene inneholde ikke-aminosyre-bestanddeler, slik som polyetylenglykoler, lipider, poly- eller monosakkarid

og fosfater. Virkningene av slike ikke-aminosyre-bestanddeler på funksjonaliteten av et ActRIIB-polypeptid kan analyseres som beskrevet heri for andre ActRIIB-polypeptidvarianter. Dersom et ActRIIB-polypeptid fremstilles i celler ved å spalte en nysyntetisert form av ActRIIB-polypeptidet, kan posttranslasjonell prosessering også
 5 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 ActRIIB-polypeptidene sikres.

[0065] I enkelte aspekter kan funksjonelle varianter eller modifiserte former av
 10 ActRIIB-polypeptidene omfatte fusjonsproteiner som i det minste har en del av ActRIIB-polypeptidene og ett 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 et immunglobulin-tungkjede (Fc), maltosebindende protein (MPB) eller humant
 15 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 affinitetsrensing benyttes relevante matrikser for affinitetskromatografi, slik som resiner konjungert til glutathion, amylase og nikkel eller kobolt. Mange slike matrikser er tilgjengelige i form av "sett", slik som
 20 Pharmacia GST-rensesystemet og QIAexpress™-systemet (Qiagen), som er nyttige med (HIS₆)-fusjonspartnere. Som et annet eksempel kan et fusjonsdomene utvelges for å forenkle påvisningen av ActRIIB-polypeptidene. Eksempler på slike deteksjonsdomener omfatter de forskjellige fluorescerende proteinene (f.eks. GFP), så vel som "epitopetagg", som vanligvis er korte peptidsekvenser som et spesifikt antistoff
 25 er tilgjengelig for. Velkjente epitopetagger som spesifikke monoklonale antistoffer er lett tilgjengelige for, omfatter taggene FLAG, hemagglutinin (HA) fra influensavirus og c-myc. I noen tilfeller har fusjonsdomenene et spaltingssete for en protease, slik som for 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
 30 frigjorte proteinene kan så isoleres fra fusjonsdomenet ved påfølgende kromatografisk separasjon. I enkelte foretrukne utførelsesformer fusjoneres et ActRIIB-polypeptid med et domene som stabiliserer ActRIIB-polypeptidet in vivo (et "stabilisator"-domene). Med "stabilisere" menes hva som helst som forlenger halveringstiden til serumet, uavhengig av om dette skyldes redusert nedbrytning, reduser clearance gjennom nyrene
 35 eller en annen farmakokinetisk virkning. Det er kjent at fusjoner med Fc-delen av et immunglobulin gir ønskelige farmakokinetiske egenskaper til et bredt utvalg av proteiner. Likeledes kan fusjoner til humant serumalbumin gi ønskelige egenskaper. Andre typer fusjonsdomener som kan velges omfatter multimeriserende (f.eks. dimeriserende, tetrameriserende) domener og funksjonelle domener (som innfører en

ekstra biologisk funksjon, slik som videre stimulering av muskelvekst).

[0066] Som et spesifikt eksempel er et fusjonsprotein som en GDF8-antagonist som
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD (A) VSHEDPEVKFNWYVDGVE domene
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK (A) VSNKALPVPIEKTISKAKGQPR
 5 EPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGPFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN (A) HYTQKSLSLSPGK*

[0067] Fortrinnsvis har Fc-domenet én eller flere mutasjoner i rester slik som Asp-265, lysin 322 og Asn-434. I visse tilfeller har det mutante Fc-domenet med én eller flere av disse mutasjonene (f.eks. Asp-265-mutasjon) redusert evne til å bindes til Fcγ-reseptoren, sammenlignet med et villtype-Fc-domene. I andre tilfeller har det mutante Fc-domenet med én 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.

[0068] Det er underforstått at ulike elementer i fusjonsproteinene kan være arrangert på en hvilken som helst måte som er i samsvar med den ønskede funksjonaliteten. F.eks. kan et ActRIIB-polyeptid være plassert C-terminalt for et heterologt domene, eller eventuelt kan et heterologt domene være plassert C-terminalt for et ActRIIB-polyeptid. ActRIIB-polyeptiddomenet 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 et hvilket som helst av domene eller mellom domene.

[0069] I visse utførelsesformer inneholder ActRIIB-polyeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse én eller flere modifikasjoner som kan stabilisere ActRIIB-polyeptidene.

Slike modifikasjoner kan f.eks. forbedre in vitro-halveringstiden for ActRIIB-polyeptidene, forbedre halveringstiden i sirkulasjonen for ActRIIB-polyeptidene eller redusere proteolytisk degradering av ActRIIB-polyeptidene. Slike stabiliserende modifikasjoner omfatter, men er ikke begrenset til, fusjonsproteiner (deriblant f.eks. fusjonsproteiner som omfatter et ActRIIB-polyeptid og et stabilisatoromene), modifikasjoner av et glykosyleringssete (innbefattet f.eks. addisjon av et glykosyleringssete til et ActRIIB-polyeptid) og modifikasjoner av karbohydratgruppen (innbefattet f.eks. fjerning av karbohydratgrupper fra et ActRIIB-polyeptid). Når det gjelder fusjonsproteiner er et ActRIIB-polyeptid fusjonert til et stabilisatoromene, slik som et IgG-molekyl (f.eks. et Fc-domene). Som anvendt heri viser begrepet "stabilisatoromene" ikke bare til et fusjonsdomene (f.eks. Fc), som er tilfellet for fusjonsproteiner, med omfatter også ikke-proteinbaserte modifikasjoner, f.eks. en karbohydratgruppe eller en ikke-proteinbasert polymer, f.eks. polyetylen glykol.

[0070] I visse utførelsesformer blir isolerte og/eller rensede former av ActRIIB-

polypeptidene som er isolert fra eller på annet vis er frie for andre proteiner gjort tilgjengelige av den foreliggende oppfinnelsen.

[0071] I visse utførelsesformer kan ActRIIB-polypeptidene (umodifiserte eller modifiserte) ifølge oppfinnelsen fremstilles av en rekke teknikker som er kjente innen faget. F.eks. kan slike ActRIIB-polypeptider syntetiseres ved bruk av standard teknikker for proteinkjemi, slik som de som beskrives i Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993) og Grant G. A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, New York (1992). I tillegg er automatiserte peptidsynteseinstrumenter kommersielt tilgjengelige (f.eks. Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Biosearch 9600). Eventuelt kan ActRIIB-polypeptidene, fragmentene eller variantene derav fremstilles rekombinant ved bruk av ulike ekspresjonssystemer (f.eks. E. coli, ovarieceller fra kinesisk hamster, COS-celler, baculovirus) som er velkjente innen faget (se også under). I en ytterligere utførelsesform kan de modifiserte eller umodifiserte ActRIIB-polypeptidene fremstilles ved nedbrytning av naturlig forekommende eller rekombinant produserte ActRIIB-fullengdepolypeptider ved bruk av f.eks. en protease, f.eks. trypsin, termolysin, kymotrypsin, pepsin eller spaltingsenzym for paret basisk aminosyre (PACE). Datamaskinanalyse (ved bruk av kommersielt tilgjengelig programvare, f.eks. MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) kan brukes til å identifisere proteolytiske spaltingssteder. Eventuelt kan slike ActRIIB-polypeptider fremstilles fra naturlig forekommende eller rekombinant produsert fulllengde-ActRIIB-polypeptider, slik som standard teknikker kjent innen faget, f.eks. ved kjemisk spalting (f.eks. cyanogenbromid, hydroksylamin).

3. Nukleinsyrer som koder for ActRIIB-polypeptider

[0072] Beskrevet heri er isolerte og/eller rekombinante nukleinsyrer som koder for ethvert av ActRIIB-polypeptidene (f.eks. løselige ActRIIB-polypeptider), deriblant enhver av variantene som beskrives heri. F.eks. SEKV ID NR: 4 koder for et naturlig forekommende ActRIIB-forløperpolypeptid, mens SEKV ID NR: 3 koder for et løselig ActRIIB-polypeptid. Nukleinsyrene det gjelder kan være enkeltrådede eller dobbeltrådede. Slike nukleinsyrer kan være DNA- eller RNA-molekyler. Disse nukleinsyrene kan f.eks. anvendes i fremgangsmåter for fremstilling av ActRIIB-polypeptider eller som direkte terapeutiske midler (f.eks. i en genterapitilnærming).

[0073] Det er videre underforstått at nukleinsyrene som koder for ActRIIB-polypeptidene omfatter nukleinsyrer som er varianter ifølge SEKV ID NR:3. Nukleotidsekvensvarianter omfatter sekvenser som er forskjellige grunnet én eller flere nukleotidsubstitusjoner, -addisjoner eller -delesjoner, slik som alleliske varianter, og vil derfor omfatte kodesekvenser som skiller seg fra nukleotidsekvensen til kodesekvensen

angitt i SEKV ID NR: 4.

[0074] Beskrevet heri er isolerte eller rekombinante nukleinsyresekvenser som er minst 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % eller 100 % identiske med SEKV ID NR:3.

En person med alminnelige kunnskaper innen faget vil forstå at nukleinsyresekvenser som er komplementære til SEKV ID NR:3 også beskrives. Nukleinsyresekvensene kan være isolerte, rekombinante og/eller fusjonert til en heterolog nukleotidsekvens, eller foreligge i et DNA-bibliotek.

[0075] Andre nukleinsyrer omfatter også nukleinsekvenser som hybridiserer under betingelser med høy stringens til nukleotidsekvensen spesifisert i SEKV ID NR: 3, den komplementære sekvensen til SEKV ID NR: 3, eller fragmenter av denne. Som omtalt 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 f.eks. 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. F.eks. 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 nukleinsyrer som hybridiserer under betingelser med lav stringens, 6 x SSC ved romtemperatur fulgt av en vask med 2 x SSC ved romtemperatur.

[0076] Isolerte nukleinsyrer som er forskjellige fra nukleinsyrene som er beskrevet i SEKV ID NR:3 fordi den genetiske koden er degenerert, omtales også. For eksempel spesifiseres en rekke aminosyrer av mer enn én triplett. Kodoner som spesifiserer den samme aminosyren, eller synonymer (f.eks. er CAU og CAC synonymer for histidin) kan føre til "stille" mutasjoner som ikke påvirker proteinets aminosyresekvens. Det forventes imidlertid at DNA-sekvenspolymorfier som fører til endringer i aminosyresekvensene til de gjeldende proteinene vil finnes blant pattedyrcellene. En fagperson vil forstå at disse variasjonene i ett eller flere nukleotider (opptil 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. En hvilken som helst og alle slike nukleotide variasjoner og resulterende aminosyrepolymerfismer beskrives heri.

[0077] De rekombinante nukleinsyrene kan være operativt koblet til én eller flere regulatoriske nukleotidsekvenser i en ekspresjonskonstruksjon. 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 en rekke vertsceller. Typisk kan den eller de

gjeldende regulatoriske nukleotidsekvensene omfatte, uten å være begrenset til, promotersekvenser, leder- eller signalsekvenser, ribosombindingsseter, 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 ekspresjonskonstruksjon 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 vertscellen.

[0078] Nukleinsyren kan foreligge i en ekspresjonsvektor som omfatter en nukleotidsekvens som koder for et ActRIIB-polypeptid og operativt koblet til minst én regulatorisk sekvens. Regulatoriske sekvenser er kjente innen faget og er utvalgt for å styre ekspresjonen av ActRIIB-polypeptidet. Begrepet regulatorisk sekvens omfatter følgelig promotere, enhancere og andre ekspresjonskontrollelementer. Eksempler på regulatoriske sekvenser er beskrevet i Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). F.eks. 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 ActRIIB-polypeptid. Slike anvendbare ekspresjonskontrollsekvenser omfatter f.eks. den tidlige og sene promoteren fra SV40, tet-promoteren, den umiddelbart tidlige promoteren fra adenovirus eller cytomegalovirus, RSV-promoterer, lac-systemet, trp-systemet, TAC- eller TRC-systemet, T7-promoteren, hvis ekspresjon styres av T7 RNA polymerase, hovedoperator- og -promoterområdene fra fag lambda, kontrollområdene for fd-kappeprotein, promoteren for 3-fosfoglycerat kinase eller andre glykolyseenzym, promoterene for sur fosfatase, f.eks. Pho5, promoterene 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 være avhengig 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 eventuelt andre proteiner som kodes av vektoren, f.eks. antibiotikamarkører, også tas i betraktning.

[0079] En rekombinant nukleinsyre kan fremstilles ved å ligere det klonede genet eller en del av det inn i en vektor som er egnet for ekspresjon i enten prokaryote celler, eukaryote celler (gjærceller, fugleceller, insektceller eller pattedyrceller) eller begge deler. Ekspresjonsvehikler for fremstilling av et rekombinant ActRIIB-polypeptid

omfatter plasmider og andre vektorer. Egnede vektorer omfatter for eksempel plasmider av typene: pBR322-avlede plasmider, pEMBL-avlede plasmider, pEX-avlede plasmider, pBTac-avlede plasmider og pUC-avlede plasmider for ekspresjon i prokaryote celler, f.eks. *E. coli*.

5 **[0080]** Noen pattedyrekspresjonsvektorer inneholder både prokaryote sekvenser for å fremme oppformering av vektoren i bakterier og én eller flere eukaryote transkripsjonsenheter som uttrykkes i eukaryote celler. pcDNAI/amp-, pcDNAI/neo-, pRc/CMV-, pSV2gpt-, pSV2neo-, pSV2-dhfr-, pTk2-, pRSVneo-, pMSG-, pSVT7-, pko-neo- og pHyg-avlede vektorene er eksempler på pattedyrekspresjonsvektorer
10 som er egnet for transfeksjon av eukaryote celler. Noen av disse vektorene er modifisert med sekvenser fra bakterieplasmider, f.eks. pBR322, for å muliggjøre replikasjon og medikamentresistensseleksjon i både prokaryote og eukaryote celler. Eventuelt kan derivater av virus som bovin papillomavirus (BPV-1) eller Epstein-Barr-virus (pHEBo, pREP-avlede og p205) anvendes for transient ekspresjon av
15 proteiner i eukaryote celler. Eksempler på andre virale (inkludert retrovirale) ekspresjonssystemer kan finnes nedenfor i beskrivelsen av tilførselssystemer for genterapi. De forskjellige 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
20 generelle rekombinante fremgangsmåter, se Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2. utg. red. av Sambrook, Fritsch og Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), kapittel 16 og 17. I noen tilfeller kan det være ønskelig å uttrykke de rekombinante polypeptidene ved anvendelse av et baculovirus-ekspresjonssystem. Eksempler på slike baculovirus-ekspresjonssystemer omfatter pVL-avlede vektorer
25 (som pVL1392, pVL1393 og pVL941), pAcUW-avlede vektorer (som pAcUW1) og pBlueBac-avlede vektorer (som den β -galholdige pBlueBac III).

[0081] En vektor vil fortrinnsvis være utformet for fremstilling av de aktuelle ActRIIB-polypeptidene i CHO-celler, slik som en Pcmv-Script-vektor (Stratagene, La Jolla, Calif.), pcDNA4-vektorer (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) og pCI-neo-vektorer (Promega,
30 Madison, Wise.). Det vil være åpenbart at de aktuelle genkonstruksjonene kan anvendes for å oppnå ekspresjon av de aktuelle ActRIIB-polypeptidene i celler som oppformerer i kultur, f.eks. for fremstilling av proteiner, deriblant fusjonsproteiner eller proteinvarianter, for rensing.

[0082] Heri beskrives en vertscelle som transfekteres med et rekombinant gen som
35 omfatter en kodende sekvens (f.eks. SEKV ID NR:4) for ett eller flere av de aktuelle ActRIIB-polypeptidene. Vertscellen kan være en hvilken som helst prokaryot eller eukaryot celle. F.eks. kan et ActRIIB-polypeptid ifølge oppfinnelsen uttrykkes i bakterieceller slik som *E. coli*, insektceller (f.eks. ved anvendelse av et baculovirus-ekspresjonssystem), gjærceller eller pattedyrceller. Andre egnede vertsceller er kjente

blant fagfolk.

[0083] Følgelig beskrives fremgangsmåter for fremstilling av de aktuelle ActRIIB-polypeptidene. For eksempel kan en vertscelle som er transfektert med en ekspresjonsvektor som koder for et ActRIIB-polypeptid dyrkes under betingelser som er egnede for ekspresjon av ActRIIB-polypeptidet. ActRIIB-polypeptidet kan utskilles og isoleres fra en blanding av celler og medium som inneholder ActRIIB-polypeptidet. Eventuelt kan ActRIIB-polypeptidet beholdes i cytoplasma eller i en membranfraksjon, cellene høstes og lyseres, og proteinet isoleres. En cellekultur omfatter vertsceller, medium og andre sideprodukter. Egnede medier for celledyrking er velkjente innen faget. De aktuelle ActRIIB-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 ActRIIB-polypeptidene. ActRIIB-polypeptidet kan være et fusjonsprotein som inneholder et domene som forenkler rensingen av det.

[0084] Et fusjonsgen som koder for en ledersekvens for rensing, slik som poly-(His)/enterokinasespaltingssetesekvens, i N-enden av den ønskede delen av det rekombinante ActRIIB-polypeptidet, kan muliggjøre rensing av det uttrykte fusjonsprotein ved affinitetskromatografi på et Ni^{2+} -metallresin. Ledersekvensen for rensing kan så senere fjernes ved behandling med enterokinase for å tilveiebringe det rensede ActRIIB-polypeptidet (f.eks. se Hochuli mfl., (1987) J. Chromatography 411:177; og Janknecht mfl., PNAS USA 88:8972).

[0085] 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, nedbryting med restriksjonsenzymer for tilveiebringelse av egnede ender, innfylling av klebrige ender etter behov, behandling med alkalisk fosfatase for å unngå uønsket sammenkobling og enzymatisk ligering. I en annen utførelsesform kan fusjonsgenet syntetiseres ved anvendelse av konvensjonelle teknikker, deriblant automatiserte DNA-synteseinstrumenter. Eventuelt kan PCR-amplifisering av genfragmenter utføres ved anvendelse av anker-primere som gir opphav til komplementære overheng mellom to etterfølgende genfragmenter, som så kan hybridiseres for dannelsen av en kimær gensekvens (se f.eks. Current Protocols in Molecular Biology, red. Ausubel mfl., John Wiley & Sons: 1992).

4. Antistoffer

[0086] Antistoffer beskrives også heri. Et antistoff som er spesielt reaktivt med et ActRIIB-polypeptid (f.eks. et løselig ActRIIB-polypeptid) og som bindes i konkurranse

med ActRIIB-polypeptidet kan anvendes som en antagonist av ActRIIB-polypeptidaktiviteter. F.eks. ved anvendelse av immunogener som er avledet fra et ActRIIB-polypeptid, kan antiprotein/antipeptid-antisera eller monoklonale antistoffer fremstilles ved hjelp av standard fremgangsmåter (se f.eks. Antibodies: A Laboratory Manual red. av 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 ActRIIB-polypeptidet, et antigenfragment som kan utløse en antistoffrespons eller et fusjonsprotein. Teknikker for å gjøre et protein eller peptid immunogen omfatter konjugering til bærere eller andre teknikker som er velkjente innen faget. En immunogen del av et ActRIIB-polypeptid kan administreres i nærvær av adjuvans. Immuniseringsforløpet kan overvåkes ved deteksjon av antistofftiter i plasma eller serum. Standard ELISA eller andre immunanalyser kan anvendes med immunogenet som antigen for estimering av antistoffnivået.

[0087] Etter immunisering av et dyr med et antigenpreparat av et ActRIIB-polypeptid, kan antiserum erholdes, og om ønskelig kan polyklonale antistoffer isoleres fra serumet. For fremstilling av monoklonale antistoffer kan antistoffproduserende celler (lymfocytter) høstes fra et immunisert dyr og fusjoneres ved hjelp av standard fremgangsmåter for fusjon av somatiske celler til immortaliserte celler, slik som myelomceller, for å erholde hybridomceller. Slike teknikker er velkjente innen faget og omfatter f.eks. hybridomteknikken (opprinnelig utviklet av Kohler og Milstein, (1975) Nature, 256: 495-497), human B-celle-hybridomteknikken (Kozbar mfl., (1983) Immunology Today, 4: 72), og EBV-hybridomteknikken for fremstilling av humane monoklonale antistoffer (Cole mfl., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. s. 77-96). Hybridomceller kan analyseres immunkjemisk for dannelsen av antistoffer som reagerer spesifikt med et ActRIIB-polypeptid, og monoklonale antistoffer kan isoleres fra en kultur som omfatter slike hybridomceller.

[0088] Begrepet "antistoff" er som det anvendes heri ment å skulle omfatte fragmenter av antistoffer som også reagerer spesifikt med et gjeldende ActRIIB-polypeptid. Antistoffer kan fragmenteres ved anvendelse av konvensjonelle teknikker og fragmentene analyseres for anvendbarhet på samme måte som beskrevet ovenfor for intakte antistoffer. F.eks. kan F(ab)₂-fragmenter frembringes ved å behandle antistoff med pepsin. Det resulterende F(ab)₂-fragmentet kan behandles for reduksjon av disulfidbroer for fremstilling av Fab-fragmenter. Antistoffet kan omfatte bispesifikke, enkeltkjedede, kimære, humaniserte molekyler med en affinitet for et ActRIIB-polypeptid som skyldes minst ett CDR-område fra antistoffet. Antistoffet kan videre omfatte en merking som er koblet til det og som kan påvises (f.eks. kan merkingen være en radioisotop, en fluorescerende forbindelse, et enzym eller en enzymkofaktor).

