(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120058907 A
(43)申请公布日 2025.05.30

(21)申请号 202510217740.9

(22)申请日 2019.01.11

(30)优先权数据
62/616991 2018.01.12 US
62/702747 2018.07.24 US

(62)分案原申请数据
201980018774.8 2019.01.11

(71)申请人 科乐斯疗法公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 J·S·西拉 J·拉基

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 权陆军 彭昶

(51)Int.Cl.
C07K 14/71(2006.01)

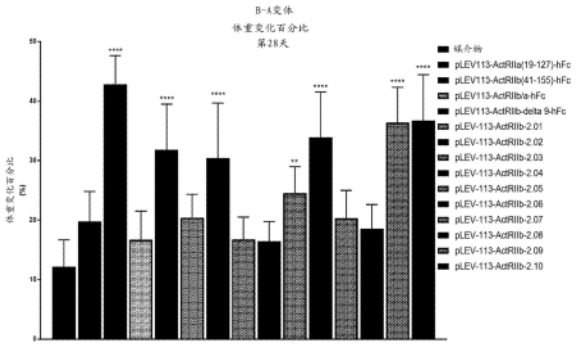
权利要求书1页 说明书59页
序列表（电子公布） 附图20页

(54)发明名称

激活素受体IIB型变体及其使用方法

(57)摘要

本发明涉及激活素受体IIB型变体及其使用方法。本发明的特征在于包括细胞外ActRIIB变体的多肽。在一些实施方案中,本发明的多肽包括与Fc结构域单体或部分融合的细胞外ActRIIB变体。本发明的特点还在于使用该多肽治疗涉及肌无力和萎缩、骨损伤、低红血细胞水平(例如贫血或失血)、纤维化和/或肺性高血压症的疾病和状况的药物组合物和方法。



CN 120058907 A

1.一种包含细胞外激活素受体IIB型(ActRIIB)变体的多肽,所述变体具有相对于

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDF
NCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT (SEQ ID NO: 17),

的序列的一个或多个氨基酸取代,其中所述变体包含赋予相对于野生型细胞外ActRIIB的减少的BMP9结合的一个或多个氨基酸取代和一个或多个另外的氨基酸取代,其中减少BMP9结合的所述取代包含以下中的一个或多个:

a)氨基酸取代E75K;

b)氨基酸取代Q69T和E70D;或

c)氨基酸取代Q69D和E70T。

激活素受体IIB型变体及其使用方法

[0001] 本申请是国际申请日为2019年1月11日的国际申请PCT/US2019/013329进入中国、申请号为201980018774.8的题为“激活素受体IIB型变体及其使用方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 技术领域和背景技术

杜兴氏肌营养不良症(DMD)、面肩肱型肌营养不良症(FSHD)、包涵体肌炎(IBM)和肌萎缩侧索硬化症(ALS)是肌肉疾病的实例,所述肌肉疾病涉及肌无力和萎缩和/或控制自主肌肉运动的运动神经元。DMD由X连锁的肌营养不良蛋白基因中的突变引起,并且特征在于所有骨骼肌中的进行性肌肉变性和无力。FSHD特别影响面部、肩膀、上臂和小腿的骨骼肌。IBM是炎症性肌肉疾病,其主要影响大腿肌肉以及控制手指和手腕屈曲的手臂肌肉。ALS是运动神经元疾病,其特征在于由于运动神经元变性的全身肌肉僵硬、肌肉抽搐和肌肉萎缩。改善患有这些破坏性肌肉疾病的受试者的治疗和存活的努力尚未成功。

[0003] 健康的骨骼经历不断的重塑,其涉及骨破坏和骨生长两者。骨生长由成骨细胞类型介导,而破骨细胞重吸收骨骼。当这些系统通过合成代谢程序的下调、分解代谢系统的上调或两者的组合而失去平衡时,发生病理状况,导致净骨损失。因此,控制骨重塑的平衡可以用于促进骨损伤的愈合和与骨量丧失和骨脱矿物质有关的病症如骨质疏松症的治疗。

[0004] 骨损伤可以起因于一系列根本原因,包括年龄或癌症相关的骨损失、遗传状况或药物治疗的不良副作用。世界卫生组织(World Health Organization)估计,仅骨质疏松症就影响了美国、欧洲和日本的7500万人,并且是骨损伤的重要风险因素。一般而言,整个骨损失代表对于其存在少数有效治疗的病理状态。相反,治疗集中于固定、锻炼和饮食调制,而不是直接促进骨生长和增加骨密度的试剂。就骨质疏松症而言,雌激素、降钙素、骨钙素与维生素K或高剂量的饮食钙都可用作治疗干预措施。骨质疏松症的其它治疗方法包括双膦酸盐、甲状旁腺激素、甲状旁腺激素相关蛋白(PTHrP)、拟钙剂、他汀类药物、合成代谢类固醇、镧和锶盐和氟化钠。然而,此类治疗剂经常与不期望的副作用有关。

[0005] 纤维化是器官或组织中过量结缔组织的形成。可以响应损伤(例如损害)或作为免疫应答(例如炎症应答)的部分而形成的结缔组织,可以破坏它在其中形成的器官或组织的结构和功能,导致组织硬度中的增加。纤维化可以在体内的许多器官和组织中发生,尤其包括肺(例如肺纤维化、囊性纤维化)、肝(例如肝硬化)、心脏(例如心内膜心肌纤维化或心肌梗死后纤维化)、大脑(例如胶质细胞疤痕形成)、皮肤(例如瘢痕疙瘩形成)、肾(例如肾纤维化)和眼(例如角膜纤维化);并且已知与某些药物治疗(例如化学疗法、放射疗法和手术)有关。存在用于纤维化患者的有限治疗选项,并且大多数治疗集中于改善生活质量或暂时减慢疾病进展。

[0006] 贫血是全球性的健康问题,具有影响发病率和死亡率两者的健康牵涉。仅在美国,贫血的患病率从2003年到2012年几乎倍增。贫血的症状包括疲劳、虚弱、呼吸急促、心悸和认知能力下降,并且已发现儿童、孕妇、育龄妇女和老年人具有发展贫血的最高风险。贫血的最常见形式是缺铁性贫血,但贫血也可以由慢性疾病、失血和红血细胞破坏引起。虽然缺铁性贫血可以用铁补充进行治疗,但许多其它形式的贫血,例如再生障碍性贫血、慢性疾病

性贫血和溶血性贫血可能需要输血。

[0007] 肺性高血压症(PH)是特征在于肺与心脏之间的血管中的压力高于正常压力的严重状况。PH可以分类成五种主要类型:动脉(PAH)、静脉(继发于左侧心脏病的PH)、低氧(由肺病引起的PH)、血栓栓塞(由慢性动脉阻塞例如血块引起的PH)、或杂项的(具有不明确或多因素机制的PH),也称为WHO I-V类。PAH的特征在于由于瘢痕形成,在肺中的小血管阻塞或狭窄引起的肺血管压力增加。这导致对通过肺的血流的阻力增加,并且迫使心脏的右侧更努力工作,这可以导致心力衰竭、血液氧合减少和预期寿命缩短。PAH可以是特发性的(例如没有可查明的原因),可遗传的(例如家族性的,经常是由于遗传突变),或可能与药物使用(例如甲基苯丙胺或可卡因使用)、感染(例如HIV感染或血吸虫病)、肝硬化、先天性心脏异常、或结缔组织/自身免疫性病症(例如硬皮病或狼疮)相关。关于PH的治疗包括血管扩张剂、抗凝剂和补充供氧,但这些治疗管理疾病症状,而不是靶向引起疾病的生物学机制。