[0089] Antistoffet kan være et monoklonalt antistoff, og heri beskrives fremgangsmåter for fremstilling av nye antistoffer. F.eks. kan en fremgangsmåte for å fremstille et

monoklonalt antistoff som bindes spesifikt til et ActRIIB-polypeptid omfatte tilførsel til en mus av en mengde immunogen sammensetning som omfatter ActRIIB-polypeptidet som effektivt stimulerer en påvisbar immunrespons, erholdelse av antistoffproduserende celler (f.eks. celler fra milten) fra musen og fusjon av de antistoffproduserende cellene med 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 ActRIIB-polypeptidet. Etter erholdelse av et hybridom kan det oppformeres i cellekultur, eventuelt under dyrkningsbetingelser hvor hybridom-avledede celler produserer det monoklonale antistoffet som bindes spesifikt til ActRIIB-polypeptidet. Det monoklonale antistoffet kan renses fra cellekulturen.

[0090] Adjektivet "spesifikt reaktivt med" 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 ActRIIB-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 biologisk prøve. I visse fremgangsmåter som benytter antistoffet, slik som 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 polypeptidene. En egenskap som påvirker spesifisiteten av en antistoff:antigen-interaksjon er antistoffets affinitet for antigenet. Selv om den ønskede spesifisiteten 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.

[0091] I tillegg kan teknikkene som anvendes for gjennom søkning av antistoffer for påvisning av et ønskelig antistoff påvirke egenskapene til det erholdte antistoffet. Dersom f.eks. et antistoff skal anvendes for binding av et antigen i løsning, kan det være ønskelig å analysere bindingen i løsningen. En rekke forskjellige teknikker er tilgjengelige for analyse av interaksjon mellom antistoffer og antigener for påvisning av spesielt ønskelige antistoffer. Slike teknikker omfatter ELISA-analyser, overflateplasmonresonans-bindingsanalyser (f.eks. Biacore-bindingsanalysen, Bia-core AB, Uppsala, Sverige), sandwich-analyser (f.eks. systemet med paramagnetiske kuler fra IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), western-blotting, immunpresipitasjonsanalyse og immunhistokjemi.

[0092] Beskrivelsen tilveiebringer antistoffer som bindes til et løselig ActRIIB-polypeptid. Slike antistoffer kan fremstilles som beskrevet over, ved anvendelse av et ActRIIB-polypeptid eller fragment av dette som et antigen. Antistoffer av denne typen kan f.eks. anvendes til å påvise ActRIIB-polypeptider i biologiske prøver og/eller til å overvåke løselige ActRIIB-polypeptidnivåer i et individ. I visse tilfeller kan et antistoff

som spesifikt bindes til et løselig ActRIIB-polypeptid anvendes til å regulere aktiviteten til et ActRIIB-polypeptid og/eller en ActRIIB-ligand, og dermed regulere (fremme eller inhibere) veksten av vev slik som ben, brusk, muskel, fett og nevroner.

5. Gjennom søkningsanalyser

[0093] De gjeldende ActRIIB-polypeptidene (f.eks. løselige ActRIIB-polypeptider) kan anvendes for påvisning av forbindelser (midler) som er agonister eller antagonister av ActRIIB-polypeptider. Forbindelser som påvises ved slik gjennom søkning kan analyseres i vev, slik som ben, brusk, muskel, fett og/eller nevroner, for å anslå deres evne til å modulere vevsvekst in vitro. Eventuelt kan disse forbindelsene analyseres videre i dyremodeller for å evaluere deres evne til å modulere vevsvekst in vivo.

[0094] Det finnes en rekke tilnærminger for gjennom søkning etter terapeutiske midler for modulering av vevsvekst med ActRIIB-polypeptider som målmolekyler.

Høykapasitets gjennom søkning av forbindelser kan utføres for å påvise midler som forstyrrer ActRIIB-formidlede virkninger på vekst av ben, brusk, muskel, fett og/eller nevroner. Analysen kan utføres for å søke etter og påvise forbindelser som spesifikt inhiberer eller reduserer bindingen av et ActRIIB-polypeptid til dets bindingspartner, slik som en ActRIIB-ligand (f.eks. aktivin, Nodal, GDF8, GDF11 eller BMP7).

Eventuelt kan analysen anvendes for påvisning av forbindelser som forsterker bindingen av et ActRIIB-polypeptid til dets bindingsprotein, slik som en ActRIIB-ligand. Forbindelsene kan påvises ut fra deres evne til å interagere med et ActRIIB-polypeptid.

[0095] En rekke forskjellige analyseformater vil være tilstrekkelige, og i lys av den foreliggende beskrivelsen vil de som ikke uttrykkelig beskrives heri ikke desto mindre kunne forstås av en person med alminnelige kunnskaper innen faget. Som beskrevet heri kan analyseforbindelsene (midlene) ifølge oppfinnelsen være fremstilt ved enhver kombinatorisk kjemisk fremgangsmåte. Eventuelt 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 f.eks. produseres av bakterier, gjær, planter eller andre organismer (f.eks. naturprodukter), fremstilles kjemisk (f.eks. små molekyler, innbefattet peptidomimetika) eller fremstilles rekombinant. Analyseforbindelser beskrevet heri omfatter organiske ikke-peptidyl-molekyler, peptider, polypeptider, peptidomimetika, sukker, hormoner og nukleinsyremolekyler. Analysemiddelet kan være et lite, organisk molekyl med en molekylvekt som er lavere enn tilnærmet 2 000 dalton.

[0096] Analyseforbindelsene kan foreligge som enkeltvis, adskilte enheter eller i biblioteker av større kompleksitet, f.eks. fremstilt ved kombinatorisk kjemi. Disse bibliotekene kan f.eks. 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 isoleringen av forbindelsene. Ikke-begrensede eksempler på derivatiserende grupper omfatter biotin, fluorescein, digoksygenin, grønt fluorescerende protein, isotoper, polyhistidin, magnetiske kuler, glutathion S transferase (GST), lysaktiverbare kryssbindere eller enhver kombinasjon av disse.

[0097] I mange programmer for søk etter medikamenter som analyserer biblioteker av forbindelser og naturlige ekstrakter er det ønskelig med analyser med høy kapasitet for å maksimallisere antall forbindelser som kan inspiseres innen et gitt tidsrom. Analyser som utføres i cellefrie systemer, som f.eks. kan være avledet med rensede eller delvis rensede proteiner, foretrekkes ofte som "primære" søk, siden de kan fremstilles slik at de tillater hurtig fremkalling og relativt enkel påvisning av en endring i et mål molekyl som er formidlet av en analyseforbindelse. Videre kan virkninger forbundet med celletoksisitet eller biotilgjengelighet av analyseforbindelsen generelt ignoreres i in vitro-systemet, hvor analysen i stedet primært er rettet mot virkningen av medikamentet på mål molekylet, som kan vise seg som en endring av bindingsaffiniteten mellom et ActRIIB-polypeptid og dets bindende protein (f.eks. en ActRIIB-ligand).

[0098] Kun som en illustrasjon settes forbindelsen av interesse i et eksempel på en gjennom søkningsanalyse i forbindelse med et isolert og rensset ActRIIB-polypeptid som normalt er i stand til å bindes til en ActRIIB-ligand, som er passende for hensikten med analysen. Blandingen av forbindelsen og ActRIIB-polypeptidet tilsettes så en sammensetning som inneholder en ActRIIB-ligand. Påvisning og kvantifisering av ActRIIB/ActRIIB-ligandkomplekser utgjør et middel for å bestemme forbindelsens virkning når det gjelder inhibering (eller forsterkning) av kompleksdannelsen mellom ActRIIB-polypeptidet og dets bindende protein. Virkningen av forbindelsen kan estimeres ved å fremstille dose-responskurver fra resultatene 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 f.eks. en isolert og rensset ActRIIB-ligand til en sammensetning som inneholder ActRIIB-polypeptidet, og dannelsen av ActRIIB/ActRIIB-ligandkompleks kvantifiseres i fravær av analyseforbindelsen. Det skal forstås at rekkefølgen som reaktantene sammenblandes 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.

[0099] Kompleksdannelsen mellom ActRIIB-polypeptidet og dets bindende protein

kan påvises ved hjelp av en rekke ulike teknikker. F.eks. kan modulering av dannelsen av komplekser kvantifiseres ved anvendelse av f.eks. påvisbare, merkede proteiner, slik som radiomerket (f.eks. ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C eller ^3H), fluorescensmerket (f.eks. FITC), eller enzymatisk merket ActRIIB-polypeptid eller dets bindende protein, ved immunanalyse

5 **[0100]** Fluorescenspolariseringsanalyser og

fluorescensresonansenergioverføringsanalyser (FRET-analyser) kan anvendes for enten direkte eller indirekte måling av graden av interaksjon mellom et ActRIIB-polypeptid og dets bindende protein. Videre er andre påvisningsmåter, f.eks. slike som bygger på

10 **[0101]** Videre beskriver den foreliggende beskrivelsen bruk av en

interaksjonsfelleanalyse, også kjent som "tohybridanalysen" for påvisning av midler som forstyrrer eller forsterker interaksjonen mellom et ActRIIB-polypeptid og dets bindende protein. Se f.eks. U.S. Patentskrift nr. 5 283 317; Zervos mfl. (1993) Cell 72:223-232; Madura mfl. (1993) J Biol Chem 268:12046-12054; Bartel mfl. (1993) Biotechniques 14:920-924; og Iwabuchi mfl. (1993) Oncogene 8:1693-1696).

Reverserte tohybridsystemer kan anvendes for påvisning av forbindelser (f.eks. små molekyler eller peptider) som dissosierer interaksjoner mellom et ActRIIB-polypeptid og dets bindende protein. Se f.eks. Vidal og Legrain, (1999) Nucleic Acids Res 27:919-29; Vidal og Legrain, (1999) Trends Biotechnol 17:374-81; og U.S. Patentskrift nr. 5 525 490, 5 955 280 og 5 965 368.

25 **[0102]** De gjeldende forbindelsene kan påvises ut fra evnen til å interagere med et

ActRIIB-polypeptid ifølge oppfinnelsen. Interaksjonen mellom forbindelsen og ActRIIB-polypeptidet kan være kovalent eller ikke-kovalent. En slik interaksjon kan f.eks. påvises på proteinnivå ved anvendelse av biokjemiske in vitro-fremgangsmåter, deriblant fotokryssbinding, binding av radiomerket ligand og affinitetskromatografi (Jakoby WB mfl., 1974, Methods in Enzymology 46: 1). I visse tilfeller kan

30 forbindelsene analyseres i en mekanismebasert analyse, f.eks. en analyse for påvisning av forbindelser som bindes til et ActRIIB-polypeptid. Dette kan omfatte en bindingshendelse i fast fase eller væskefase. Eventuelt kan genet som koder for et ActRIIB-polypeptid sammen med et rapportørsystem (f.eks. β -galaktosidase, luciferase eller grønt fluorescerende protein) transfekteres inn i en celle og analyseres mot

35 biblioteket, fortrinnsvis ved gjennomsøkning med høy ytelse eller med enkeltmedlemmer av biblioteket. Andre mekanismebaserte bindingsanalyser kan anvendes, f.eks. bindingsanalyser som påviser endringer i fri energi. Bindingsanalyser kan utføres med målmolekylet festet til en brønn, kule eller brikke, eller innfanget av et immobilisert antistoff eller løst opp ved kapillærelektroforese. De bundne

forbindelsene kan vanligvis påvises ved anvendelse av kolorimetri, fluorescens eller overflateplasmonresonans.

[0103] Heri beskrives fremgangsmåter og midler for stimulering av muskelvekst og økt muskelmasse, f.eks. ved antagoniserende funksjoner av et ActRIIB-polypeptid og/eller en ActRIIB-ligand. Følgelig kan enhver påvist forbindelse analyseres i hele celler eller vev, in vitro eller in vivo, for å bekrefte evnen til å modulere muskelvekst. Forskjellige fremgangsmåter som er kjente innen faget kan benyttes for dette formål. F.eks. utføres fremgangsmåter slik at signaltransduksjonen gjennom et ActRIIB-protein som er aktivert ved binding til en ActRIIB-ligand (f.eks. GDF8) er redusert eller inhibert. Det vil anerkjennes at veksten av muskelvev i organismen vil føre til økt muskelmasse i organismen sammenlignet med muskelmassen til en tilsvarende organisme (eller populasjon av organismer) hvor signaltransduksjonen gjennom et ActRIIB-protein ikke er berørt.

[0104] F.eks. kan virkningen av ActRIIB-polypeptidene eller analyseforbindelsene på muskelcellevekst/-proliferasjon bestemmes ved å måle genekspresjonen av Pax-3 og Myf-5 som er knyttet til proliferasjonen av myogene celler, og genekspresjonen av MyoD som er knyttet til muskeldifferensiering (f.eks. Amthor mfl., Dev Biol. 2002, 251:241-57). Det er kjent at GDF8 nedregulerer genekspresjonen av Pax-3 og Myf-5, og forhindrer genekspresjonen av MyoD. ActRIIB-polypeptidene eller analyseforbindelsene forventes å antagonisere denne aktiviteten til GDF88. Et annet eksempel på cellebaserte analyser omfatter måling av proliferasjonen av myoblaster, slik som C(2)C(12)-myoblaster i nærvær av ActRIIB-polypeptidene eller analyseforbindelsene (f.eks. Thomas mfl., J Biol Chem. 2000, 275:40235-43).

[0105] Beskrevet heri er in vivo-analyser for måling av muskelmasse og -styrke. For eksempel Whittemore mfl. (Biochem Biophys Res Commun. 2003, 300:965-71) beskriver en fremgangsmåte for å måle økt skjelettmuskelmasse og økt gripestyrke i mus. Eventuelt kan denne fremgangsmåten anvendes til å bestemme terapeutisk effekt på analyseforbindelser (f.eks. ActRIIB-polypeptider) på muskelsykdommer eller -tilstander, f.eks. sykdommer hvor muskelmassen er begrenset.

[0106] Fremgangsmåter og midler for å modulere (stimulere eller inhibere) bendannelse og økt benmasse kan tilveiebringes. Følgelig kan enhver påvist forbindelse analyseres i hele celler eller vev, in vitro eller in vivo, for å bekrefte evnen til å modulere ben- eller bruskvekst. Forskjellige fremgangsmåter som er kjente innen faget kan benyttes for dette formål.

[0107] F.eks. kan virkningen av ActRIIB-polypeptidene eller analyseforbindelsene på vekst av ben eller brusk bestemmes ved å måle induksjon av Msx2 eller differensiering av osteoprogenitorceller til osteoblaster i cellebaserte analyser (se f.eks. Daluiski mfl., Nat Genet. 2001, 27(1):84-8; Hino mfl., Front Biosci. 2004, 9:1520-9). Et annet eksempel på cellebaserte analyser omfatter analyse av den osteogene aktiviteten av de

gjeldende ActRIIB-polypeptidene og analyseforbindelsene i mesenkymale progenitorceller og osteoblastiske celler. Som en illustrasjon kan det konstrueres rekombinant adenovirus som uttrykker et ActRIIB-polypeptid for infeksjon av pluripotente mesenkymale C3H10T1/2-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 mfl., J bone Joint Surg Am. 2003, 85-A(8):1544-52).

[0108] In vivo-analyser vurderes også for måling av vekst av ben eller brusk. F.eks. beskriver Namkung-Matthai mfl., Bone, 28:80-86 (2001) en osteoporosemodell i rotte hvor reparasjon av ben i den tidlige perioden etter brudd undersøkes. Kubo mfl., Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 68:197-202 (1999) beskriver også en osteoporosemodell i rotte hvor reparasjon av ben i den sene perioden etter brudd undersøkes. Disse referansene beskriver en rottemodell for studie av osteoporotiske benbrudd. Den foreliggende beskrivelsen benytter analyser for bruddheling som er kjent innen faget. Disse analysene omfatter bruddteknikk, histologisk analyse og biokjemisk analyse som f.eks. beskrives i U.S. Patentskrift nr. 6 521 750, som beskriver eksperimentelle fremgangsmåter for å forårsake, så vel som for å måle omfanget av brudd, samt reparasjonsprosessen.

[0109] Heri beskrives fremgangsmåter og midler for å kontrollere vektøkning og fedme. På cellenivå er proliferasjon og differensiering av adipocytter vesentlig i utviklingen av fedme, som fører til dannelse av ytterligere fettceller (adipocytter). Følgelig kan enhver påvist forbindelse analyseres i hele celler eller vev, in vitro eller in vivo, for å bekrefte evnen til å modulere adipogenesen ved å måle proliferasjonen eller differensieringen av adipocytter. Forskjellige fremgangsmåter som er kjente innen faget kan benyttes for dette formål. F.eks. kan virkningen av et ActRIIB-polypeptid (f.eks. et løselig ActRIIB-polypeptid) eller en analyseforbindelse på adipogenesen bestemmes ved å måle differensieringen av 3T3-L1 preadipocytter til modne adipocytter i cellebaserte analyser, f.eks. ved å observere akkumuleringen av triacylglyserol i Oil Red O-fargede vesikler og ved opptreden av visse adipocyttmarkører slik som FABP (aP2/422) og PPAR γ 2. Se for eksempel Reusch mfl., 2000, Mol Cell Biol. 20:1008-20; Deng mfl., 2000, Endocrinology. 141:2370-6; Bell mfl., 2000, Obes Res. 8:249-54. Et annet eksempel på cellebaserte analyser omfatter analysering av rollen til ActRIIB-polypeptider og analyseforbindelser ved proliferasjon av adipocytter eller forløperceller til adipocytter (f.eks. 3T3-L1-celler), f.eks. ved å overvåke bromodeoksyridin-positive (BrdU-positive) celler. Se for eksempel Pico mfl., 1998, Mol Cell Biochem. 189:1-7; Masuno mfl., 2003, Toxicol Sci. 75:314-20.

[0110] Det er forstått at gjennom søkingsanalysene beskrevet heri ikke bare gjelder for gjeldende ActRIIB-polypeptider og varianter av ActRIIB-polypeptidene, men også for

enhver analyseforbindelse som omfatter agonister og antagonister av ActRIIB-polypeptidene. Videre er disse gjennom søkingsanalysene nyttige for verifikasjon av legemiddelmål og kvalitetskontrollformål.

5 6. Eksempler på terapeutiske anvendelser

[0111] Sammensetningene (f.eks. ActRIIB-polypeptider) ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan brukes til behandling eller til forebygging av en sykdom eller tilstand som er knyttet til unormal aktivitet av et ActRIIB-polypeptid og/eller en ActRIIB-
10 ligand (f.eks. GDF8). Disse sykdommene, forstyrrelsene eller tilstandene kalles heri vanligvis "ActRIIB-relaterte tilstander". Heri beskrives fremgangsmåter for behandling eller forebygging av en tilstand i et individ med behov for dette ved å administrere en terapeutisk effektiv mengde av ActRIIB-polypeptid som beskrevet overfor. Disse fremgangsmåtene er fortrinnsvis rettet mot terapeutisk og profylaktisk behandling av
15 dyr, og mer foretrukket mennesker.

[0112] Som anvendt heri viser et terapeutisk middel som "forebygger" en forstyrrelse eller tilstand til en forbindelse som i et statistisk utvalg reduserer forekomsten av forstyrrelsen eller tilstanden i det behandlede utvalget sammenlignet med et ubehandlet kontrollutvalg, eller forsinker oppstarten eller reduserer alvorlighetsgraden av ett eller
20 flere symptomer på forstyrrelsen eller tilstanden i forhold til det ubehandlede kontrollutvalget. Begrepet "behandle" omfatter som det anvendes heri profylakse av den nevnte tilstanden eller lindring eller eliminering av tilstanden når den først har etablert seg.

[0113] ActRIIB/ActRIIB-ligandkomplekser spiller en vesentlig rolle i vevsvekst, samt i
25 de tidlige utviklingsprosessene, slik som riktig dannelse av ulike strukturer eller i én eller flere postutviklingskapasiteter, inkludert seksuell utvikling, hormonproduksjon i hypofysen og dannelse av ben og brusk. Dermed omfatter ActRIIB-relaterte tilstander unormal vevsvekst og utviklingsdefekter. I tillegg omfatter ActRIIB-relaterte tilstander, men de er ikke begrenset til, forstyrrelser i cellevekst og differensiering slik som
30 inflammasjon, allergi, autoimmune sykdommer, smittsomme sykdommer og tumorer.