[0008] 存在用于肌肉疾病、骨疾病、贫血、纤维化和PH的新型且有效的治疗的需要。

发明内容

本发明的特征在于包括细胞外激活素受体IIB型(ActRIIB)变体的多肽。在一些实施方案中,本发明的多肽包括与Fc结构域单体或另一部分的N末端或C末端融合的细胞外ActRIIB变体。此类部分可以通过氨基酸或其它共价键附着,并且可以增加多肽的稳定性。包括与Fc结构域单体融合的细胞外ActRIIB变体的多肽还可以通过两个Fc结构域单体之间的相互作用形成二聚体(例如同二聚体或异二聚体)。本发明的多肽可以用于增加患有疾病或状况或处于发展疾病或状况的风险中的受试者中的肌重量和强度,所述疾病或状况涉及肌无力和萎缩,例如杜兴氏肌营养不良症(DMD)、面肩肱型肌营养不良症(FSHD)、包涵体肌炎(IBM)、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、肌少症或癌症恶病质。本发明的多肽还可以用于增加患有疾病或状况或处于发展疾病或状况的风险中的受试者中的骨量或骨矿物质密度,所述疾病或状况涉及骨损伤,例如原发性骨质疏松症、继发性骨质疏松症、骨质减少症、骨硬化症、骨折、骨癌或与癌症转移相关的骨损失、佩吉特氏病、肾性骨营养不良、治疗相关的骨损失、饮食相关的骨损失、肥胖治疗有关的骨损失、低重力相关的骨损失或固定。另外,本发明的多肽可以用于增加有此需要的受试者中的红血细胞水平(例如增加血红蛋白水平、增加血细胞比容和/或增加红血细胞计数),所述受试者例如患有贫血或失血或处于发展贫血或失血的风险中的受试者,以预防或减少患有纤维化或处于发展纤维化的风险中的受试者中的纤维化,或治疗、预防或延迟患有肺性高血压症(例如动脉、静脉、低氧、血栓栓塞或杂项肺性高血压症)或处于发展肺性高血压症的风险中的受试者中的肺性高血压症的发展或进展。进一步地,本发明的多肽还可以用于影响具有发展疾病或状况的风险或患有疾病或状况的受试者中的肌肉生长抑制素、激活素和/或骨形态生成蛋白9(BMP9)信号传导,所述疾病或状况涉及肌无力和萎缩、骨损伤或骨脱矿物质、低血细胞水平(例如低血红蛋白水平、低血细胞比容和/或低红血细胞计数)、纤维化或肺性高血压症(例如动脉、静脉、低氧、血栓栓塞或杂项肺性高血压症)。

[0010] 在第一个方面,本发明的特征在于含有细胞外ActRIIB变体的多肽,所述细胞外ActRIIB变体具有相对于

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT (SEQ ID NO: 17)

的序列的一个或多个氨基酸取代,其中所述变体含有赋予相对于野生型细胞外ActRIIB减少的BMP9结合的一个或多个氨基酸取代和一个或多个另外的氨基酸取代,其中减少BMP9结合的取代是以下中的一个或多个:(a)氨基酸取代E75K;(b)氨基酸取代Q69T和E70D;或(c)氨基酸取代Q69D和E70T。

[0011] 在一些实施方案中,一个或多个另外的氨基酸取代选自I11L、Y12F、L19K、E20D、S25T、L27V、R29P、E31Y、E33D、Q34K、L38R、Y41F、R45K、S47I、S48T、T50S、I51L、L53I、K56Q、F63I、T74K、E76D、N77S、Q79E和F89M。

[0012] 在一些实施方案中,变体含有氨基酸取代E75K以及另外的氨基酸取代E20D和F63I。

[0013] 在一些实施方案中,变体含有氨基酸取代E75K和减少BMP9结合的另外的氨基酸取代。在任何上述方面的一些实施方案中,减少BMP9结合的另外的氨基酸取代是T74K、E76D、N77S和Q79E。

[0014] 在一些实施方案中,变体进一步含有一个或多个另外的氨基酸取代。

[0015] 在一些实施方案中,变体含有另外的氨基酸取代Y41F、R45K和K56Q。在一些实施方案中,变体进一步含有另外的氨基酸取代Y12F、L19K、E20D、R29P、E31Y、E33D、L38R和F63I。

[0016] 在一些实施方案中,变体含有另外的氨基酸取代S25T和S47I。在一些实施方案中,变体含有另外的氨基酸取代S48T。

[0017] 在一些实施方案中,变体含有另外的氨基酸取代R29P。

[0018] 在一些实施方案中,变体含有另外的氨基酸取代E31Y、E33D和Q34K。

[0019] 在一些实施方案中,变体含有另外的氨基酸取代Y12F、L19K和E20D。

[0020] 在一些实施方案中,变体含有另外的氨基酸取代E31Y、E33D和L38R。

[0021] 在一些实施方案中,变体含有氨基酸取代Q69T和E70D,和另外的氨基酸取代I11L、L27V、Q34K、T50S、I51L、L53I和F89M。

[0022] 在一些实施方案中,变体含有氨基酸取代Q69D和E70T,和另外的氨基酸取代I11L、L27V、Q34K、T50S、I51L、L53I和F89M。

[0023] 在一些实施方案中,变体进一步含有氨基酸取代E75K。

[0024] 下文的实施方案E1至E59描述了本发明的其它特点。

[0025] E1.含有ActRIIB变体的多肽,所述变体具有以下序列:

GRGEAETRECX$_1$X$_2$YNANWEX$_3$X$_4$RTNQX$_5$GX$_6$EX$_7$CX$_8$GX$_9$X$_{10}$DKRX$_{11}$HCX$_{12}$ASWX$_{13}$NX$_{14}$X$_{15}$GX$_{16}$X$_{17}$EX$_{18}$VKX$_{19}$GCWLDDX$_{20}$NCYDRX$_{21}$X$_{22}$CVAX$_{23}$X$_{24}$X$_{25}$X$_{26}$PX$_{27}$VYFCCCEGNX$_{28}$CNERFTHLPEAGGPEVTYEPP
PTAPT (SEQ ID NO: 1),其中X$_1$是I或L;X$_2$是F或Y;X$_3$是L或K;X$_4$是D或E;X$_5$是T或S;X$_6$是L或V;X$_7$是P或R;X$_8$是Y或E;X$_9$是D或E;X$_{10}$是K或Q;X$_{11}$是R或L;X$_{12}$是Y或F;X$_{13}$是R或K;X$_{14}$是S或I;X$_{15}$是S或T;X$_{16}$是S或T;X$_{17}$是I或L;X$_{18}$是I或L;X$_{19}$是K或Q;X$_{20}$是F或I;X$_{21}$是Q、T或D;X$_{22}$是E、D或T;X$_{23}$是K或T;X$_{24}$是K或E;X$_{25}$是D或E;X$_{26}$是S或N;X$_{27}$是E或Q;并且X$_{28}$是F或M,并且其中X$_{24}$是E和/或X$_{21}$是T且X$_{22}$是D或X$_{21}$是D且X$_{22}$是T。