[0114] Eksempler på ActRIIB-relaterte tilstander inkluderer nevromuskulære sykdommer (f.eks. muskeldystrofi og muskelatrofi), kongestiv obstruktiv lungesykdom (og muskelsvinn relatert til COPD), muskelsvinnssyndrom, sarkopeni, kakeksi, sykdommer i adipøst vev (f.eks. fedme), type 2-diabetes og bende generative
35 sykdommer (f.eks. osteoporose). Andre eksempler på ActRIIB-relaterte tilstander omfatter muskeldegenerative og nevromuskulære sykdommer, vevsreparasjon (f.eks. sårheling), neurodegenerative sykdommer (f.eks. amyotrofisk lateralsklerose), immunologiske sykdommer (f.eks. sykdommer relatert til unormal lymfocytproliferasjon eller -funksjon) og fedme eller sykdommer relatert til unormal

proliferasjon av adipocytter.

[0115] I visse utførelsesformer brukes sammensetninger (f.eks. løselige ActRIIB-polypeptider) ifølge oppfinnelsen som del av en behandling for en muskeldystrofi. Begrepet "muskeldystrofi" viser til en gruppe degenerative muskelsykdommer som kjennetegnes av gradvis svekkelse og nedbryting av skjelettmuskler, og i noen tilfeller hjerte- og åndedrettsmuskulaturen. Muskeldystrofier er genetiske sykdommer som kjennetegnes av progressivt muskelsvinn og svakhet som begynner med mikroskopiske endringer i muskelen. Ettersom musklene brytes ned over tid, reduseres personens muskelstyrke. Eksempler på muskeldystrofier som kan behandles med et regime som omfatter de gjeldende ActRIIB-polypeptidene inkluderer: Duchennes muskeldystrofi (DMD), Beckers muskeldystrofi (BMD), Emery-Dreifuss muskeldystrofi (EDMD), Limb-Girdle muskeldystrofi (LGMD), Facio-scapulo-humeral muskeldystrofi (FSH eller FSHD) (også kjent som Landouzy-Dejerine), myotonisk muskeldystrofi (MMD) (også kjent som Steinerts sykdom), okulofaryngeal muskeldystrofi (OPMD), distal muskeldystrofi (DD), kongenitt muskeldystrofi (CMD).

[0116] Duchennes muskeldystrofi (DMD) ble først beskrevet av den franske nevrologen Guillaume Benjamin Amand Duchenne på 1860-tallet. Beckers muskeldystrofi (BMD) er oppkalt etter den tyske legen Peter Emil Becker, som var den første til å beskrive denne varianten av DMD på 1950-tallet. DMD er en av de hyppigste arvelige sykdommene hos menn, og rammer én av 3 500 gutter. DMD oppstår når dystrofin-genet som befinner seg i den korte armen til X-kromosomet brytes. Siden menn ofte bærer én kopi av X-kromosomet, har de bare én kopi av dystrofin-genet. Uten dystrofin-proteinet skades muskelen lett ved sammentreknings- og avslapningssykluser. Tidlig i sykdomsforløpet kompenserer muskelen ved regenerering. Senere kan ikke stamcellene i muskelen holde følge med den pågående skaden, og sunn muskel erstattes med ikke-funksjonelt fibrøst fettvev.

[0117] BMD er et resultat av ulike mutasjoner i dystrofin-genet. BMD-pasienter har noe dystrofin, men det er enten ikke nok i mengde, eller av dårlig kvalitet. Det å ha noe dystrofin beskytter musklene til de med BMD fra så alvorlig eller rask degenerering som de som lider av DMD.

[0118] F.eks. viser nye undersøkelser at blokkering eller eliminering av GDF8-funksjonen (en ActRIIB-ligand) in vivo effektivt kan behandle i hvert fall visse symptomer i DMD- og BMD-pasienter. Dermed kan de gjeldende ActRIIB-polypeptidene fungere som GDF8-inhibitorer (antagonister), og utgjøre en alternativ måte å blokkere funksjonene til GDF8 og/eller ActRIIB in vivo i DMD- og BMD-pasienter. Denne tilnærmelsen bekreftes og støttes av dataene som vises heri, hvorved et ActRIIB-Fc-protein ble vist å øke muskelmassen i en musemodell av muskeldystrofi.

[0119] Likeledes tilveiebringer de gjeldende ActRIIB-polypeptidene en effektiv måte å øke muskelmassen på, ved andre sykdomstilstander som har behov for muskelvekst.

F.eks. er ALS, også kalt Lou Gehrigs sykdom (motornevronsykdom) en kronisk, uhelbredelig og ustoppelig CNS-sykdom som angriper motornevronene, komponentene i CNS som kobler hjernen til skjelettmuskulaturen. I ALS brytes motornevronene ned før de til slutt dør, og selv om personens hjerne vanligvis forblir fullstendig funksjonell og våken, kommer aldri kommandoene for å bevege musklene frem. De fleste som får ALS er mellom 40 og 70 år gamle. De første motornevronene som svekkes er de som fører til armene og benene. De som har ALS kan ha problemer med å gå, de kan miste ting, falle ned, snakke utydelig og le eller gråte ukontrollerbart. Til slutt begynner musklene i lemmene å svinne pga. manglende bruk. Denne muskelsvakheten vil svekke personen, og han vil ha behov for en rullestol eller ikke kunne fungere utenfor sengen. De fleste ALS-pasienter dør av åndedrettssvikt eller av komplikasjoner ved bruk av respirator, som f.eks. lungebetennelse, 3-5 år etter at sykdommen bryter ut. Denne tilnærmelsen bekreftes og støttes av dataene som vises heri, hvorved et ActRIIB-Fc-protein ble vist å forbedre utbrudd, muskelmasse og levetid i en musmodell av ALS.

[0120] ActRIIB-polypeptidindusert økt muskelmasse kan også de som lider av muskelsvinnsykdommer dra fordel av. Gonzalez-Cadavid mfl. (supra) rapporterte at GDF8-ekspresjon korrelerer inverst med fettfri masse i mennesker, og at økt ekspresjon av GDF8-genet er assosiert med vekttap i menn med AIDS-muskelsvinnsyndrom. Ved å hemme GDF8-funksjonen i AIDS-pasienter kan i det meste visse symptomer av AIDS lindres, om ikke helt elimineres, og dermed vesentlig forbedre livskvaliteten til AIDS-pasienter.

[0121] Siden tap av GDF8-funksjon (en ActRIIB-ligand) også er tilknyttet fettap uten redusert næringsinntak (Zimmers mfl., supra; McPherron og Lee, supra), kan de gjeldende ActRIIB-polypeptidene videre anvendes som terapeutisk middel for å senke eller forhindre utvikling av fedme og type II-diabetes. Denne tilnærmelsen bekreftes og støttes av dataene som vises heri, hvorved et ActRIIB-Fc-protein ble vist å forbedre metabolsk status i overvektige mus.

[0122] Kreftsyndromet anoreksi-kakeksi er blant de mest svekkende og livstruende aspektene ved kreft. Progressivt vekttap i kreftsyndromet anoreksi-kakeksi er et felles trekk ved mange typer kreft og er ansvarlig ikke bare for dårlig livskvalitet og dårlig respons på kjemoterapi, men også kortere overlevelse enn det som er funnet hos pasienter med sammenlignbare svulster uten vekttap. Forbundet med anoreksi, svinn av fett- og muskelvev, psykiske plager og lavere livskvalitet, oppstår kakeksi fra et komplekst samspill mellom kreften og verten. Det er en av de vanligste dødsårsakene blant kreftpasienter, og finnes hos 80 % ved dødsfall. Det er et kompleks eksempel på metabolsk kaos som påvirker protein-, karbohydrat- og fettmetabolismen. Tumorer forårsaker både direkte og indirekte abnormaliteter, som fører til anoreksi og vekttap. På nåværende tidspunkt finnes ingen behandling for å kontrollere eller reversere prosessen. Kreftsyndromet anoreksi-kakeksi påvirker cytokinproduksjonen,

frigjøringen av lipidmobiliserende og proteolyseinduserende faktorer, og endringene i den intermediære metabolismen. Selv om anoreksi er vanlig, er ikke redusert matinntak alene istand til å redegjøre for endringene i kroppssammensetningen som observeres i kreftpasienter, og økning av næringsinntaket er ikke nok til å reversere

svinnsyndromet. Kakeksi bør mistenkes hos kreftpasienter hvis et ufrivillig vekttap på mer enn fem prosent av premorbid vekt skjer innenfor en periode på seks måneder.

[0123] Siden systemisk overekspresjon av GDF8 i voksne mus ble funnet å indusere alvorlig muskel- og fettap analogt til hva som observeres i kakeksisyndromer hos mennesker (Zimmers mfl., supra), kan de gjeldende ActRIIB-polypeptidene som farmasøytiske sammensetninger med fordel anvendes til å forebygge, behandle eller lindre symptomer på kakeksisyndrom hvor muskelvekst er ønskelig.

[0124] Heri beskrives fremgangsmåter for å indusere ben- og/eller bruskdannelse, forebygge bentap, øke benmineralisering eller forebygge demineralisering av ben. F.eks. kan de gjeldende ActRIIB-polypeptidene og forbindelsene anvendes i

behandling av osteoporose og heling av benbrudd og bruskdefekter i mennesker og andre dyr. ActRIIB-polypeptider kan anvendes i pasienter som har diagnosen subklinisk lav bentetthet, som et forebyggende tiltak mot utvikling av osteoporose.

[0125] Fremgangsmåter og sammensetninger som beskrives heri kan finne medisinsk anvendelse ved heling av benbrudd og bruskdefekter hos mennesker og andre dyr. De gjeldende fremgangsmåtene og forbindelsene kan også ha profylaktisk anvendelse ved reduksjon av lukkede så vel som åpne brudd, og også ved forbedret fiksering av kunstige ledd. De novo-bendannelse indusert av et osteogent middel bidrar til reparasjon av kongenitale, traumeinduserte eller onkologiske reseksjonsinduserte kraniofaciale defekter, og er også nyttig i kosmetisk plastisk kirurgi. Videre kan fremgangsmåter og sammensetninger beskrevet heri brukes ved behandling av periodontal sykdom og ved andre tannreparasjonsprosesser. I visse tilfeller kan de gjeldende ActRIIB-polypeptidene skape et miljø for å tiltrekke bendannende celler, stimulere vekst av bendannende celler eller indusere differensiering av progenitorer av bendannende celler. ActRIIB-polypeptider kan også være nyttige i behandlingen av osteoporose. Videre kan ActRIIB-polypeptider brukes til reparasjon av bruskdefekter og forebygging/reversering av osteoartrose.

[0126] Den foreliggende beskrivelsen tilveiebringer en terapeutisk fremgangsmåte og sammensetninger for å reparere brudd og andre tilstander tilknyttet brusk- og/eller bendefekter eller periodontale sykdommer. Videre er også terapeutiske

fremgangsmåter og sammensetninger for sårheling og vevsreparasjon tilveiebrakt. Typer av sår omfatter, men er ikke begrenset til, brannså, innsnitt og sår. Se f.eks. PCT publiseringsnr. WO84/01106. Slike forbindelser består av en terapeutisk effektiv mengde av minst ett av ActRIIB-polypeptidene i en blanding med en farmasøytisk godkjent vehikkel, bærer eller matriks.

[0127] Fremgangsmåter og sammensetninger beskrevet heri kan anvendes ved tilstander som forårsaker bentap, slik som osteoporose, hyperparatyreoidisme, Cushings sykdom, tyreotoksikose, kronisk diaré eller dårlig næringsopptak, renal tubulær acidose eller anorexia nervosa. Mange folk vet at det å være kvinne, ha lav kroppsvekt og føre en stillesittende livsstil er risikofaktorer for osteoporose (tap av benmineralitet, som fører til risiko for benbrudd). Men osteoporose kan også være et resultat av langtidsbruk av visse medikamenter. Osteoporose fra medikamenter eller andre medisinske tilstander er kjent som sekundær osteoporose. I en tilstand kjent som Cushings sykdom fører den overskytende mengden kortisol som produseres av kroppen til osteoporose og brudd. De vanligste medikamentene forbundet med sekundær osteoporose er kortikosteroider, en gruppe stoffer som opptrer som kortisol, et hormon som produseres naturlig i binyrene. Selv om tilfredsstillende nivåer av skjoldbruskkjertelhormoner (som produseres av skjoldkjertelen) er nødvendig for utvikling av skjelettet, kan overskytende skjoldbruskkjertelhormon redusere benmassen over tid. Antacida som inneholder aluminium kan føre til bentap når det tas i høye doser av personer med nyreproblemer, spesielt de som undergår dialyse. Andre medikamenter som kan forårsake sekundær osteoporose inkluderer fenytoin (Dilantin) og barbiturater som brukes til å forhindre slag; metotreksat (Rheumatrex, Immunex, Folex PFS), et legemiddel mot noen former av artritt, kreft og immune forstyrrelser; ciklosporin (Sandimmune, Neoral), et stoff som brukes til å behandle enkelte autoimmune sykdommer og for å undertrykke immunsystemet hos organtransplanterte pasienter; luteiniserende hormon-frigjørende hormonagonister (Lupron, Zoladex), som brukes til å behandle prostatakreft og endometriose; heparin (Calciparine, Liquaemin), et antikoagulantia; og kolestyramin (Questran) og kolestipol (Colestid), som brukes til å behandle høyt kolesterol. Tannkjøttssykdommer forårsaker bentap fordi disse skadelige bakteriene i munnen tvinger kroppen til å forsvare seg mot dem. Bakteriene produserer toksiner og enzymer under tannkjøttlinjen som forårsaker en kronisk infeksjon.

[0128] Videre beskrives fremgangsmåter og terapeutiske midler for å behandle sykdommer eller forstyrrelser knyttet til unormal eller uønsket benvekst. F.eks. vokser et unormalt "sekundært skjelett" som hindrer all bevegelse på pasienter som har sykdommen kjent som fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). I tillegg kan unormal benvekst oppstå etter hofteutskiftningskirurgi og dermed ødelegge det kirurgiske utfallet. Dette er et vanligere eksempel på et tilfelle av en patologisk benvekst hvor de foreliggende fremgangsmåtene og sammensetningene kan anvendes terapeutisk. De samme fremgangsmåtene og sammensetningene kan også anvendes for behandling av andre former for unormal benvekst (f.eks. patologisk benvekst etter traume, brannskader eller skade på ryggraden), og for behandling eller forebygging av de uønskede tilstandene tilknyttet unormal benvekst som observeres i forbindelse med

metastatisk prostatakrefte eller osteosarkom. Eksempler på disse terapeutiske midlene inkluderer, men er ikke begrenset til, ActRIIB-polyeptider som hemmer funksjonen til en ActRIIB-ligand (f.eks. BMP7), forbindelser som forstyrrer interaksjonen mellom et ActRIIB og dets ligand (f.eks. BMP7) og antistoffer som spesifikt bindes til en
 5 ActRIIB-reseptor slik at en ActRIIB-ligand (f.eks. BMP7) ikke kan bindes til ActRIIB-reseptoren.

[0129] Sammensetninger og fremgangsmåter for å regulere kroppsfett i et dyr og for å behandle eller forebygge relaterte tilstander, og spesielt relaterte tilstander som kompromitterer helsen, er også beskrevet heri.

10 **[0130]** Å regulere (kontrollere) kroppsvekten kan vise til å redusere eller øke kroppsvekten, redusere eller øke hastigheten av vektøkning, eller øke eller redusere hastigheten av vekttap, og inkluderer også aktiv opprettholdelse, eller ikke vesentlig endring, av kroppsvekten (f.eks. mot eksterne eller interne påvirkninger som ellers kan øke eller redusere kroppsvekten). Kroppsvekten kan reguleres ved å administrere et
 15 ActRIIB-polyeptid til et dyr (f.eks. et menneske) som har behov for det.

[0131] Fremgangsmåter og sammensetninger for å redusere kroppsvekt og/eller redusere vektøkning i et dyr, og mer spesielt, for å behandle eller lindre fedme i pasienter med risiko for eller som lider av fedme, beskrives også heri. Fremgangsmåter og sammensetninger for å behandle et dyr som ikke har evne til å øke eller
 20 opprettholde vekten (f.eks. et dyr med et muskelsvinnsyndrom), er beskrevet. Slike fremgangsmåter er effektive for å øke kroppsvekten og/eller -massen, eller for å redusere vekt- og/eller massetap, eller for å forbedre tilstander relatert til eller forårsaket av uønsket lav (f.eks. usunn) kroppsvekt og/eller -masse.

[0132] Andre sykdommer, inkludert høyt kolesterol, som kan behandles med ActRIIB-proteiner, er beskrevet i eksemplene.
 25

7. Farmasøytiske sammensetninger

30 **[0133]** I visse utførelsesformer er sammensetninger (f.eks. (ActRIIB-polyeptider) ifølge foreliggende oppfinnelse utformet med et farmasøytisk akseptabelt bærestoff. Et ActRIIB-polyeptid 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 eller veterinærmedisin.

35 **[0134]** I visse utførelsesformer kan sammensetningene tilføres topisk, systemisk eller lokalt som et implantat eller en innretning. Ved tilførsel er den terapeutiske sammensetningen for anvendelse selvsagt i en pyrogenfri, fysiologisk akseptabel form. Videre kan sammensetningen fortrinnsvis innkapsles eller injiseres i viskøs form for levering til et målvevssete (f.eks. ben, brusk, muskel, fett eller nevroner), f.eks. et sete

som har vevsskade. Topisk administrering kan være egnet for sårheling og vevsreparasjon. Terapeutisk anvendbare midler i tillegg til ActRIIB-polypeptidene som også eventuelt kan inngå i sammensetningen beskrevet ovenfor, kan eventuelt eller i tillegg tilføres samtidig eller sekvensielt med de angjeldende forbindelsene (f.eks.

5 ActRIIB-polypeptidene) ifølge oppfinnelsen.

[0135] I visse utførelser kan sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse omfatte en matriks som kan tilføre én eller flere terapeutiske forbindelser (f.eks. ActRIIB-polypeptider) til et målsete i et vev, som tilveiebringer en struktur for vevet som utvikles og som optimalt kan resorberes inn i kroppen. Matriksen kan f.eks. sørge for

10 langsom frigjøring av ActRIIB-polypeptidene. Slike matrikser kan utformes av materialer som i dag anvendes for andre implanterte medisinske anvendelser.

[0136] Valget av matriksmateriale bygger på biokompatibilitet, biodegraderbarhet, mekaniske egenskaper, kosmetisk utseende og grenseflateegenskaper. Den spesifikke anvendelsen av de angjeldende sammensetningene vil definere den egnede

15 utformingen. Mulige matrikser for sammensetningene kan være biodegraderbart og kjemisk definert kalsiumsulfat, trikalsiumfosfat, hydroksyapatitt, polymelkesyre og polyanhydrider. Andre mulige materialer er biologisk degraderbare og biologisk veldefinerte, for eksempel ben og dermal kollagen. Ytterligere matrikser består av rene proteiner eller ekstracellulære matrikskomponenter. Andre mulige matrikser er ikke

20 biologisk degraderbare og kjemisk definerte, f.eks. sintret hydroksyapatitt, bioglass, aluminater og andre keramiske stoffer. Matrikser kan omfatte kombinasjoner av hvilke som helst av de ovenfor nevnte materialtypene, f.eks. polymelkesyre og hydroksyapatitt eller kollagen og trikalsiumfosfat. De biokeramiske stoffene kan endres når det gjelder sammensetning, f.eks. kalsiumaluminatfosfat, og prosessering for å

25 endre porestørrelsen, partikkelstørrelsen, partikkelformen og biodegraderbarheten.

[0137] I visse utførelsesformer kan sammensetninger ifølge oppfinnelsen tilføres oralt, f.eks. i form av kapsler, pulverkapsler, 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 ikke-vandig væske, eller som en vann-i-

30 olje flytende emulsjon, eller som en eliksir eller sirup eller som pastiller (ved anvendelse av en inert basis, f.eks. 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 bolus, latverge eller pasta.

35 **[0138]** I faste doseringsformer for oral tilførsel (kapsler, tabletter, piller, drageer, pulvere, partikler og lignende) kan én eller flere terapeutiske forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse være sammenblandet med ett eller flere farmasøytisk akseptable bærestoffer, f.eks. natriumcitrat eller dikalsiumfosfat, og/eller hvilke som helst av følgende: (1) fyllstoffer eller ekstendere, f.eks. stivelser, laktose, sukrose,

glukose, mannitol og/eller kiselsyre; (2) bindemidler, f.eks. karboksymetylcellulose, alginater, gelatin, polyvinylpyrrolidon, sukrose og/eller akasie; (3) fuktighetsbevarende midler, f.eks. glyserol; (4) desintegrasjonsmidler, f.eks. agar-agar, kalsiumkarbonat, potet- eller tapiokastivelse, alginsyre, visse silikater og natriumkarbonat; (5) oppløsningsretarderende midler, f.eks. parafin; (6) absorpsjonsakselererende midler, f.eks. kvaternære ammoniumforbindelser; (7) fuktemidler, f.eks. cetylalkohol og glyserolmonostearat; (8) absorpsjonsmidler, f.eks. kaolin og bentonittleire; (9) smøremidler, f.eks. 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 polyetylenglykoler med høy molekylvekt og lignende.

[0139] Flytende doseringsformer for oral tilførsel omfatter farmasøytiske akseptable emulsjoner, mikroemulsjoner, løsninger, suspensjoner, siruper og eliksirer. I tillegg til den aktive bestanddelen kan de flytende doseringsformene inneholde inerte fortynningsmidler som anvendes alminnelig innen faget, f.eks. vann eller andre løsemidler, løsningshjelpemidler og emulgeringsmidler, f.eks. etylalkohol, isopropylalkohol, etylkarbonat, etylacetat, benzylalkohol, benzylbenzoat, propylenglykol, 1,3-butylenglykol, oljer (fortrinnsvis bomullsfrø-, jordnøtt-, mais-, hvetekim-, oliven-, lakser- 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.

[0140] 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.

[0141] Visse sammensetninger som beskrives heri kan administreres topisk, enten på hud eller slimhinne-membraner. De topiske formuleringene kan videre omfatte ett eller flere av et stort utvalg av midler som er kjent for å være effektive som hud- eller stratum corneum-penetrasjonsforsterkere. Eksempler på disse er 2-pyrrolidon, N-metyl-2-pyrrolidon, dimetylacetamid, dimetylformamid, propylenglykol, metyl- eller isopropylalkohol, dimetylsulfoksid og azon. Ytterligere midler kan videre inkluderes til å gjøre formuleringen kosmetisk akseptabel. Eksempler på disse er fett, voks, oljer, fargestoffer, parfymer, konserveringsmidler, stabiliseringsmidler og overflateaktive midler. Keratolytiske midler slik som de som er kjent innen faget, kan også inkluderes.

Eksempler er salisylsyre og svovel.

[0142] Doseringsformer for topisk eller transdermal tilførsel omfatter pulver, spray, salver, pastaer, kremer, lotion, geler, løsninger, plaster og inhalasjonsmidler. Den aktive bestanddelen kan blandes under sterile forhold med et farmasøytisk akseptabelt bærestoff, og med eventuelle konserveringsmidler, buffere eller drivmidler som kan være nødvendig. Salvene, pastaene, kremene og gelene kan inneholde, i tillegg til en angjeldende forbindelse ifølge oppfinnelsen (f.eks. et ActRIIB-polyeptid), eksipienser, slik som animalsk og vegetabilsk fett, oljer, voks, parafiner, stivelse, tragant, cellulosederivater, polyetylenglykoler, silikoner, bentonitter, kiselsyre, talkum og sinkoksid, eller blandinger av disse.

[0143] Pulvere og sprayer kan inneholde, i tillegg til en angjeldende forbindelse, eksipienser slik som laktose, talkum, kiselsyre, aluminiumhydroksid, kalsiumsilikater, og polyamidpulver, eller blandinger av disse stoffene. Sprayer kan i tillegg inneholde vanlige drivmidler, slik som klorfluorhydrokarboner og flyktige usubstituerte hydrokarboner, slik som butan og propan.

[0144] I visse utførelsesformer kan farmasøytiske sammensetninger som er egnet for parenteral tilførsel omfatte ett eller flere ActRIIB-polyeptider i kombinasjon med én eller flere farmasøytisk akseptable, sterile, isotone, vandige eller ikke-vandige 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 ikke-vandige bærestoffer som kan benyttes i de farmasøytiske sammensetningene ifølge oppfinnelsen omfatter vann, etanol, polyoler (f.eks. glyserol, propylenglykol, polyetylenglykol og lignende), og egnede blandinger av disse, vegetabiliske oljer, slik som olivenolje, og injiserbare organiske estere, f.eks. etyloleat. Korrekt fluiditet kan f.eks. opprettholdes ved anvendelse av belegningsmaterialer, slik som lecitin, ved opprettholdelse av den nødvendige partikkelstørrelsen når det gjelder dispersjoner og ved anvendelse av surfaktanter.

[0145] Sammensetningene ifølge oppfinnelsen kan også inneholde adjuvaner, slik som konserveringsmidler, fuktemidler, emulgeringsmidler og dispergeringsmidler.

Forebyggelse av virkningen av mikroorganismer kan sikres ved å inkludere forskjellige antibakterielle og antifungale midler, f.eks. paraben, klorbutanol, fenolsorbinsyre og lignende. Det kan også være ønskelig å inkludere isotonisitetmidler, slik som sukkere, natriumklorid og lignende, i sammensetningene. I tillegg kan forlenget absorpsjon av den injiserbare farmasøytiske formen oppnås ved å innbefatte midler som forsinker absorpsjonen, f.eks. aluminiummonostearat og gelatin.

[0146] Det skal forstås at doseringsordningen vil fastsettes av den behandlende legen,

idet forskjellige faktorer som modifierer virkningen av de angjeldende forbindelsene ifølge oppfinnelsen (f.eks. ActRIIB-polypeptider) tas i betraktning. De forskjellige faktorene er avhengige av sykdommen som skal behandles. Ved muskelforstyrrelser kan faktorer omfatte, men de er ikke begrenset til, ønsket mengde muskelmasse som skal dannes, musklene som er mest påvirket av sykdommen, tilstanden til den nedbrutte muskelen, pasientens alder, kjønn og diett, administrasjonstidspunkt og andre kliniske faktorer. Tilsetning av andre kjente vekstfaktorer til den endelige sammensetningen, kan også påvirke doseringen. Utviklingen kan overvåkes ved periodisk vurdering av muskelvekst og/eller -reparasjon, f.eks. ved stryketester, MRI-vurdering av muskelstørrelsen og analyse av muskelbiopsier.

[0147] Ett eller flere ActRIIB-polypeptider kan administreres sammen (samtidig) eller på ulike tidspunkt (sekvensielt eller overlappende). I tillegg kan ActRIIB-polypeptidene administreres med en annen type terapeutisk middel, f.eks. et bruskinduserende middel, et beninduserende middel, et muskelinduserende middel, et fettreduserende middel eller et nevronreduserende middel. De to typene forbindelser kan administreres samtidig eller på ulike tidspunkt. Det er forventet at ActRIIB-polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan virke i samspill med eller kanskje synergistisk med et annet terapeutisk middel.

[0148] I et spesifikt eksempel beskrives en rekke osteogene, bruskinduserende og beninduserende faktorer, spesielt bisfosfonater. Se f.eks. europeiske patentsøknadsnr. 148 155 og 169 016. F.eks. inkluderer andre faktorer som kan kombineres med de angjeldende ActRIIB-polypeptidene ulike vekstfaktorer slik som epidermal vekstfaktor (EGF), blodplateavledet vekstfaktor (PDGF), transformerende vekstfaktorer (TGF- α og TGF- β) og insulinlignende vekstfaktor (IGF).

[0149] Genterapi for in vivo-produksjon av ActRIIB-polypeptider er også beskrevet. Slik behandling vil nå sin terapeutiske virkning ved innføring av ActRIIB-polynukleotidsekvensene i celler eller vev som har de forstyrrelsene som er opplistet ovenfor. Tilførsel av ActRIIB-polynukleotidsekvensene kan oppnås ved anvendelse av en rekombinant ekspresjonsvektor, f.eks. et kimært virus eller et kolloidalt dispersjonssystem. Foretrukket for terapeutisk tilførsel av ActRIIB-polynukleotidsekvenser er anvendelse av målstyrte liposomer.

[0150] Forskjellige virusvektorer som kan benyttes for genterapi som beskrevet heri omfatter adenovirus, herpesvirus, vaccinia eller, fortrinnsvis, et RNA-virus, f.eks. et retrovirus. Retrovirusvektoren er fortrinnsvis et derivat av et museretrovirus eller fugleretrovirus. Eksempler på retrovirusvektorer hvor et enkelt fremmed gen kan innsettes omfatter, men er ikke begrenset til: Moloney murint leukemivirus (MoMuLV), Harvey murint sarkomvirus (HaMuSV), murint brysttumovirus (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. Målstyring oppnås fortrinnsvis ved anvendelse av et antistoff. Fagfolk vil innse at spesifikke polynukleotidsekvenser kan innsettes i det retrovirale genomet eller festes til en viruskapsel for å tillate målspesifikk levering av den retrovirale vektoren som inneholder ActRIIB-polynukleotidet. Vektoren kan styres til ben eller brusk, muskel eller nevronceller/-vev.

[0151] Eventuelt kan vevskulturceller transfekteres direkte med plasmider som koder for de retrovirale strukturelle genene gag, pol og env ved konvensjonell

kalsiumfosfattransfeksjon. Disse cellene transfekteres så med vektorplasmidet som inneholder genene av interesse. De resulterende cellene frigjør retrovirusvektoren til dyrkningsmediet.

[0152] Et annet målstyringssystem for ActRIIB-polynukleotider er et kolloidalt 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 kan være et liposom. Liposomer er kunstige membranvesikler som anvendes som tilførselsvehikler in vitro og in vivo. RNA, DNA og intakte virioner kan innkapsles i det vandige indre og tilføres til celler i en biologisk aktiv form (se f.eks. Fraley, mfl., Trends Biochem. Sci., 6:17, 1981). Fremgangsmåter for effektiv genoverføring ved anvendelse av en liposomvehikkel er velkjente innen faget, se f.eks. Mannino, mfl., Biotechniques, 6:682, 1988. Sammensetningen av liposomet er vanligvis en kombinasjon av fosfolipider, vanligvis i kombinasjon med steroider, fortrinnsvis kolesterol. Andre fosfolipider eller andre lipider kan også anvendes. De fysiske egenskapene til liposomer er avhengige av pH, ionestyrke, og nærvær av divalente kationer.

[0153] Eksempler på lipider som er anvendbare for fremstilling av liposomer omfatter fosfatidylforbindelser, for eksempel fosfatidylglyserol, fosfatidylkolin, fosfatidylserin, fosfatidyletanolamin, sfingolipider, cerebrosider og gangliosider. Eksempler på fosfolipider omfatter fosfatidylkolin fra egg, dipalmitoylfosfatidylkolin og distearoylfosfatidylkolin. Målstyring av liposomer er også mulig, basert på f.eks. organspesifisitet, cellespesifisitet og organellespesifisitet, og er kjent innen faget.

EKSEMPLER

[0154] Siden oppfinnelsen nå er generelt beskrevet, vil den lettere forstås ved henvisning til følgende eksempler, som er inkludert kun for illustrasjonsformål av visse utførelsesformer av den foreliggende oppfinnelsen, og ikke er ment å begrense oppfinnelsen.

Eksempel 1. Generering av et ActRIIb-Fc-fusjonsprotein.

[0155] Søkerne konstruerte et løselig ActRIIB-fusjonsprotein som har det ekstracellulære domenet fra humant ActRIIB fusjonert til et humant eller murint Fc-domene med en minimal linker (tre glysinaminosyrer) mellom disse. Konstruksjonene betegnes henholdsvis ActRIIb-hFc og ActRIIb-mFc.

[0156] ActRIIb-hFc vises nedenfor som det ble rensset fra CHO-cellelinjer (SEKV ID NR: 5)

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGC
WLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTG
GGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0157] ActRIIb-hFc- og ActRIIb-mFc-proteinet ble uttrykt i CHO-cellelinjer. Tre ulike ledersekvenser ble tatt i betraktning:

(i) Mellitin fra honningbie (HBML): MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEKV ID NR:7)

(ii) Vevsplasminogenaktivator (TPA): MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEKV ID NR: 8)

(iii) Nativ: MGAAAKLAFVFLISCSSGA (SEKV ID NR: 9).

[0158] Den valgte formen benytter TPA-ledersekvensen og har følgende uprosesserte aminosyresekvens:

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEG
EQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNF
CNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0159] Dette polypeptidet kodes av følgende nukleinsyresekvens (SEKV ID NR:10):

A TGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA GTCTTCGTTT
 CGCCCGGCGC CTCTGGGCGT GGGGAGGCTG AGACACGGGA GTGCATCTAC TACAACGCCA
 ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACCAGAGCG GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA
 AGCGGCTGCA CTGCTACGCC TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA
 AGGGCTGTG GCTAGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG
 AGAACCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG CGCTTCACTC
 ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC ACCCCGACA GCCCCACCG
 GTGGTGGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG
 TCTTCCTCTT CCCCCAAA CCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
 CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG
 ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT
 ACCGTGTGGT CAGCGTCTC ACCGTCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
 AGTGCAAGGT CTCCAACAA GCCCTCCAG TCCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA
 AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCC ATCCCGGAG GAGATGACCA
 AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCAGCGAC ATCGCCGTGG
 AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT
 CCGACGGCTC CTTCTTCTC TATAGCAAGC TCACCGTGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
 GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA
 GCCTCTCCCT GTCTCCGGT AAATGA

5 **[0160]** N-terminal sekvensering av materialet produsert av CHO-cellen viste en hovedsekvens av -GRGEAE (SEKV ID NR: 11). Bemerkelsesverdig nok begynner andre konstruksjoner som er rapportert i litteraturen med en -SGR...-sekvens.

[0161] Rensing kunne oppnås ved en serie av kolonnekromatografitrinn, for eksempel innbefattende tre eller flere av følgende i hvilken som helst rekkefølge: protein A-
 10 kromatografi, Q sepharose-kromatografi, fenylsepharosekromatografi, størrelseseksklusjonskromatografi og kationbytterkromatografi. Rensingen kunne fullføres med virusfiltrering og bufferutbytning.

[0162] ActRIIb-Fc-fusjonsproteiner ble også uttrykt i HEK293-celler og COS-celler. Selv om materiale fra alle cellelinjene og rimelige dyrkningsbetingelser resulterte i
 15 protein med muskelbyggende aktivitet in vivo, ble det observert variasjon i potensen, muligens relatert til valg av cellelinje og/eller dyrkningsbetingelser.

Eksempel 2: Generering av ActRIIb-Fc-mutanter

20 SGRGAEATRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYAŠWRNSSGTIELVKKG net til
 CWLDDFNCYDRQECVATEENPVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT mellom
GGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY r
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPKEKI
SKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
 25 PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0164] Flere mutasjoner, inkludert avkortinger i N- og C-enden, ble introdusert i ActRIIB-Fc-bakgrunnsproteinet. På grunnlag av dataene som ble presentert i eksempel 1, er det forventet at disse konstruksjonene hvis de uttrykkes med en TPA-leader, vil
 30 mangle serin i N-enden. Mutasjoner ble generert i det ekstracellulære ActRIIB-domenet ved PCR-mutagenese. Etter PCR ble fragmentene rensset gjennom en Qiagen-

kolonne, spaltet med SfoI og AgeI, og gelrenset. Disse fragmentene ble ligert inn i ekspresjonsvektor pAID4 (se WO2006/012627) slik at det ved ligering skapte et fusjonsprotein med humant IgG1. Ved transformering til E. coli DH5 alpha, ble kolonier utvalgt og DNA-molekyler isolert. For murine konstruksjoner (mFc), ble

5 murint IgG2a erstattet med humant IgG1. Alle mutantene ble sekvensverifisert. **[0165]** Alle mutantene ble produsert i HEK293T-celler ved transient transfeksjon. For å oppsummere ble HEK293T-celler oppsatt med 6×10^5 celler/ml i 250 ml volum Freestyle-medium (Invitrogen) i en 500 ml spinner og dyrket over natten. Neste dag ble disse cellene behandlet med DNA:PEI-kompleks (1:1) med 0,5 µg/ml endelig DNA-

10 konsentrasjon. Etter 4 timer ble 250 ml medium tilsatt og cellene ble dyrket i 7 dager. Kondisjonert medium ble høstet ved å spinne ned cellene og konsentrere dem. **[0166]** Mutantene ble rensset ved anvendelse av en rekke teknikker, inkludert f.eks. protein A-kolonne og eluert med en glysinbuffer med lav pH (3,0). Etter nøytralisering ble disse dialysert mot PBS.

15 **[0167]** Mutanter ble også fremstilt i CHO-celler med tilsvarende metodikk.

[0168] Mutanter ble analysert i bindingsanalyser og/eller bioanalyser som beskrives under. I noen tilfeller ble analysene utført med kondisjonert medium istedenfor rensede proteiner.

20 **Eksempel 3. Bioanalyse av GDF11- og aktivinformidlet signalisering.**

[0169] En A-204 rapportørgenanalyse ble anvendt for å evaluere virkningene av ActRIIB-Fc-proteiner på signalisering via GDF11 og aktivin A. Cellelinje: Humant rabdomyosarkom (avledet fra muskel). Rapportørvektor: pGL3(CAGA)12 (beskrevet i

25 Dennler mfl., 1998, EMBO 17: 3091-3100.) Se figur 5. 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.

[0170] Dag 1: A-204-celler overføres til en 48-brønners plate.

[0171] Dag 2: A-204-celler transfekteres med 10 µg pGL3(CAGA)12 eller

30 pGL3(CAGA)12(10 µg)+ pRLCMV (1 µg) og Fugene.

[0172] 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 cellene med PBS og lyseres.

[0173] Dette følges av en luciferaseanalyse. I fravær av inhibitorer viste aktivin A 10

35 gangers stimulering av rapportørgenekspressjonen og en ED50 ~ 2 ng/ml. GDF11: 16 gangers stimulering, ED50: ~ 1,5 ng/ml.

[0174] ActRIIB(R64, 20-134) er en potent inhibitor av aktivin-, GDF8- og GDF11-aktiviteten i denne analysen. Varianter ble også analysert i denne analysen.

Eksempel 4. GDF11-hemming av N-terminale og C-terminale avkortinger

[0175] Avkortinger ved N-enden og C-enden av ActRIIB-delen ActRIIB-Fc (R64, 20-134) ble generert og analysert for aktivitet som inhibitorer av GDF11 og aktivin.

5 Aktivitetene vises nedenfor (som målt i kondisjonert medium):

C-ende ActRIIb-hFc-avkortinger:

[0176]

	IC50 (ng/mL)	
	GDF11	Aktivin
ActRIIb-hFc (R64, 20-134)	45	22
ActRIIb-hFc (R64, 20-132)	87	32
ActRIIb-hFc (R64, 20-131)	120	44
ActRIIb-hFc (R64, 20-128)	130	158

10

[0177] Som det fremgår forårsaker avkortinger av tre (ender med ...PPT), seks (ender med ...YEP) eller flere aminosyrer ved C-enden en tre gangers eller større reduksjon i aktiviteten til molekylet. Avkorting av de siste 15 aminosyrene i ActRIIB-delen forårsaker et større aktivitetstap (se WO2006/012627).

15 **[0178]** Aminoternale avkortinger ble utført i bakgrunnen av et ActRIIb-hFc (R64 20-131)-protein. Aktivitetene vises nedenfor (som målt i kondisjonert medium):

N-ende ActRIIb-hFc-avkortinger:

20 **[0179]**

	IC50 (ng/mL)	
	GDF11	Aktivin
ActRIIb-hFc (R64, 20-131) (GRG...)	183	201
ActRIIb-hFc (R64, 21-131) (RGE...)	121	325
ActRIIb-hFc (R64, 22-131) (GEA...)	71	100
ActRIIb-hFc (R64, 23-131) (EAE...)	60	143
ActRIIb-hFc (R64, 24-131) (AET...)	69	105

[0180] Følgelig fører avkortinger av to, tre eller fire aminosyrer fra N-enden til

produksjon av et mer aktivt protein enn versjonene med et ekstracellulært fullengdedomene. Ytterligere eksperimenter viser at ved avkorting av fem aminosyrer har ActRIIb-hFc (R64, 25-131) en aktivitet som er tilsvarende den uavkortede formen, og ytterligere delesjoner ved N-enden vil fortsette å bryte ned aktiviteten til proteinet. Derfor vil optimale konstruksjoner ha en C-ende som slutter mellom aminosyre 133-134 ifølge SEKV ID NR:4 og en N-ende som begynner ved aminosyre 22-24 ifølge SEKV ID NR:4. En N-ende som tilsvarer aminosyre 21 eller 25 vil gi en aktivitet som er lignende ActRIIb-hFc (R64, 20-134)-konstruksjonen.

Eksempel 5. ActRIIb-Fc-varianter, cellebasert aktivitet.

[0181] Aktiviteten til ActRIIB-Fc-proteiner ble analysert i en cellebasert analyse, som beskrevet overfor. Resultatene oppsummeres i tabell 1 under. Noen varianter ble analysert i ulike C-ende-avkortingskonstruksjoner. Som beskrevet overfor, forårsaket avkorting av fem eller 15 aminosyrer redusert aktivitet. Bemerkelsesverdig nok viste L79D- og L79E-variantene betydelig tap av aktivinbinding, mens nesten all villtypehemming av GDF11 ble opprettholdt.