[0026] E2.E1的变体,其中X$_1$是I。

[0027] E3.E1的变体,其中X$_1$是L。

[0028] E4.E1-E3中任何一个的变体,其中X_2是F。

[0029] E5.E1-E3中任何一个的变体,其中X_2是Y。

[0030] E6.E1-E5中任何一个的变体,其中X_3是L。

[0031] E7.E1-E5中任何一个的变体,其中X_3是K。

[0032] E8.E1-E7中任何一个的变体,其中X_4是D。

[0033] E9.E1-E7中任何一个的变体,其中X_4是E。

[0034] E10.E1-E9中任何一个的变体,其中X_5是T。

[0035] E11.E1-E9中任何一个的变体,其中X_5是S。

[0036] E12.E1-E11中任何一个的变体,其中X_6是L。

[0037] E13.E1-E11中任何一个的变体,其中X_6是V。

[0038] E14.E1-E13中任何一个的变体,其中X_7是P。

[0039] E15.E1-E13中任何一个的变体,其中X_7是R。

[0040] E16.E1-E15中任何一个的变体,其中X_8是Y。

[0041] E17.E1-E15中任何一个的变体,其中X_8是E。

[0042] E18.E1-E17中任何一个的变体,其中X_9是D。

[0043] E19.E1-E17中任何一个的变体,其中X_9是E。

[0044] E20.E1-E19中任何一个的变体,其中X_{10}是K。

[0045] E21.E1-E19中任何一个的变体,其中X_{10}是Q。

[0046] E22.E1-E21中任何一个的变体,其中X_{11}是R。

[0047] E23.E1-E21中任何一个的变体,其中X_{11}是L。

[0048] E24.E1-E23中任何一个的变体,其中X_{12}是Y。

[0049] E25.E1-E23中任何一个的变体,其中X_{12}是F。

[0050] E26.E1-E25中任何一个的变体,其中X_{13}是R。

[0051] E27.E1-E25中任何一个的变体,其中X_{13}是K。

[0052] E28.E1-E27中任何一个的变体,其中X_{14}是S。

[0053] E29.E1-E27中任何一个的变体,其中X_{14}是I。

[0054] E30.E1-E29中任何一个的变体,其中X_{15}是S。

[0055] E31.E1-E29中任何一个的变体,其中X_{15}是T。

[0056] E32.E1-E31中任何一个的变体,其中X_{16}是S。

[0057] E33.E1-E31中任何一个的变体,其中X_{16}是T。

[0058] E34.E1-E33中任何一个的变体,其中X_{17}是I。

[0059] E35.E1-E33中任何一个的变体,其中X_{17}是L。

[0060] E36.E1-E35中任何一个的变体,其中X_{18}是I。

[0061] E37.E1-E35中任何一个的变体,其中X_{18}是L。

[0062] E38.E1-E37中任何一个的变体,其中X_{19}是K。

[0063] E39.E1-E37中任何一个的变体,其中X_{19}是Q。

[0064] E40.E1-E39中任何一个的变体,其中X_{20}是F。

[0065] E41.E1-E39中任何一个的变体,其中X_{20}是I。

[0066] E42.E1-E41中任何一个的变体,其中X_{21}是Q。

[0067] E43.E1-E41中任何一个的变体,其中X_{21}是T。

[0068] E44.E1-E41中任何一个的变体,其中X_{21}是D。

[0069] E45.E1-E42中任何一个的变体,其中X_{22}是E。

[0070] E46.E1-E41和E43中任何一个的变体,其中X_{22}是D。

[0071] E47.E1-E41和E44中任何一个的变体,其中X_{22}是T。

[0072] E48.E1-E47中任何一个的变体,其中X_{23}是K。

[0073] E49.E1-E47中任何一个的变体,其中X_{23}是T。

[0074] E50.E1-E49中任何一个的变体,其中X_{24}是K。

[0075] E51.E1-E41、E43、E44、E46和E47-E49中任何一个的变体,其中X_{24}是E。

[0076] E52.E1-E51中任何一个的变体,其中X_{25}是D。

[0077] E53.E1-E51中任何一个的变体,其中X_{25}是E。

[0078] E54.E1-E53中任何一个的变体,其中X_{26}是S。

[0079] E55.E1-E53中任何一个的变体,其中X_{26}是N。

[0080] E56.E1-E55中任何一个的变体,其中X_{27}是E。

[0081] E57.E1-E55中任何一个的变体,其中X_{27}是Q。

[0082] E58.E1-E57中任何一个的变体,其中X_{28}是F。

[0083] E59.E1-E57中任何一个的变体,其中X_{28}是M。

[0084] 在一些实施方案中,变体具有SEQ ID NO:2-15中任何一个的序列。

[0085] 在一些实施方案中,多肽进一步包括通过接头与多肽的C末端(例如变体的C末端)融合的Fc结构域单体。在一些实施方案中,Fc结构域单体具有SEQ ID NO:19的序列。在一些实施方案中,多肽形成二聚体。