Løselig ActRIIB-Fc-binding til GDF11 og aktivin A:

[0182]

ActRIIB-Fc-variasjoner	Del av ActRIIB (tilsvarer aminosyrer ifølge SEKV ID NR:4)	GDF11-hemmingsaktivitet	Aktivinhemmingsaktivitet
64R	20-134	+++ (ca. 10^{-8} M K_I)	+++ (ca. 10^{-8} M K_I)
64A	20-134	+ (ca. 10^{-6} M K_I)	+ (ca. 10^{-6} M K_I)
64R	20-129	+++	+++
64R K74A	20-134	++++	++++
64R A24N	20-134	+++	+++
64R A24N	20-119	++	++
64R A24N K74A	20-119	+	+
R64 L79P	20-134	+	+
R64 L79P K74A	20-134	+	+

ActRIIB-Fc-variasjoner	Del av ActRIIB (tilsvarer aminosyrer ifølge SEKV ID NR:4)	GDF11-hemmingsaktivitet	Aktivinhemmingsaktivitet
R64 L79D	20-134	+++	+
R64 L79E	20-134	+++	+
R64K	20-134	+++	+++
R64K	20-129	+++	+++
R64 P129S P130A	20-134	+++	+++
R64N	20-134	+	+
+ Dårlig aktivitet (omtrent 1×10^{-6} K _I) ++ Moderat aktivitet (omtrent 1×10^{-7} K _I) +++ God (villtype) aktivitet (omtrent 1×10^{-8} K _I) ++++ Større enn villtypeaktivitet			

[0183] Flere varianter er blitt vurdert for serumhalveringstid i rotter. ActRIIB(R64 20-134)-Fc har en serumhalveringstid på tilnærmet 70 timer. ActRIIB(R64 A24N 20-134)-Fc har en serumhalveringstid på tilnærmet 100-150 timer. A24N-varianten har aktivitet i den cellebaserte analysen (over) og in vivo-analyser (under) som er tilsvarende villtypemolekylet. Sammen med lengre halveringstid, betyr dette at over tid vil en A24N-variant gi større virkning per enhet protein enn villtypemolekylet.

[0184] Introduksjonen av sure aminosyrer (asparaginsyre eller glutaminsyre) i posisjon 79 reduserte bemerkelsesverdig aktivbinningen selektivt, og beholdt samtidig GDF11/GDF8-bindingen. Som omtalt nedenfor, synes villtype-ActRIIB-Fc-proteiner å ha virkning på andre vev enn muskelvevet, og noen av dem kan være uønskede. Som beskrevet heri forventes det at disse virkningene relaterer til de ulike ligandene som bindes og inhiberes av ActRIIB-Fc, kanskje også inkludert aktivin. Innledende data indikerer at L79E- og L79D-varianter i mus har reduserte virkninger på andre vev enn muskelvev, mens virkningene på muskel opprettholdes. Selv om varianter av denne type kan betraktes som varianter av ActRIIB, bør det legges merke til at disse proteinene ikke lenger virkelig fungerer som aktivinreseptorer. Dermed er begrepet "ActRIIB" bare egnet som en indikator for avledningen fra disse polypeptidene. Selv om sure rester ved posisjon 79 reduserer aktivbinningen samtidig som GDF11-binding beholdes, har ikke andre endringer på denne posisjonen denne effekten. En L79A-endring øker aktivbinningen i forhold til GDF11-bindingen. En L79P-endring reduserer både aktivin- og GDF11-bindingen.

Eksempel 6. GDF11- og aktivin A-binding.

[0185] Binding av visse ActRIIB-Fc-proteiner til ligander ble analysert i en BiaCore™-analyse.

- 5 **[0186]** ActRIIB-Fc-variantene eller villtypeproteinene ble innfanget til systemet ved bruk av et anti-hFc-antistoff. Ligander ble injisert og strømmet over de innfangede reseptorproteinene. Resultatene oppsummeres i tabellene under.

Ligandbindende spesifisitet-IIB-varianter.

10

[0187]

	GDF11		
Protein	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB-hFc (R64 20-134)	1,34e-6	1,13e-4	8,42e-11
ActRIIB-hFc (R64, A24N 20-134)	1,21e-6	6,35e-5	5,19e-11
ActRIIB-hFc (R64, L79D 20-134)	6,7e-5	4,39e-4	6,55e-10
ActRIIB-hFc (R64, L79E 20-134)	3,8e-5	2,74e-4	7,16e-10
ActRIIB-hFc (R64K 20-134)	6,77e-5	2,41e-5	3,56e-11
	GDF8		
Protein	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB-hFc (R64 20-134)	3,69e-5	3,45e-5	9,35e-11
ActRIIB-hFc (R64, A24N 20-134)			
ActRIIB-hFc (R64, L79D 20-134)	3,85e-5	8,3e-4	2,15e-9
ActRIIB-hFc (R64, L79E 20-134)	3,74e-5	9e-4	2,41e-9
ActRIIB-hFc (R64K 20-134)	2,25e-5	4,71e-5	2,1e-10
ActRIIB-hFc (R64K 20-129)	9,74e-4	2,09e-4	2,15e-9
ActRIIB-hFc (R64, P129S, P130R 20-134)	1,08e-5	1,8e-4	1,67e-9
ActRIIB-hFc (R64, K74A 20-134)	2,8e-5	2,03e-5	7,18e-11
	Aktivin A		
Protein	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)

	GDF11		
Protein	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
ActRIIB-hFc (R64 20-134)	5,94e6	1,59e-4	2,68e-11
ActRIIB-hFc (R64, A24N 20-134)	3,34e6	3,46e-4	1,04e-10
ActRIIB-hFc (R64, L79D 20-134)			Lav binding
ActRIIB-hFc (R64, L79E 20-134)			Lav binding
ActRIIB-hFc (R64K 20-134)	6,82e6	3,25e-4	4,76e-11
ActRIIB-hFc (R64K 20-129)	7,46e6	6,28e-4	8,41e-11
ActRIIB-hFc (R64, P129S, P130R 20-134)	5,02e6	4,17e-4	8,31e-11

[0188] Disse dataene bekrefter cellebaserte analysedata, som viser at A24N-varianten opprettholder ligandbindende aktivitet som er lignende aktiviteten til ActRIIB-hFc (R64 20-134)-molekylet, og at L79D- eller L79E-molekylet opprettholder myostatin- og GDF11-bindingen, men viser markert redusert (ikke-kvantifiserbar) binding til aktivin A.

[0189] Andre varianter er fremstilt og analysert, som rapportert i WO2006/012627, ved å bruke ligander koblet til anordningen og strømme reseptor over de koblete ligandene. En tabell over dataene i forhold til disse variantene er gjengitt under:

Løselig ActRIIB-Fc-variantbinding til GDF11 og aktivin A (BiaCore-analyse)

[0190]

ActRIIB	ActA	GDF11
WT (64A)	KD=1,8e-7M (+)	KD= 2,6e-7M (+)
WT (64R)	Ikke tilgjengelig	KD= 8,6e-8M (+++)
+15hale	KD ~2,6e-8M (+++)	KD= 1,9e-8M (++++)
E37A	*	*
R40A	-	-
D54A	-	*
K55A	++	*
R56A	*	*
K74A	KD=4,35e-9 M +++++	KD=5,3e-9M +++++

ActRIIB	ActA	GDF11
K74Y	*	-
K74F	*	-
K74I	*	--
W78A	*	*
L79A	+	*
D80K	*	*
D80R	*	*
D80A	*	*
D80F	*	*
D80G	*	*
D80M	*	*
D80N	*	*
D80I	*	-
F82A	++	-
* Ikke observert binding -- < 1/5 WT-binding - ~ 1/2 WT-binding + WT ++ < 2x økt binding +++ ~5x økt binding ++++ ~10x økt binding +++++ ~ 40x økt binding		

Eksempel 7: Effekten av ActRIIB-Fc-proteiner på muskelmasse i villtypemus.

[0191] Søkerne fastslo evnen til ActRIIB-Fc-proteinet til å øke muskelmassen i villtypemus.

[0192] C57B110-mus fikk tilført en dose (10 mg/kg; intraperitonealt (ip.)) to ganger i uken med enten humant ActRIIB (R64 20-134)-protein eller humant ActRIIB (K74A 20-134). Musene ble NMR-skannet på dag 0 og dag 28 for å bestemme prosentvis endring av masse magert vev i hele kroppen. Mus behandlet med humant ActRIIB (R64 20-134)-Fc utviste en vesentlig økning på 31,1 % i magert vev i forhold til vehikkelkontrollgruppen. Mus behandlet med humant ActRIIB (K74A 20-134)-Fc-

protein utviste en vesentlig økning i masse magert vev i forhold til kontrollgruppen, om enn i mindre grad enn gruppen behandlet med humant ActRIIB (R64 20-134). I en lignende studie ble mus behandlet to ganger i uken med PBS, 1 mg/kg, 3 mg/kg eller 10 mg/kg murint ActRIIB (WT, 20-134)-Fc, intraperitonealt. På slutten av studien ble femoris-, gastrocnemius-, pectoralis- og diafragma-musklene dissekert og veid. Resultatene oppsummeres i tabell 3 under.

Tabell 3: Vekt av vev fra villtypemus behandlet med vehikkel og murint ActRIIB (WT, 20-134)-Fc.

Vehikkelbehandlet	Gastrocnemius (V+H)	Femoris (V+H)	Pectoralis (V+H)	Diafragma
Gj.snitt (gram) ± std.avvik	0,306 ± 0,020	0,187 ± 0,040	0,257 ± 0,020	0,076 ± 0,020
muActRIIB (WT, 20-134)-Fc (10 mg/kg)	Gastrocnemius (V+H)	Femoris (V+H)	Pectoralis (V+H)	Diafragma
Gj.snitt (gram) ± std.avvik	0,387 ± 0,010	0,241 ± 0,014	0,360 ± 0,070	0,124 ± 0,040
Ttest p-verdi	0,0001	0,009	0,02	0,04

[0193] Som vist i tabell 3, øker det murine ActRIIB (WT, 20-134)-Fc-fusjonsproteinet muskelmassen i villtypemus vesentlig. I mus behandlet med murint ActRIIB (WT, 20-134)-Fc økte gastrocnemius-muskler med 26,5 %, femoris-muskler økte 28,9 % og pectoralis-muskler økte med 40,0 %. Vi kunne også observere endringer i diafragma-muskelen som økte med 63 % i forhold til kontrollmus behandlet med vehikkel.

Reduksjonen av diafragma-muskelen er en vanlig komplikasjon ved en rekke muskeldystrofier. Derfor kan økningen i diafragma-vekten observert etter behandling med murint ActRIIB (WT, 20-134)-Fc ha klinisk betydning.

Eksempel 8: Effekten av lang halveringstid for ActRIIB-Fc-proteiner på muskelmasse i villtypemus.

[0194] Søkerne fastslo evnen til ActRIIB-mFc (R64, A24N 20-134)-proteinvarianten med lang halveringstid til å øke muskelmassen i villtypemus.

[0195] C57B110-mus fikk tilført en dose (10 mg/kg; intraperitonealt (ip.)) to ganger i uken med enten humant ActRIIB-mFc (R64 20-134)-protein eller humant ActRIIB-mFc (R64, A24N 20-134). Musene ble NMR-skannet på ulike punkter inntil dag 25 for å bestemme prosentvis endring av masse magert vev i hele kroppen. Begge molekylene forårsaket ekvivalent økning i total kroppsvekt og muskelmasse, og virkningen på gastrocnemius-, femoris- og pektoral-musklene varierte fra 40-70 % økning. Se figur 5

og 6.

[0196] Disse dataene viser at formen med økt halveringstid av molekylet fremmer muskelvekst i en korttidsstudie med en tilsvarende effekt som villtypemolekylet.

5 **Eksempel 9: Effekten av ActRIIB-Fc-proteiner med redusert aktivinbinding på muskelmasse i villtypemus.**

[0197] Søkerne fastslo evnen til ActRIIB-mFc (R64, L79D 20-134)-proteinvarianten med lang halveringstid til å øke muskelmassen i villtypemus.

10 **[0198]** C57B110-mus fikk tilført en dose (10 mg/kg; intraperitonealt (ip.)) to ganger i uken med enten humant ActRIIB-mFc (R64 20-134)-protein eller humant ActRIIB-mFc (R64, L79D 20-134). Musene ble NMR-skannet på ulike punkter inntil dag 24 for å bestemme prosentvis endring av masse magert vev i hele kroppen. Dataene vises i tabellen under.

15

	Kroppsvekt dag 0 (g)	Kroppsvekt dag 24 (g)	Gastroc. (V+H)	Femoris (V+H)	Pect. (V+H)
Mod. TBS (w/v)	24,4 ± 1,51	26,8 ± 1,43	0,29 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,24 ± 0,05
R64, 20-134 (10 mg/kg)	25,0 ± 1,36	31,2* ± 1,53	0,40* ± 0,02	0,24* ± 0,02	0,37* ± 0,07
R64, L79D, 20-134 (10 mg/kg)	25,3 ± 1,22	28,1 ± 1,64	0,32* ± 0,02	0,20* ± 0,02	0,27 ± 0,05
					* p < 0,05

[0199] Disse dataene viser at L79D-varianten (redusert aktivin A-binding) av ActRIIB er aktiv in vivo for å fremme muskelvekst, men mengden muskelvekst er mindre enn
 20 for villtype-ActRIIB. Denne reduserte virkningen kan være forårsaket delvis av en mindre reduksjon i myostatinbindingen, eller av tap av binding til en ytterligere, fremdeles ukjent negativ regulator av muskelvekst. Evnen til å stimulere muskelvekst uten å påvirke aktivin A-signaliseringen er svært ønskelig fordi aktivin er et bredt uttrykt regulerende molekyl som er kjent for å ha virkning på reproduksjonssystemet,
 25 ben, lever og mange andre vevstyper. I mus påvirker ActRIIB-mFc (R64 20-134) reproduksjonssystemet vesentlig, og forårsaker en økning i miltstørrelsen i enkelte tilfeller. ActRIIB-mFc (R64, L79D 20-134)-molekylet hadde kraftig svekket virkning på både reproduktive vev og milten, noe som indikerer at dette molekylet vil være

særlig egnet for å fremme muskelvekst hos pasienter som er fruktbare eller har et ønske om å minimalisere påvirkningen av reproduksjonssystemet.

Eksempel 10: Effekten av ActRIIB-Fc-proteiner på muskelmasse og styrke i *Mdx*-mus.

[0200] For å fastslå evnen til murint ActRIIB (WT, 20-134)-Fc-protein til å øke muskelmassen i en sykdomstilstand fastslo søkerne evnen til ActRIIB-Fc-proteinet til å øke muskelmassen i *mdx*-musmodellen av muskeldystrofi.

[0201] Voksne *Mdx*-mus ble behandlet to ganger i uken med det murine ActRIIB (WT, 20-134)-Fc-proteinet (1, 3 eller 10 mg/kg, intraperitonealt) eller en PBS-vehikkelkontroll. Kraften som en mus utøver når den trekker en krafttransduser måles for å bestemme forbenas gripestyrke. Den gjennomsnittlige kraften fra 5 trekkstudier ble brukt for å sammenligne gripestyrken mellom gruppene. På slutten av studien ble femoris-, gastrocnemius-, pectoralis- og diafragma-musklene dissekert og veid. Gripestyrkemålingene viste også en vesentlig økning. Muskelmasseresultatene oppsummeres i tabellen under.

Vevsvekt fra *mdx*-mus behandlet med murint ActRIIB (WT, 20-134)-Fc

[0202]

Vehikkelbehandlet	Gastrocnemius (V+H)	Femoris (V+H)	Pectoralis (V+H)	Diafragma
Gj.snitt (gram) ± std.av.	0,413 ± 0,040	0,296 ± 0,019	0,437 ± 0,060	0,111 ± 0,030
muActRIIB (WT, 20-134)-Fc (10 mg/kg)	Gastrocnemius (V+H)	Femoris (V+H)	Pectoralis (V+H)	Diafragma
Gj.snitt (gram) ± std.av.	0,52 ± 0,050	0,39 ± 0,05	0,807 ± 0,21	0,149 ± 0,020
Ttest p-verdi	0,0006	0,0006	0,002	0,05

[0203] Som det vises i tabellen utviste gruppene behandlet med murint ActRIIB (WT, 20-134)-Fc økt masse magert vev i *mdx*-musene sammenlignet med mus behandlet med PBS. ActRIIB-Fc-behandlingen økte størrelsen på gastrocnemius-musklene med 25,9 %, femoris-musklene med 31,8 % og pectoralis-musklene med 85,4 % sammenlignet med vehikkelkontrollgruppen. Vi fant også at diafragma-vekten på mus behandlet med murint ActRIIB (WT, 20-134)-Fc økte med 34,2 % sammenlignet med kontrollgruppen, som kan være av klinisk betydning. Disse dataene viser virkningen av

ActRIIB-Fc-proteinet i en sykdomstilstand med muskeldystrofi.

[0204] I tillegg utviser mdx-mus behandlet med ActRIIB-Fc-proteinet økt gripestyrke i forhold til den vehikkelbehandlede kontrollen. Etter 16 uker viste gruppene med 1, 3 og 10 mg/kg ActRIIB henholdsvis en 31,4 %, 32,3 % og 64,4 % økning i gripestyrke, sammenlignet med vehikkelkontrollgruppen. Den forbedrede gripestyrkeytelsen til gruppene behandlet med murint ActRIIB (WT, 20-134)-Fc støtter ideen om at den økte muskelen som finnes i behandlingsgruppene er fysiologisk relevant. *Mdx*-mus er utsatt for kontraktilindusert skade og gjennomgår betydelig flere sykluser av degenerasjon og regenerasjon enn sine villtypemotparter. Til tross for disse muskelfenotypene, øker behandling med murint ActRIIB (WT, 20-134)-Fc gripestyrken i *mdx*-mus.

[0205] I Duchennes muskeldystrofi inntreffer sykdommen tidlig i barndommen, ofte så tidlig som i femårsalderen. Følgelig reflekterer ikke dataene som presenteres ovenfor med hensyn til voksen mus nødvendigvis de effektene et ActRIIB-molekyl vil ha på barn med DMD. For å løse dette ble en studie gjennomført med juvenile *mdx*-mus.

[0206] ActRIIB-mFc (R64, 20-134)-behandling økte vesentlig kroppsvekten i juvenile (fire uker gamle) C57BL10- og mdx-mus. Analyse av kroppssammensetningen ved bruk av in vivo-NMR-spektroskopi avslørte økt masse magert vev ledsaget av høyere kroppsvekt. ActRIIB-mFc (R64, 20-134)-behandlede C57BL/10-mus økte 35,2 % masse magert vev og den behandlede mdx-gruppen økte 48,3 % mer masse magert vev enn de respektive kontrollgruppene. Videre ble effekten av ActRIIB-mFc (R64, 20-134)-behandlingen på styrken analysert. Scorene for gripestyrken til vehikkelbehandlede mdx-mus var 15,7 % lavere enn C57BL/10-vehikkelgruppen, og dermed illustreres muskelsvakheten forbundet med dystrofinmangel. Derimot forbedret mdx-mus behandlet med ActRIIB-mFc (R64, 20-134) gripestyrken i forhold til mdx-vehikkelgruppen, og oppnådde gripestyrkemålinger som overgikk C57BL/10-vehikkelmus og nådde nivået av gripestyrkescorene til behandlede C57BL/10-mus (vehikkel mdx: $0,140 \pm 0,01$ KgF; behandlet mdx: $0,199 \pm 0,02$ KgF; vehikkel C57BL/10: $0,166 \pm 0,03$; $0,205 \pm 0,02$ KgF). Bemerkelsesverdig restaurerte behandlingen de juvenile mdx-musene tilbake til villtypenivåene for gripestyrke. Derfor er det sannsynlig at ActRIIB-mFc (R64, 20-134)-molekylet har viktig klinisk anvendelse i Duchennes muskeldystrofi, særlig hos unge pasienter i en alder nær utbruddet av sykdommen.

Eksempel 11: Effekten av ActRIIB-Fc-proteiner på styrke og overlevelse i SOD1-mus

[0207] For å fastslå evnen til ActRIIB-polypeptider til å øke styrken og overlevelsen i en musemodell med ALS analyserte søkerne ActRIIB-Fc-proteinet i SOD1-musen.

[0208] B6.Cg-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J-mus, eller SOD1-mus, bærer høye kopitall av

det mutante allelet av det humane superoksid-dismutase-transgenet. Høye nivåer av dette proteinet formidler en fenotype til mus som er sammenlignbar med den humane sykdommen ALS. SOD1-mus utvikler stigende lammelser og viser tidlige tegn på sykdommen etter 91 dager. Sykdommen resulterer i at prematur død inntreffer mellom

19-23 ukers alder.

[0209] SOD1-mus fikk en dose vehikkelkontroll eller ActRIIB-mFc (K74A 20-134) (ip., 5 mg/kg, to ganger i uken) fra 10-ukers alderen. Kraften som en mus utøver når den trekker en krafttransduser er et mål på forbenas gripestyrke. Den gjennomsnittlige kraften fra 5 trekkstudier ble brukt for å sammenligne gripestyrken mellom gruppene.

Overlevelsen ble kalkulert som antall dager fra musen ble født og til datoen musen var ute av stand til å rette seg i løpet av 30 sekunder etter å ha blitt plassert på sin side.

Figur 7 viser gripestyrkemålingene og figur 8 illustrerer overlevelsesdataene.

[0210] Mus i sluttstadiet av sykdommen har problemer med pleie, antageligvis på grunn av utviklingen av lammelse, og synes uflidd. Overfladisk observasjon av musene viste at gruppen behandlet med murint ActRIIB (K74A 20-134)-Fc virket velstelt selv i sluttstadiene av sykdommen sammenlignet med PBS-gruppen. Denne observasjonen antyder at de behandlede musene har bedre helse og opprettholder en høyere livskvalitet enn kontrollene.

[0211] Som vist i figur 7, utviser SOD1-mus som mottar behandling med murint ActRIIB (K74A 20-134)-Fc en vesentlig større gripestyrke sammenlignet med PBS-kontrollgruppen. Dette observeres på dag 117, i det tidlige stadiet av sykdommen, samt etter at sykdommen har utviklet seg på dag 149. Figur 8 viser at mus behandlet med ActRIIB (K74A 20-134)-Fc overlevde vesentlig lenger enn mus i vehikkelkontrollene. Denne studien illustrerer anvendelsen av murint ActRIIB (K74A 20-134)-Fc i musemodellen av ALS for forbedre både styrken og overlevelsen for mus.

[0212] Et lignende eksperiment ble utført med SOD1-mus, men behandling ble utsatt til begynnelsen av tydelig påvisbart sykdomsutbrudd (dag 130) for å bedre etterligne behandlingen av human ALS etter utbrudd av vesentlige sykdomssymptomer. På dag 130 ble SOD1-mus delt inn i grupper behandlet med enten vehikkel (modifisert TBS) eller ActRIIB (R64 20-134)-mFc (10 mg/kg). Musene fikk tilført en subkutan dose én gang per uke. Musene ble NMR-skannet på studiedag -1 og 27 (alder henholdsvis 129 og 157 dager). Gripestyrkemålinger ble utført ved studiedager 0 og 20. Ved slutten av studien hadde hannkontrollgruppen mistet 4,3 % av kroppsvekten ved studiedag 0, mens den behandlede gruppen økte vekten med 7,8 % av kroppsvekten ved studiedag 0. Hunnkontrollgruppen mistet 1,5 %, og den behandlede hunngruppen økte vekten med 15 % av kroppsvekten ved studiedag 0.

SOD1-gripestyrkemåling

[0213]

	Dag 0	Dag 20
Hann, kontroll	0,149±0,02	0,097±0,02 ^a
Hann, ActRIIB (R64 20-134)-mFc	0,147±0,02	0,128±0,02 ^{a,b}
Hunn, kontroll	0,130±0,02	0,091±0,02 ^a
Hunn, ActRIIB (R64 20-134)-mFc	0,128±0,01	0,11±0,02 ^b

- 5 **[0214]** Dag 0 og 20 gripestyrkemålinger i hann- og hunn-SOD1-mus. En hevet "a" betyr signifikant forskjellig i forhold til de respektive dag 0-målingene ($p < 0,05$). En hevet "b" betyr signifikant forskjell mellom PBS (gruppe 1) og ActRIIB (R64 20-134)-mFc (gruppe 2) ved dag 20-målingene ($p < 0,05$).

- 10 **[0215]** Mus ble NMR-skannet for å fastslå endringer i kroppssammensetningen som skyldes behandlingen. Hannkontrollmus mistet 6,0 % av massen magert vev i løpet av studien (dag -1: 18,2 g ± 1,28; dag 27: 17,1 g ± 1,10), behandlede hannmus økte 9,1 % av masse magert vev på studiedag 0 (dag -1: 19,17 g ± 0,77; dag 27: 20,92 g ± 0,74). Hunnkontrollmus hadde en 0,83 % reduksjon av mager masse fra starten av studien (dag -1: 13,18 g ± 0,84; dag 27: 13,08 g ± 0,71) og behandlede hunnmus hadde en 10,7 % økning i forhold til kroppsvekten ved studiedag 0 (dag -1: 13,66 g ± 0,83; dag 27: 15,12 g ± 1,21). Både hann- og hunngruppene som mottok behandling økte vesentlig mengden magert vev i forhold til de respektive PBS-kontrollgruppene ($p < 0,001$).

SOD1-muskelvirkninger av ActRIIB (R64 20-134)-mFc**[0216]**

	Gastrocnemius (V+H)	Femoris (V+H)	Pectoralis (V+H)
Hann, kontroll	0,18 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,20 ± 0,04
Hann, ActRIIB (R64 20-134)-mFc	0,22 ± 0,04	0,15 ± 0,02	0,30 ± 0,04
Hunn, kontroll	0,13 ± 0,02	0,089 ± 0,016	0,11 ± 0,01
Hunn, ActRIIB (R64 20-134)-mFc	0,17 ± 0,03	0,01 ± 0,02	0,15 ± 0,05

- 25 **[0217]** Disse dataene indikerer at ActRIIB-Fc-behandling kan være fordelaktig i

behandlingen av pasienter som har aktiv ALS, både for å forbedre muskelfunksjonen og livskvaliteten.

Eksempel 12: Effekten av ActRIIB-Fc-proteiner på adipositas og diabetes i overvektige mus.

[0218] Søkerne analyserte ActRIIB-mFc-proteinene i mus som fikk en diett med høyt fettinnhold (HFD) for å fastslå evnen til ActRIIB-Fc til å redusere adipositas i en musemodell av fedme.

[0219] Type II-diabetes er en betydelig komplikasjon av fedme og karakteriseres ved insulinresistens. Forhøyede fastende insulinnivåer indikerer insulinresistens og tilveiebringer en måte å teste hvorvidt et dyr er i en insulinresistent tilstand. Søkerne fastslo effekten av behandling med murint ActRIIB (R64 K74A 20-134)-Fc til å normalisere fastende insulinnivåer i en musemodell av fedme.

[0220] HFD-fôret C57BL/6-mus ble holdt på en diett bestående av 35 % fett og ble ansett for å være overvektige når deres kroppsvekt var omtrent 50 % større enn den til mus på tilsvarende alder fôret med en standard matdiett (4,5 % fett). Overvektige mus fikk tilført en dose to ganger i uken med enten en vehikkelkontroll eller humant ActRIIB (R64 K74A 20-134)-Fc (10 mg/kg, ip.). Overvektige mus ble NMR-skannet for å fastslå kroppssammensetning ved begynnelsen av doseringen og etter 3 uker med tilførsel. Endringene i kroppssammensetning fra basalnivået oppsummeres i figur 9.

[0221] Mus ble fôret en HFD og ble ansett for å være overvektige når kroppsvekten var 50 % større enn motpartene som ble fôret standard matdiett. HFD-fôret mus fikk tilført en dose med enten en vehikkelkontroll eller murint ActRIIB (R64 K74A 20-134)-Fc (5 mg/kg to ganger i uken, ip.) i 35 uker. På slutten av studien fastet musene over natten. På slutten av fasten ble blod innsamlet og behandlet for serum. Serum ble deretter brukt til å bestemme fastende insulinnivåer for begge gruppene. Resultatene for virkningen av murint ActRIIB (K74A 20-134)-Fc på fastende insulinnivåer i overvektige mus er oppsummert i tabellen under.

Fastende insulinnivåer fra mus behandlet med vehikkel og murint ActRIIB (K74A 20-134)-Fc

[0222]

	HFD PBS	HFD Murint ActRIIB (K74A 20-134)-mFc
Gj.snitt (ng/ml) $\pm$ std.av.	2,27 $\pm$ 1,64	0,78 $\pm$ 0,40

	HFD PBS	HFD Murint ActRIIB (K74A 20-134)-mFc
ttest	Ikke tilgjengelig	0,012

[0223] Figur 9 viser redusert adipositas i gruppen med murint ActRIIB (R64 K74A 20-134)-Fc i forhold til den vehikkelbehandlede gruppen. Behandlede mus ble funnet å ha 25,9 % reduksjon i fettmasse sammenlignet med basalnivået. I tillegg økte den behandlede gruppen magert vev med 10,1 % mer enn basalnivået. Den prosentmessige endringen i både adipøs og mager vevmasse av ActRIIB (R64 K74A 20-134)-mFc var betydelig større enn den prosentmessige endringen i den PBS-behandlede gruppen.

[0224] I denne modellen ble mus holdt på en diett med høyt fettinnhold til de var > 50 % tyngre enn motpartene som ble føret standard matdiett. Basert på denne bemerkelsesverdige økningen i kroppsvekt og adipositas, står det til grunn at denne modellen kan tilsvare mennesker som blir karakterisert som sykkelig overvektige. Derfor kan oppdagelsen om at behandling med humant ActRIIB (R64 K74A 20-134)-Fc-protein reduserer adipositas i overvektige mus være klinisk relevant for behandling av sykkelig overvektige mennesker.

[0225] Resultatene som er oppsummert i tabell 5 tyder på at behandling med murint ActRIIB (K74A 20-134)-Fc-protein har evnen til å vesentlig redusere forhøyet fastende seruminsulinnivåer i forbindelse med fedme. Dette funnet støtter den mulige kliniske relevansen av bruk av ActRIIB-polypeptider i behandlingen av type II-diabetes.

[0226] Ytterligere eksperimenter ble utført med ActRIIB-mFc (R64 20-134) i HFD-modellen av fedme og diabetes. 30 uker gamle, HFD-førede C57BL/6-mus ble delt inn i 2 grupper (PBS og 10 mg/kg ActRIIB-mFc (R64 20-134)). Mus ble veid og tilført en dose 2 ganger i uken intraperitonealt i 12 uker. Musene ble vurdert ved NMR ved studiedag 0 og 94.

[0227] Behandlede mus tapte 1,9 % av kroppsvekten ved studiedag 0, mens PBS-behandlede mus økte vekten med 6,7 % av kroppsvekten fra utgangspunktet i løpet av studien. Behandlede mus økte også vesentlig mer magert vev enn PBS-gruppen (21,1 % ± 6,28 vs. 3,7 % ± 4,08) i løpet av studien. De behandlede musene tapte også betydelig fettvev (-34 % ± 10,95) sammenlignet med PBS-gruppen (+10,2 ± 10,18). Individuelle muskelvekter økte også i gruppen behandlet med ActRIIB-mFc (R64 20-134).

	Gastroc. (V+H)	Femoris (V+H)	Pect. (V+H)	
--	-------------------	---------------	-------------	--

PBS	0,33 ± 0,05	0,18 ± 0,03	0,31 ± 0,05	
ActRIIB-mFc (R64 20-134)	0,44 ± 0,08*	0,25 ± 0,02*	0,44 ± 0,13*	
				* p < 0,05

[0228] I tillegg til de gunstige virkninger på fett og muskler som er forbundet med ActRIIB-Fc-behandling i disse musene, ble positive effekter på serumlipider observert. Både serumkolesterol- og triglyseridnivåene ble betydelig redusert, noe som tyder på at ActRIIB-Fc-fusjonsproteinene kan anvendes til å redusere nivåene av disse lipidene i pasienter.

Eksempel 13: Effekten av ActRIIB-Fc-protein på muskelmasse i kakektiske mus.

[0229] Søkerne analyserte evnen til ActRIIB (R64 20-134)-mFc til å dempe muskeltap i en musmodell av glukokortikoidindusert muskelsvinn.

[0230] Musene fikk en subkutan dose daglig i 13 dager med enten PBS eller dexametason (2 mg/kg) for å indusere muskelsvinn. I løpet av de samme 13 dagene mottok de PBS- og dexametason-behandlede gruppene vehikkel eller ActRIIB (R64 20-134)-mFc (10 mg/kg, ip., to ganger i uken) slik at alle kombinasjonene av behandlinger ble representert. Musene ble NMR-skannet på dag 0 og 13 for å fastslå endringer i masse magert vev på tvers av gruppene. NMR-resultatene oppsummeres i tabell 6 under.

Tabell 6: Masse magert vev fra mus behandlet med vehikkel og murint ActRIIB (R64 20-134)-Fc

Gruppe (sk:ip-behandling)	Gj.sn. magert dag 13 - gj.sn. magert dag 0 (g) ± std.av.
PBS:PBS	0,83 ± 0,94
Dexamet:PBS	0,47 ± 0,34 ^a
Dexamet:ActRIIB	2,56 ± 0,37 ^{a,b}
PBS:ActRIIB	3,63 ± 0,62 ^a
^a Vesentlig forskjell sammenlignet med PBS:PBS ved p < 0,05	
^b Vesentlig forskjell sammenlignet med dexamet:PBS ved p < 0,05	

[0231] NMR-skanning viste en betydelig 2,5 % reduksjon i masse magert vev i dexametason:PBS-gruppen sammenlignet med PBS:PBS-gruppen. I motsetning utviste dexametason: ActRIIB (R64 20-134)-mFc-gruppen en 13,5 % økning i masse magert

vev, en betydelig økning sammenlignet med både PBS:PBS- og dexametason:PBS-gruppen. Kakeksi er en uønsket bivirkning av en rekke terapeutiske behandlinger, inkludert kronisk glukokortikoidbehandling. Det kan derfor være av klinisk betydning at behandlingen med humant ActRIIB (R64 20-134)-mFc-protein kan dempe muskelsvinnet forbundet med kakeksi.

Eksempel 14: Effekten av ActRIIB-Fc på muskelmasse og fedme i eldre eller ovariektomiserte mus

[0232] Sarkopeni er en form for muskeltap knyttet til aldring i ellers friske mennesker. Sykdommen er forbundet med progressivt tap av skjelettmuskelmasse og nedsatt styrke og mobilitet. Man vet lite om årsakene til sarkopeni. Hos kvinner akselererer overgangsalderen muskeltap, på samme måte som i forhold til tap av benmasse. Derfor ble ActRIIB (R64, 20-134)-mFc analysert i ekstremt gamle (to år gamle) mus og ovariektomiserte mus (en modell av den postmenopausale tilstanden).

[0233] 8 uker gamle C57BL/6-hunnmus ble enten ovariektomiserte (OVX) eller narreopererte. De fikk deretter vokse til 16 uker før studien startet. Ved begynnelsen av studien ble narreopererte og OVX-mus delt inn i behandlings- og vehikkelgrupper. Alle gruppene ble veid og tilført en dose med enten ActRIIB (R64, 20-134)-mFc eller bufferkontroll hver uke i 11 uker. Alle musene ble NMR-skannet på studiedag 0 og 83 for å fastslå kroppssammensetningen.

[0234] På slutten av studien hadde narreopererte PBS-mus tapt 4,7 % av den opprinnelige magre massen, mens den narrebehandlede gruppen økte den magre massen med 21 % i løpet av studien. OVX-kontrollene tapte 12,1 % (betydelig mer enn narrevehikkel) av den magre massen, mens behandlede OVX-mus økte 12,9 % innen slutten av studien.

[0235] Disse dataene tyder på at ActRIIB-Fc-fusjonsproteiner kan brukes til å motvirke muskeltap som er vanlig hos postmenopausale kvinner.

[0236] For å vurdere virkningene av ActRIIB-Fc i en naturlig aldret befolkning fikk C57BL/6-hannmus bli 70 uker gamle før behandlingen ble startet. Musene ble delt inn i 2 grupper (PBS og 10 mg/kg ActRIIB (R64, 20-134)-mFc. Hver gruppe ble veid og tilført en dose 2 ganger i uken i 10 uker. I løpet av studien økte massen magert vev betydelig mer i de behandlede gruppene enn i PBS-gruppen.

% endring mager masse	PBS	10 mg/kg
Gj.sn. (% fra basalnivået)	101,76	117,27
Std.av.	3,83	3,91
P-verdi til PBS		<0,001

[0237] Den behandlede gruppen hadde også betydelig høyere individuell muskelvekt i forhold til PBS-mus.

Muskelvekt	Gastroc. (V+H)	Femoris (V+H)	Pectoralis (V+H)	
PBS	0,283±0,07	0,156±0,01	0,241±0,07	
ActRIIB (R64, 20-134)-mFc	0,371±0,03*	0,192±0,021*	0,330±0,05*	* p < 0,05

5

[0238] Muskelintegriteten i den behandlede gruppen virket også å være større enn for PBS-gruppen, siden intramuskulært fett tilsynelatende ble redusert og cytoarkitekturen forbedret. (Se figur 10).

[0239] Disse dataene viser at ActRIIB-Fc-fusjonsproteiner kan brukes til å behandle muskelsvinn forbundet med aldring i menn og kvinner.

10

Eksempel 15: Effekten av ActRIIB-Fc på muskeltap forbundet med kastrering

[0240] Prostatakreft behandles vanligvis med antiandrogen behandling. Bivirkninger av behandlingen omfatter muskeltap og økt fedme. Kastrerte mus gjennomgår lignende endringer, noe som gjør dette til en god modell for å studere mulighetene for at ActRIIB-Fc kan brukes i klinisk sammenheng.

15

[0241] 8 uker gamle C57BL/6-hannmus ble kastrert eller narreoperert. De fikk deretter komme seg i 3 uker før studien startet. Narreopererte og kastrerte grupper ble videre inndelt i grupper med PBS og ActRIIB (R64, 20-134)-mFc (10 mg/kg). Mus ble veid og tilført en dose subkutant én gang i uken i 12 uker. Musene ble NMR-skannet ved studiedag 0 og 83.

20

[0242] I løpet av studien økte narreopererte PBS-mus i gjennomsnitt 9,72 % ± 3,67 og narreopererte ActRIIB (R64, 20-134)-mFc-mus økte 35,79 % ± 3,1 i forhold til masse magert vev ved studiedag 0. Kastrerte PBS-behandlede mus tapte 8,1 % ± 4,22 av masse magert vev ved studiedag 0, mens behandlede kastrerte mus økte 17,77 % ± 3,86. I tillegg fører kastrering til økt adipositas, men ActRIIB (R64, 20-134)-mFc-behandlingen hjalp med å redusere omfanget av fettmasseøkningen.

25

[0243] Gastroc.- og pectoralis-musklene fra kastrerte vehikkelmus var mindre enn narreopererte PBS-mus (kastrert gastroc.: 0,275 ± 0,03 g, kastrert pect.: 0,196 ± 0,06 g; narreoperert gastroc.: 0,313 ± 0,02 g, narreoperert pect.: 0,254 ± 0,03 g). ActRIIB (R64, 20-134)-mFc-behandling dempet denne kastreringsinduserte reduksjonen i muskelvekt betydelig (kastrert gastroc.: 0,421 ± 0,03 g, kastrert pect.: 0,296 ± 0,06g).

30

Eksempel 16: Effekter av ActRIIB-Fc på kreftkakeksi

35

[0244] Mange tumorer er forbundet med tap av appetitt og alvorlig muskeltap. Pasienter som utviser kakeksi har dårligere prognose enn pasienter som ikke har kakeksi.

Tykkttarmskreftcellelinjen CT26 induserer alvorlig kakeksi hos mus. ActRIIB(R64 20-134) ble analysert i denne modellen for virkning på xenograftindusert kakeksi.

[0245] Seks grupper mus ble brukt i eksperimentet, som følger:

Gruppe	Tumorer	Behandling	Dose	Paradigme
1	N	VEH	v/v	Terapeutisk
2	N	ActRIIB-Fc	10 mg/kg	Terapeutisk
3	J	VEH	v/v	Terapeutisk
4	J	ActRIIB-Fc	10 mg/kg	Terapeutisk
5	J	ActRIIB-Fc	30 mg/kg	Terapeutisk
6	J	ActRIIB-Fc	10 mg/kg	Forebyggende

[0246] Gruppe 3-6 fikk tilført 5×10^6 tumorceller subkutan. Gruppe 6 fikk påbegynt behandling med ActRIIB-Fc umiddelbart to ganger i uken. Gruppe 1-5 fikk påbegynt dosering på studiedag 28 når tumorene nådde en størrelse på 300-500 mm³. Som vist i figur 11 reduserte ActRIIB-Fc muskeltapet forbundet med CT26-tumorene markert, både i mus med etablerte tumorer, og når det ble brukt i en forebyggende modell før tumorene ble introdusert.

Eksempel 17: Effekten av ActRIIB-Fc-varianter på muskelmasse i villtypemus

[0247] Denne studien viser virkningene av følgende ActRIIB-relaterte Fc-konstruksjoner på muskelmasse og andre vev i 6 uker gamle C57BL/6-hannmus. Musene ble veid og fikk intraperitonealt injisert enten PBS eller en ActRIIB-relatert Fc-konstruksjon (10 mg/kg) annen hver uke:

ActRIIB (R64 20-134)-Fc

ActRIIB (L79D 20-134)-Fc

ActRIIB (L79E 20-134)-Fc

ActRIIB (A24N 20-134)-Fc

ActRIIB (R64K 20-134)-Fc

[0248] Musene ble NMR-skannet i begynnelsen, midten av og slutten av studien.

Femoris-, pectoralis- og gastrocnemius-musklene og leveren, nyrene og milten ble veid og lagret i formalin.

[0249] En innledende analyse av dataene tyder på at ActRIIB (R64 20-134)-Fc forårsaker størst økning i muskelmasse og masse magert vev, og har også størst påvirkning på andre vev. L79D- og L79E-variantene øker muskelmassen i mindre grad, men har liten effekt på andre vev. A24N- og R64K-konstruksjonene har en umiddelbar effekt på muskler og andre vev. Disse dataene bekrefter at variantene av ActRIIB med redusert aktivbinding har ønskelige egenskaper, spesielt en selektiv effekt på muskelvev.

[0250] Selv om spesifikke utførelsesformer av emnet er omtalt, er den ovenstående beskrivelsen illustrativ og ikke restriktiv. Mange variasjoner vil være åpenbare for fagfolk etter gjennomgang av denne spesifikasjonen og kravene nedenfor. Det fullstendige omfanget av oppfinnelsen skal bestemmes ved referanse til patentkravene og beskrivelsen.

SEKVENSLISTE

[0251]

<110> ACCELERON PHARMA INC.

<120> VARIANTER AVLEDET FRA ACTRIIB OG ANVENDELSER FOR DISSE

<130> P47899EP1/NJL

<140>

<141> 2008-02-04

<150> 60/899,304

<151> 2007-02-02

<150> 60/927,088

<151> 2007-05-01

<150> 60/931 880

<151> 25.05.2007

<160> 25

<170> Patent i ver. 3,3

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala
 1           5           10           15
Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu
           20           25           30
Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser
           35           40           45
Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe
 50           55           60
Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln
 65           70           75           80
Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr
           85           90           95
His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro
           100           105           110
Thr Ala Pro Thr
           115

```

<210> 2

<211> 512

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Trp

```

1	5	10	15
Pro Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr	20	25	30
Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg	35	40	45
Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg	50	55	60
Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp	65	70	75
Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn	85	90	95
Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg	100	105	110
Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro	115	120	125
Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu	130	135	140
Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val Leu Leu Ala Phe Trp Met Tyr	145	150	155
Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly His Val Asp Ile His Glu Asp Pro	165	170	175
Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu	180	185	190
Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln	195	200	205
Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys	210	215	220
Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys	225	230	235
His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn	245	250	255
Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser	260	265	270
Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys	275	280	285
His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp	290	295	300
Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg	305	310	315
Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val	325	330	335

Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro
 340 345 350
 Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu
 355 360 365
 Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile
 370 375 380
 Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys
 385 390 395 400
 Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu
 405 410 415
 Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val
 420 425 430
 His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro
 435 440 445
 Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp
 450 455 460
 Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu
 465 470 475 480
 Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu
 485 490 495
 Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile
 500 505 510

<210> 3

<211> 348

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

tctgggcgtg gggaggctga gacacgggag tgcattctact acaacgcca ctgggagctg 60
 gagcgaccca accagagcgg cctggagcgc tgcgaaggcg agcaggacaa gcggctgcac 120
 tgctacgcct cctggcgcaa cagctctggc accatcgagc tcgtgaagaa gggctgctgg 180
 ctatagtgact tcaactgcta cgataggcag gagtgtgtgg ccactgagga gaacccccag 240
 gtgtacttct gctgctgtga aggcaacttc tgcaacgagc gcttactca ttgcccagag 300
 gctgggggcc cggaagtcac gtacgagcca ccccgacag ccccccacc 348

<210> 4

10 <211> 1539

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

atgacggcgc cctgggtggc cctcgccctc ctctggggat cgctgtggcc cggctctggg 60
cgtggggagg ctgagacacg ggagtgcac tactacaacg ccaactggga gctggagcgc 120
accaaccaga gcggcctgga gcgctgcgaa ggcgagcagg acaagcggct gcaactgtac 180
gcctcctggc gcaacagctc tggcaccatc gagctcgtga agaagggtg ctggctagat 240
gacttcaact gctacgatag gcaggagtgt gtggccactg aggagaaccc ccagggtgtac 300
ttctgctgct gtgaaggcaa cttctgcaac gagcgcttca ctcatctgcc agaggctggg 360
ggcccgaag tcacgtacga gccacccccg acagccccc aacctgtcac ggtgctggcc 420
tactcactgc tgcccatcgg ggccctttcc ctcatcgtcc tgctggcctt ttggatgtac 480
cggcacgcga agcccccta cggtcatgtg gacatccatg aggaccctgg gcctccacca 540

ccatccccctc tgggtggcct gaagccactg cagctgctgg agatcaaggc tcggggggcgc 600
tttgggtgtg tctggaaggc ccagctcatg aatgactttg tagctgtcaa gatcttccca 660
ctccaggaca agcagtcgtg gcagagtga cgggagatct tcagcacacc tggcatgaag 720
cacgagaacc tgctacagtt cattgctgcc gagaagcgag gctccaacct cgaagtagag 780
ctgtggctca tcacggcctt ccattgacaag ggctccctca cggattacct caagggggaa 840
atcatcacat ggaacgaact gtgtcatgta gcagagacga tgtcacgagg cctctcatal 900
ctgcatgagg atgtgccctg gtgccgtggc gagggccaca agccgtctat tgccacagg 960
gactttaaaa gtaagaatgt attgctgaag agcgacctca cagccgtgct ggctgacttt 1020
ggcttggctg ttcgatttga gccagggaac cctccagggg acaccacgg acaggtaggc 1080
acgagacggg acatgggtcc tgagggtgctc gagggagcca tcaacttcca gagagatgcc 1140
ttcctgcgca ttgacatgta tgccatgggg ttggtgctgt gggagcttgt gtctcgctgc 1200
aaggctgcag acggaccctg ggatgagtac atgctgccct ttgagggaaga gattggccag 1260
cacccttcgt tggaggagct gcaggaggtg gtggtgcaca agaagatgag gccaccatt 1320
aaagatcact ggttgaaaca cccgggcctg gccagcttt gtgtgacct cgaggagtgc 1380
tgggaccatg atgcagaggc tcgcttgtcc gcgggctgtg tggaggagcg ggtgtccctg 1440
attcggaggt cggtcaacgg cactacctcg gactgtctcg tttccctggg gacctctgtc 1500
accaatgtgg acctgcccc taaagagtca agcatctaa 1539

```

5 <210> 5

<211> 343

<212> PRT

<213> Kunstig sekvens

<220>

10 <223> Beskrivelse av kunstig sekvens: Syntetisk konstruksjon

<400> 5

Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 1 5 10 15
 Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 20 25 30
 Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
 35 40 45
 Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
 50 55 60
 Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65 70 75 80
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 85 90 95
 Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
 100 105 110
 Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 115 120 125
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 130 135 140
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 145 150 155 160
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 165 170 175
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 180 185 190
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 195 200 205
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 210 215 220
 Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 225 230 235 240
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 245 250 255
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 260 265 270
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 275 280 285
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 290 295 300
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 305 310 315 320
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 325 330 335
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340

5 <210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Kunstig sekvens

<220>

<223> Beskrivelse av kunstig sekvens: Syntetisk peptid

5 <400> 6

Thr Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 7

<211> 21

10 <212> PRT

<213> Apis mellifera

<400> 7

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
1 5 10 15

Ser Tyr Ile Tyr Ala
20

15 <210> 8

<211> 22

<212> PRT

<213> Ukjent organisme

<220>

20 <223> Beskrivelse av ukjent organisme: Plasminogenaktivator for vev

<400> 8

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Pro
20

<210> 9

25 <211> 20

<212> PRT

<213> Ukjent organisme

<220>

<223> Beskrivelse av ukjent organisme: Nativt peptid

<400> 9

Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Ala
 20

<210> 10

5 <211> 1107

<212> DNA

<213> Kunstig sekvens

<220>

<223> Beskrivelse av kunstig sekvens: Syntetisk konstruksjon

10 <400> 10

```

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60
tcgcccggcg cctctgggcg tggggaggct gagacacggg agtgcattcta ctacaacgcc 120
aactgggagc tggagcgcac caaccagagc ggcctggagc gctgcgaagg cgagcaggac 180
aagcggctgc actgctacgc ctccctggcg aacagctctg gcaccatcga gctcgtgaag 240
aagggctgct ggctagatga cttcaactgc tacgataggc aggagtgtgt ggccactgag 300
gagaaccccc aggtgtactt ctgctgctgt gaaggcaact tctgcaacga gcgcttcaact 360
catttgccag aggtctggggg ccggaagtc acgtacgagc caccctcgac agccccacc 420
ggtggtggaa ctacacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 480
gtcttcctct tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 540
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 600
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 660
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 720
aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gtcccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 780
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgccc catcccggga ggagatgacc 840
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 900
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 960
tccgacggct ccttcttctc ctatagcaag ctccaccgtg acaagagcag gtggcagcag 1020
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cagcagaag 1080
agcctctccc tgtctccggg taaatga 1107

```

<210> 11

<211> 6

15 <212> PRT

<213> Kunstig sekvens

<220>

<223> Beskrivelse av kunstig sekvens: Syntetisk peptid

<400> 11

20

Gly Arg Gly Glu Ala Glu
 1 5

<210> 12

<211> 344

<212> PRT

25 <213> Kunstig sekvens

<220>

<223> Beskrivelse av kunstig sekvens: Syntetisk konstruksjon

<400> 12

```

Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala
 1          5          10          15

Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu
          20          25          30

Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser
          35          40          45

Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe
 50          55          60

Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln
 65          70          75          80

Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr
          85          90          95

His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro
          100          105          110

Thr Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
          115          120          125

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
          130          135          140

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
          145          150          155          160

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
          165          170          175

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
          180          185          190

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
          195          200          205

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

```

210	215	220
Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro 225 230 235 240		
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr 245 250 255		
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser 260 265 270		
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr 275 280 285		
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr 290 295 300		
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe 305 310 315 320		
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys 325 330 335		
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 340		

<210> 13

<211> 225

5 <212> PRT

<213> Kunstig sekvens

<220>

<223> Beskrivelse av kunstig sekvens: Syntetisk konstruksjon

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (43)

<223> Asp eller Ala

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (100)

<223> Lys eller Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (212)

20 <223> Asn eller Ala

<400> 13

```

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 1           5           10           15
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
          20           25           30
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Xaa Val Ser His Glu Asp
      35           40           45
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 50           55           60
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 65           70           75           80
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
          85           90           95
Tyr Lys Cys Xaa Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys
          100          105          110
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
      115          120          125
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
      130          135          140
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
      145          150          155          160
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
          165          170          175
Asp Ser Asp Gly Pro Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
          180          185          190
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
      195          200          205
Ala Leu His Xaa His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
      210          215          220
Lys
225

```

- 5 <210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Kunstig sekvens
 <220>
 10 <223> Beskrivelse av kunstig sekvens: Syntetisk peptid
 <400> 14

```

Ser Gly Gly Gly Gly
 1           5

```

- <210> 15
 15 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Kunstig sekvens

<400> 15

<400> 16

Met 1	Asp	Ala	Met	Lys 5	Arg	Gly	Leu	Cys	Cys 10	Val	Leu	Leu	Leu	Cys 15	Gly
Ala	Val	Phe	Val 20	Ser	Pro	Gly	Ala	Ser 25	Gly	Arg	Gly	Glu	Ala 30	Glu	Thr
Arg	Glu	Cys 35	Ile	Tyr	Tyr	Asn	Ala 40	Asn	Trp	Glu	Leu	Glu 45	Arg	Thr	Asn
Gln	Ser 50	Gly	Leu	Glu	Arg	Cys 55	Glu	Gly	Glu	Gln	Asp 60	Lys	Arg	Leu	His
Cys 65	Tyr	Ala	Ser	Trp	Arg 70	Asn	Ser	Ser	Gly	Thr 75	Ile	Glu	Leu	Val	Lys 80
Lys	Gly	Cys	Trp	Leu 85	Asp	Asp	Phe	Asn	Cys 90	Tyr	Asp	Arg	Gln	Glu 95	Cys
Val	Ala	Thr	Glu 100	Glu	Asn	Pro	Gln	Val 105	Tyr	Phe	Cys	Cys	Cys 110	Glu	Gly
Asn	Phe	Cys 115	Asn	Glu	Arg	Phe	Thr 120	His	Leu	Pro	Glu	Ala 125	Gly	Gly	Pro
Glu	Val 130	Thr	Tyr	Glu	Pro	Pro 135	Pro	Thr	Ala	Pro	Thr 140	Gly	Gly	Gly	Thr
His 145	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys 150	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu 155	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser 160
Val	Phe	Leu	Phe	Pro 165	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp 170	Thr	Leu	Met	Ile	Ser 175	Arg
Thr	Pro	Glu	Val 180	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp 185	Val	Ser	His	Glu	Asp 190	Pro
Glu	Val	Lys 195	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val 200	Asp	Gly	Val	Glu	Val 205	His	Asn	Ala
Lys	Thr 210	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu 215	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr 220	Tyr	Arg	Val	Val
Ser 225	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His 230	Gln	Asp	Trp	Leu 235	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr 240
Lys	Cys	Lys	Val	Ser 245	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro 250	Val	Pro	Ile	Glu	Lys 255	Thr
Ile	Ser	Lys	Ala 260	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg 265	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr 270	Thr	Leu
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
			275				280					285			
Leu	Val 290	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro 295	Ser	Asp	Ile	Ala	Val 300	Glu	Trp	Glu	Ser
Asn 305	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 310	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr 315	Pro	Pro	Val	Leu	Asp 320
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe 325	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys 330	Leu	Thr	Val	Asp	Lys 335	Ser
Arg	Trp	Gln	Gln 340	Gly	Asn	Val	Phe	Ser 345	Cys	Ser	Val	Met	His 350	Glu	Ala
Leu	His	Asn 355	His	Tyr	Thr	Gln	Lys 360	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser 365	Pro	Gly	Lys

<210> 17

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 17

```

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn
 1           5           10           15

Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly
          20           25           30

Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser
          35           40           45

Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn
 50           55           60

Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val
 65           70           75           80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr
          85           90           95

Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro
          100          105          110

Lys Pro Pro Thr
          115

```

<210> 18

<211> 115

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

15

```

Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 1           5           10           15

Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
          20           25           30

Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
          35           40           45

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
 50           55           60

Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 65           70           75           80

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
          85           90           95

Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
          100          105          110

Ala Pro Thr
          115

```

<210> 19
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.
 <400> 19

5

```

Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1           5           10
Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
          20           25           30
Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
          35           40           45
Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Pro
 50           55           60
Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
 65           70           75           80
Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
          85           90           95
Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
          100          105          110
Phe Thr His Leu Pro Glu Pro Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
          115          120          125
Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
          130          135          140
Pro Ile Gly Gly Leu Ser
          145          150

```

<210> 20
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Sus sp.
 <400> 20

10

```

Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1           5           10           15

```

```

Val Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
      20      25      30
Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
      35      40      45
Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
      50      55      60
Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
      65      70      75      80
Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
      85      90      95
Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
      100      105      110
Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
      115      120      125
Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
      130      135      140
Pro Ile Gly Gly Leu Ser
      145      150

```

<210> 21

<211> 150

5 <212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 21

```

Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
  1      5      10      15
Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
      20      25      30
Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
      35      40      45
Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
      50      55      60
Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
      65      70      75      80
Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
      85      90      95
Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
      100      105      110
Phe Thr His Leu Pro Glu Pro Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
      115      120      125
Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
      130      135      140
Pro Ile Gly Gly Leu Ser

```

145

150

<210> 22
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22

5

```

Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1          5          10          15

Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
          20          25          30

Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
          35          40          45

Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
 50          55          60

Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
65          70          75          80

Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
          85          90          95

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
          100          105          110

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
          115          120          125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
130          135          140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser
145          150

```

<210> 23
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Bos sp.
 <400> 23

10

```

Met Thr Ala Pro Trp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1          5          10          15

Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
          20          25          30

Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
          35          40          45

Cys Glu Gly Glu Arg Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
 50          55          60

Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
65          70          75          80

Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
          85          90          95

```

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
100 105 110

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
130 135 140

Pro Val Gly Gly Leu Ser
145 150

<210> 24

<211> 150

5 <212> PRT

<213> Xenopus sp.

<400> 24

Met Gly Ala Ser Val Ala Leu Thr Phe Leu Leu Leu Leu Ala Thr Phe
1 5 10 15

Arg Ala Gly Ser Gly His Asp Glu Val Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr
20 25 30

Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Lys Thr Asn Gln Ser Gly Val Glu
35 40 45

Arg Leu Val Glu Gly Lys Lys Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser
50 55 60

Trp Arg Asn Asn Ser Gly Phe Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp
65 70 75 80

Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Ile Ala Lys Glu
85 90 95

Glu Asn Pro Gln Val Phe Phe Cys Cys Glu Gly Asn Tyr Cys Asn
100 105 110

Lys Lys Phe Thr His Leu Pro Glu Val Glu Thr Phe Asp Pro Lys Pro
115 120 125

Gln Pro Ser Ala Ser Val Leu Asn Ile Leu Ile Tyr Ser Leu Leu Pro
130 135 140

Ile Val Gly Leu Ser Met
145 150

10 <210> 25

<211> 150

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

15

Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys
1 5 10 15

Ser Ser Gly Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe
20 25 30

Phe	Asn	Ala	Asn	Trp	Glu	Lys	Asp	Arg	Thr	Asn	Gln	Thr	Gly	Val	Glu
35						40			45						
Pro	Cys	Tyr	Gly	Asp	Lys	Asp	Lys	Arg	Arg	His	Cys	Phe	Ala	Thr	Trp
50						55				60					
Lys	Asn	Ile	Ser	Gly	Ser	Ile	Glu	Ile	Val	Lys	Gln	Gly	Cys	Trp	Leu
65				70						75				80	
Asp	Asp	Ile	Asn	Cys	Tyr	Asp	Arg	Thr	Asp	Cys	Val	Glu	Lys	Lys	Asp
				85				90						95	
Ser	Pro	Glu	Val	Tyr	Phe	Cys	Cys	Cys	Glu	Gly	Asn	Met	Cys	Asn	Glu
		100						105				110			
Lys	Phe	Ser	Tyr	Phe	Pro	Glu	Met	Glu	Val	Thr	Gln	Pro	Thr	Ser	Asn
		115				120						125			
Pro	Val	Thr	Pro	Lys	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Asn	Ile	Leu	Leu	Tyr	Ser	Leu
130						135				140					
Val	Pro	Leu	Met	Leu	Ile										
145				150											

Patentkrav

- 5 **1.** En variant av ActRIIB-proteinet som består av en aminosyresekvens som er minst 90 % lik aminosyrene 29-109 ifølge SEKV ID NR:2, hvor proteinet består av en sur aminosyre i posisjonen som tilsvarer posisjon 79 ifølge SEKV ID NR:2.
- 10 **2.** ActRIIB-proteinvarianten ifølge krav 1, hvor proteinet omfatter en aminosyresekvens som er minst 95 %, 97 %, 98 % eller 99 % lik aminosyrene 29-109 ifølge SEKV ID NR: 2.
- 15 **3.** ActRIIB-proteinvarianten ifølge ethvert foregående krav hvor proteinet omfatter en R eller K ved posisjonen som tilsvarer posisjon 64 ifølge SEKV ID NR:2.
- 20 **4.** ActRIIB-proteinvarianten ifølge ethvert foregående krav hvor proteinet omfatter en D eller en E ved posisjonen som tilsvarer posisjon 79 ifølge SEKV ID NR:2.
- 25 **5.** ActRIIB-proteinvarianten ifølge ethvert foregående krav, hvor proteinet omfatter en aminosyresekvens som begynner ved en aminosyrerest som tilsvarer enhver av aminosyrene 22-25 ifølge SEKV ID NR:2 og slutter ved en aminosyre som tilsvarer enhver av aminosyrene 131, 133 eller 134 ifølge SEKV ID NR:2.
- 30 **6.** ActRIIB-proteinvarianten ifølge krav 5, hvor proteinet omfatter en aminosyresekvens som begynner ved aminosyre 25 ifølge SEKV ID NR:2 og slutter ved aminosyre 131 ifølge SEKV ID NR:2.
- 35 **7.** ActRIIB-proteinvarianten ifølge ethvert foregående krav, hvor proteinet er en homodimer.
- 8.** ActRIIB-proteinvarianten ifølge ethvert foregående krav, hvor proteinet er et fusjonsprotein som videre omfatter en heterolog del.
- 9.** ActRIIB-proteinvarianten ifølge krav 8, hvor den heterologe delen omfatter et konstant område fra en IgG-tungkjede.
- 10.** ActRIIB-proteinvarianten ifølge krav 9, hvor den heterologe delen omfatter et Fc-domene.

11. ActRIIB-proteinvarianten ifølge krav 10, hvor fusjonsproteinet videre omfatter et linkerdomene plassert mellom ActRIIB-polypeptidet og Fc-domenet.

5 **12.** ActRIIB-proteinvarianten i ethvert foregående krav, hvor proteinet inkluderer én eller flere modifiserte aminosyrerester utvalgt blant: en glykosylert aminosyre, en PEGylert aminosyre, en farnesylert aminosyre, en acetyllert aminosyre, en biotinyllert aminosyre og en aminosyre konjugert til en lipidmoiety.

10 **13.** ActRIIB-proteinvarianten i ethvert av de foregående kravene 8-12, hvor proteinet videre omfatter en sekvens for rensing utvalgt blant: en epitopetagg, en FLAG-tag, en polyhistidinsekvens og en GST-fusjon.

15 **14.** ActRIIB-proteinvarianten i ethvert av de foregående kravene 8-13, hvor ActRIIB-proteinvarianten hemmer signaliseringen med myostatin og/eller GDF11 i en cellebasert analyse.

15. En farmasøytisk sammensetning som omfatter ActRIIB-proteinvarianten i alle foregående krav.

**Human, løselig, ekstracellulær ActRIIB-polypeptidsekvens betegnet som
SEKV ID NR: 1 (116 aa).**

SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKK
GC

WLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPFPPTAPT

Figur 1

**Human ActRIIB-forløpersekvens betegnet som SEKV ID NR: 2
(NM_001106, 512 aa).**

MTAPWVALALLWGSLWPGSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRL
HC

YASWRN¹SSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHL
PE

AGGPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHED
PG

PPPPSPLVGLKPLQLEIKARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIF
ST

PGMKHENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLGNIITWNECHVAET
MS

RGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGGLAVRFEPGKPP
GD

THGQVGTRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVDEYM
LP

FEEEIGQHPSLEELQEVVHKKMRPTIKDHWLKHPLAQLCVTIEECWDHDAEARLS
AG

CVEERVSLIRRSVNGTTSCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI

Figur 2

**Nukleinsyresekvens som koder for et humant, løselig (ekstracellulært)
ActRIIB-polypeptid, betegnet som SEKV ID NR: 3 (348 bp)**

```
tctgggcgtggggaggctgagacacgggagtgcatctactacaacgccaaactgggagctggagcgcacc  
aaccagagcggcctggagcgtgcgaaggcgagcaggacaagcggctgcactgctacgcctcctggcgc  
aacagctctggcaccatcgagctcgtgaagaagggtgctggctagatgacttcaactgctacgatagg  
caggagtgtgtggccactgaggagaacccccaggtgtacttctgctgctgtgaaggcaacttctgcaac  
gagcgttcactcatttgccagaggctggggggcccggaagtcacgtacgagccacccccgacagcccc  
acc
```

Figur 3

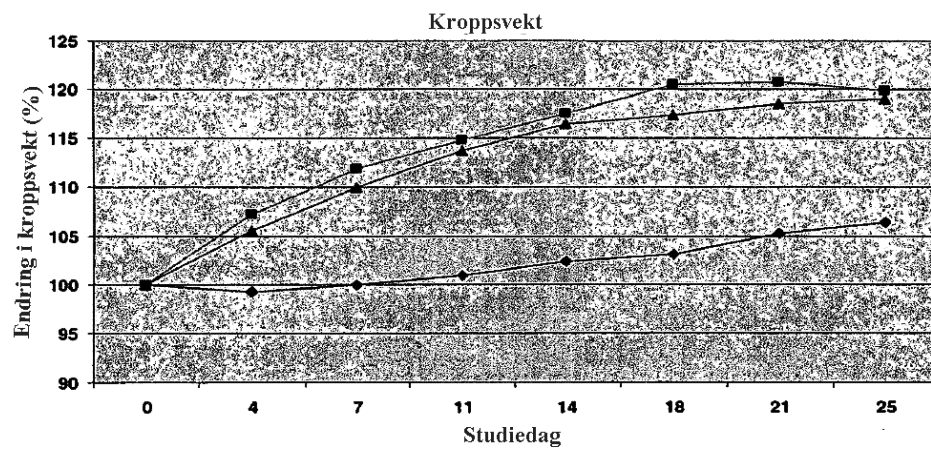
Nukleinsyresekvens som koder for et humant, ActRIIB-forløperprotein, betegnet som SEKV ID NR: 4 (nukleotider 5-1543 av NM_001106, 1539 bp).

```

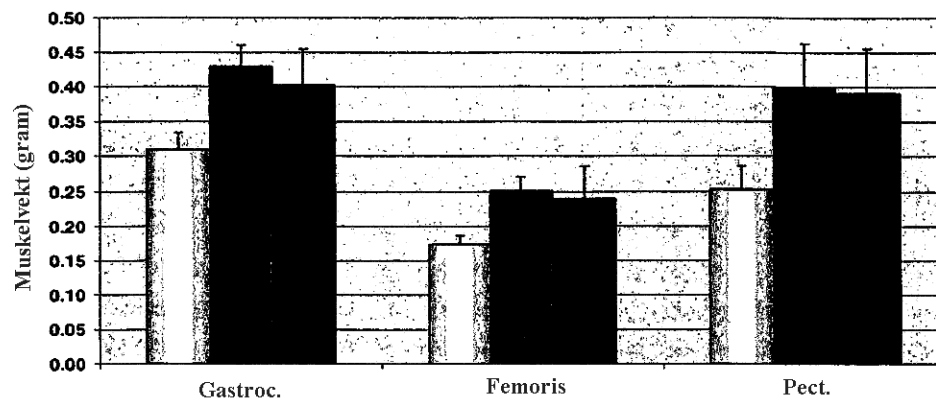
atgacggcgccctgggtggccctcgccctcctctggggatcgctgtggcccggtcttgggcgtggggag
gctgagacacgggagtgcatctactacaacgccaaactgggagctggagcgcaccaaccagagcggcctg
gagcgctgcgaaggcgagcaggacaagcggctgcactgctacgcctcctggcgcaacagctctggcacc
atcgagctcgtgaagaagggtgctggctagatgacttcaactgctacgataggcaggagtgtgtggcc
actgaggagaacccccagggtgacttctgctgctgtgaaggcaacttctgcaacgagcgcttcactcat
ttgccagaggctggggggcccggaagtcacgtacgagccacccccgacagccccaccctgctcacggtg
ctggcctactcactgctgcccacgggggcctttccctcatcgctcctgctggccttttggtgtaccgg
catcgcaagccccctacgggtcatgtggacatccatgaggacctgggcctccaccaccatccccctcg
gtgggcctgaagccactgcagctgctggagatcaaggctcgggggcgctttggctgtgtctggaaggcc
cagctcatgaatgactttgtagctgtcaagatcttccactccaggacaagcagtcgtggcagagtga
cgggagatcttcagcacacctggcatgaagcacgagaacctgctacagttcatgtgtgccgagaagcga
ggctccaacctcgaagtagagctgtggctcatcacggccttccatgacaagggtccctcacggattac
ctcaaggggaacatcatcacatggaacgaactgtgtcatgtagcagagacgatgtcacgaggcctctca
tacctgcatgaggatgtgccctgggtgccgtggcgaggggccacaagccgtctattgcccacagggacttt
aaaagtaagaatgtattgctgaagagcgacctcacagccgtgctggctgactttggcttggctgttcga
tttgagccagggaaacctccaggggacacccacggacaggtaggcacgagacggtacatggctcctgag
gtgctcgaggggagccatcaacttccagagagatgccttccctgcgcattgacatgtatgccatggggttg
gtgctgtgggagcttgtgtctcgctgcaaggctgcagacggacccgtggatgagtacatgctgcccttt
gaggaagagattggccagcacccttcgttggaggagctgcaggaggtgggtggtgcacaagaagatgagg
cccaccattaaagatcactgggtgaaacacccgggctggccagctttgtgtgaccatcgaggagtgc
tgggaccatgatgcagaggctcgcttgtcccggggtgtgtggaggagcgggtgtccctgattcggagg
tcgggtcaacggcactacctcggaactgtctcgtttccctggtgacctctgtcaccaatgtggacctgcc
cctaaagagtcaagcatctaa

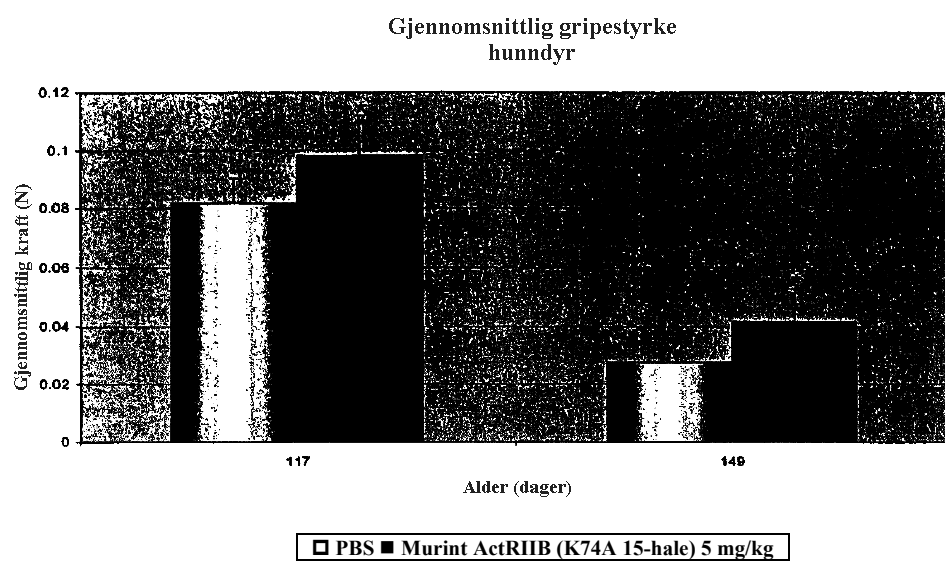
```

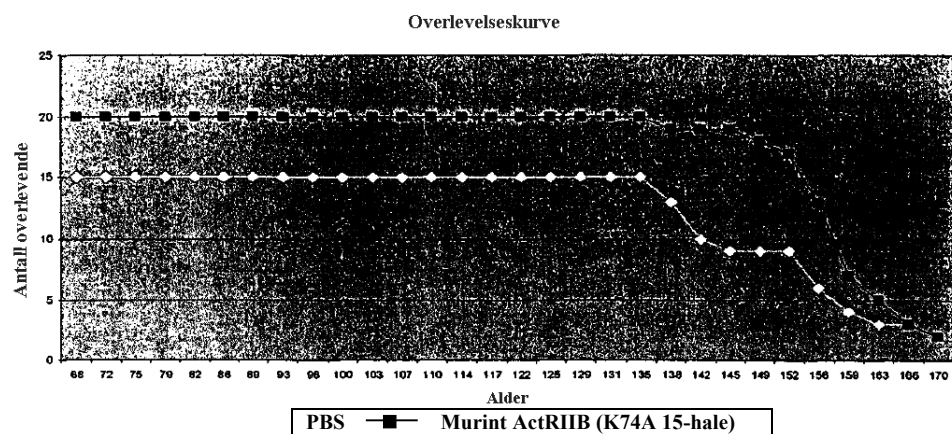
Figur 4



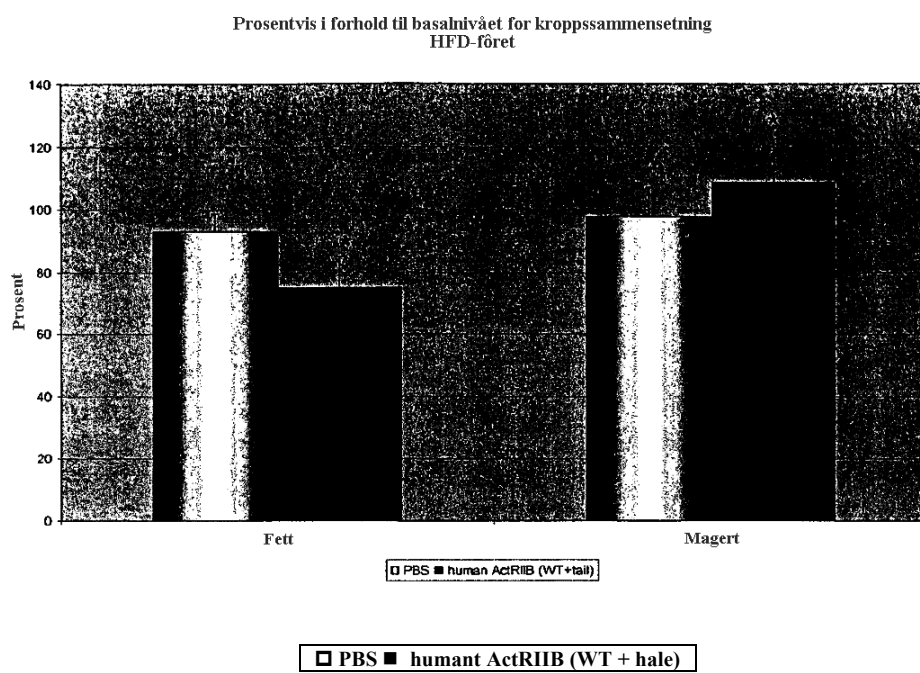
Figur 5

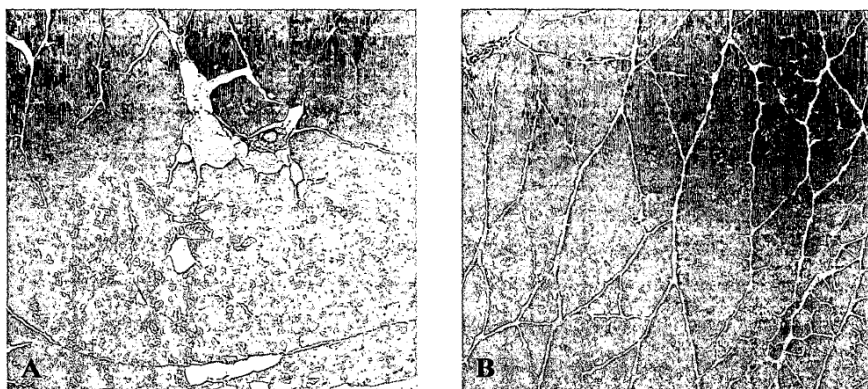
**Figur 6**

**Figur 7**



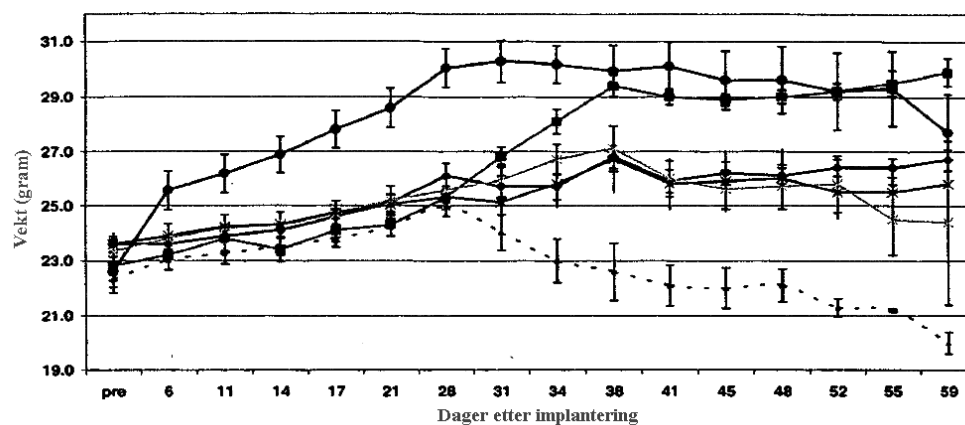
Figur 8

**Figur 9**



Figur 10

Gjennomsnittlig kroppsvekt for CT26-implanterte BALB/c-hannemus



Figur 11

ActRIIa ILGRSETQEC LFFNANWEKD RTNQTGVGPC YGDKDKRRHC FATWKNISGS
ActRIIb GRGEAETREC IYNNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT

IEIVKQGCWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV YFCCCEGNMC NEKFSYFPPEM
IELVKKGCWL DDFNICYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA

EVTQPTSNPV TPKPPT
GGPEVTYEPP PTAPT

Figur 12

Rotte-IIb	M	T	A	P	W	A	A	-	L	A	L	W	G	S	L	C	A	G	S	G	R	G	E	A	E	T	R	E	C	I	V	Y	N	A	N	W	E	L	E	R	T	N	Q	S	G	L	E	R	-	C	E	G	E	Q	D	K	R
Grise-IIb	M	T	A	P	W	A	A	-	L	A	L	W	G	S	L	C	V	G	S	G	R	G	E	A	E	T	R	E	C	I	V	Y	N	A	N	W	E	L	E	R	T	N	Q	S	G	L	E	R	-	C	E	G	E	Q	D	K	R
Murint IIb	M	T	A	P	W	A	A	-	L	A	L	W	G	S	L	C	A	G	S	G	R	G	E	A	E	T	R	E	C	I	V	Y	N	A	N	W	E	L	E	R	T	N	Q	S	G	L	E	R	-	C	E	G	E	Q	D	K	R
Humant IIb	M	T	A	P	W	V	A	-	L	A	L	W	G	S	L	C	A	G	S	G	R	G	E	A	E	T	R	E	C	I	V	Y	N	A	N	W	E	L	E	R	T	N	Q	S	G	L	E	R	-	C	E	G	E	Q	D	K	R
Bovint IIb	M	T	A	P	W	A	A	-	L	A	L	W	G	S	L	C	A	G	S	G	R	G	E	A	E	T	R	E	C	I	V	Y	N	A	N	W	E	L	E	R	T	N	Q	S	G	L	E	R	-	C	E	G	E	Q	D	K	R
Xenopus IIb	M	G	A	S	V	A	L	T	F	L	L	L	A	T	F	R	A	G	S	G	H	D	E	V	E	T	R	E	C	I	V	Y	N	A	N	W	E	L	E	K	T	N	Q	S	G	V	E	R	L	V	E	G	K	K	D	K	R
Humant IIA	M	G	A	A	K	L	A	F	A	V	F	L	I	S	C	S	S	G	A	L	I	G	R	S	E	T	R	E	C	L	F	F	N	A	N	W	E	K	D	R	T	N	Q	T	G	V	E	P	-	C	Y	G	D	K	D	K	R
Consensus	M	G	A	P	W	A	A	X	F	A	L	W	G	S	L	C	A	G	S	G	R	G	E	A	E	T	R	E	C	I	V	Y	N	A	N	W	E	L	E	R	T	N	Q	S	G	L	E	R	L	C	E	G	E	Q	D	K	R

60

70

80

90

100

110

Rotte-IIb	L	H	C	Y	A	S	W	R	N	S	S	G	T	E	L	V	K	K	G	C	W	L	D	D	F	N	C	Y	D	R	Q	E	C	V	A	T	E	E	N	P	Q	V	Y	F	C	C	C	E	G	N	F	C	N	E	R	F	T
Grise-IIb	L	H	C	Y	A	S	W	R	N	S	S	G	T	E	L	V	K	K	G	C	W	L	D	D	F	N	C	Y	D	R	Q	E	C	V	A	T	E	E	N	P	Q	V	Y	F	C	C	C	E	G	N	F	C	N	E	R	F	T
Murint IIb	L	H	C	Y	A	S	W	R	N	S	S	G	T	E	L	V	K	K	G	C	W	L	D	D	F	N	C	Y	D	R	Q	E	C	V	A	T	E	E	N	P	Q	V	Y	F	C	C	C	E	G	N	F	C	N	E	R	F	T
Humant IIb	L	H	C	Y	A	S	W	R	N	S	S	G	T	E	L	V	K	K	G	C	W	L	D	D	F	N	C	Y	D	R	Q	E	C	V	A	T	E	E	N	P	Q	V	Y	F	C	C	C	E	G	N	F	C	N	E	R	F	T
Bovint IIb	L	H	C	Y	A	S	W	R	N	S	S	G	T	E	L	V	K	K	G	C	W	L	D	D	F	N	C	Y	D	R	Q	E	C	V	A	T	E	E	N	P	Q	V	Y	F	C	C	C	E	G	N	F	C	N	E	R	F	T
Xenopus IIb	L	H	C	Y	A	S	W	R	N	S	S	G	T	E	L	V	K	K	G	C	W	L	D	D	F	N	C	Y	D	R	Q	E	C	V	A	T	E	E	N	P	Q	V	Y	F	C	C	C	E	G	N	F	C	N	E	R	F	T
Humant IIA	R	H	C	F	A	T	W	K	N	I	S	G	S	E	I	V	K	K	G	C	W	L	D	D	I	N	C	Y	D	R	T	D	C	V	E	K	K	D	S	P	E	V	Y	F	C	C	C	E	G	N	M	C	N	E	K	F	S
Consensus	L	H	C	Y	A	S	W	R	N	S	S	G	T	E	L	V	K	K	G	C	W	L	D	D	F	N	C	Y	D	R	Q	E	C	V	A	T	E	E	N	P	Q	V	Y	F	C	C	C	E	G	N	F	C	N	E	R	F	T

120

130

140

150

Rotte-IIb	H	L	P	E	A	G	G	P	E	V	T	Y	E	P	-	P	P	T	A	P	T	L	L	T	V	L	A	Y	S	L	L	P	I	G	G	L	S	-																								
Grise-IIb	H	L	P	E	A	G	G	P	E	V	T	Y	E	P	-	P	P	T	A	P	T	L	L	T	V	L	A	Y	S	L	L	P	I	G	G	L	S	-																								
Murint IIb	H	L	P	E	A	G	G	P	E	V	T	Y	E	P	-	P	P	T	A	P	T	L	L	T	V	L	A	Y	S	L	L	P	I	G	G	L	S	-																								
Humant IIb	H	L	P	E	A	G	G	P	E	V	T	Y	E	P	-	P	P	T	A	P	T	L	L	T	V	L	A	Y	S	L	L	P	I	G	G	L	S	-																								
Bovint IIb	H	L	P	E	A	G	G	P	E	V	T	Y	E	P	-	P	P	T	A	P	T	L	L	T	V	L	A	Y	S	L	L	P	I	G	G	L	S	-																								
Xenopus IIb	H	L	P	E	V	-	-	-	E	T	F	D	K	P	Q	P	S	A	S	V	L	N	I	L	L	Y	S	L	L	P	I	V	G	L	S	M	-																									
Humant IIA	Y	F	P	E	M	E	V	T	Q	P	T	S	N	P	-	V	T	P	K	P	P	Y	N	I	L	L	Y	S	L	L	P	I	V	G	L	S	M	-																								
Consensus	H	L	P	E	X	G	G	P	E	V	T	Y	E	P	-	P	P	T	A	P	T	L	L	T	V	L	A	Y	S	L	L	P	I	G	G	L	S	M	-																							

Figur 13