[0086] 在一些实施方案中,多肽进一步包括通过接头与多肽的C末端(例如变体的C末端)融合的野生型Fc结构域。在一些实施方案中,野生型Fc结构域具有SEQ ID NO:71的序列。

[0087] 在一些实施方案中,多肽进一步包括具有氨基酸取代的Fc结构域,所述Fc结构域通过接头与多肽的C末端(例如变体的C末端)融合。在一些实施方案中,Fc结构域不形成二聚体。

[0088] 在一些实施方案中,多肽进一步包括通过接头与多肽的C末端(例如变体的C末端)融合的白蛋白结合肽。在一些实施方案中,白蛋白结合肽具有SEQ ID NO:72的序列。

[0089] 在一些实施方案中,多肽进一步包括通过接头与多肽的C末端(例如变体的C末端)融合的纤连蛋白结构域。在一些实施方案中,纤连蛋白结构域具有SEQ ID NO:73的序列。

[0090] 在一些实施方案中,多肽进一步包括通过接头与多肽的C末端(例如变体的C末端)融合的人血清白蛋白。在一些实施方案中,人血清白蛋白具有SEQ ID NO:74的序列。

[0091] 在一些实施方案中,接头是氨基酸间隔物。在任何上述方面的一些实施方案中,氨基酸间隔物是GGG、GGGA(SEQ ID NO:20)、GGGG(SEQ ID NO:22)、GGGAG(SEQ ID NO:52)、GGGAGG(SEQ ID NO:53)、或GGGAGGG(SEQ ID NO:54)。

[0092] 在一些实施方案中,氨基酸间隔物是GA、GS、GG、GGA、GGS、GGG、GGGS(SEQ ID NO:21)、GGGGA(SEQ ID NO:23)、GGGGS(SEQ ID NO:24)、GGGGG(SEQ ID NO:25)、GGAG(SEQ ID NO:26)、GGSG(SEQ ID NO:27)、AGGG(SEQ ID NO:28)、SGGG(SEQ ID NO:29)、GAGA(SEQ ID NO:30)、GSGS(SEQ ID NO:31)、GAGAGA(SEQ ID NO:32)、GSGSGS(SEQ ID NO:33)、GAGAGAGA

(SEQ ID NO:34)、GSGSGSGS(SEQ ID NO:35)、GAGAGAGAGA(SEQ ID NO:36)、GSGSGSGSGS(SEQ ID NO:37)、GAGAGAGAGAGA(SEQ ID NO:38)、GSGSGSGSGSGS(SEQ ID NO:39)、GGAGGA(SEQ ID NO:40)、GGSGGS(SEQ ID NO:41)、GGAGGAGGA(SEQ ID NO:42)、GGSGGSGGS(SEQ ID NO:43)、GGAGGAGGAGGA(SEQ ID NO:44)和GGSGGSGGSGGS(SEQ ID NO:45)、GGAGGGAG(SEQ ID NO:46)、GGSGGGSG(SEQ ID NO:47)、GGAGGGAGGGAG(SEQ ID NO:48)和GGSGGGSGGGSG(SEQ ID NO:49)、GGGGAGGGGAGGGGA(SEQ ID NO:50)、GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:51)、AAAL(SEQ ID NO:55)、AAAK(SEQ ID NO:56)、AAAR(SEQ ID NO:57)、EGKSSGSGSESKST(SEQ ID NO:58)、GSAGSAAGSGEF(SEQ ID NO:59)、AEAAAKEAAAKA(SEQ ID NO:60)、KESGSVSSEQLAQFRSLD(SEQ ID NO:61)、GENLYFQSGG(SEQ ID NO:62)、SACYCELS(SEQ ID NO:63)、RSIAT(SEQ ID NO:64)、RPACKIPNDLKQKVMNH(SEQ ID NO:65)、GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG(SEQ ID NO:66)、AAANSSIDLISVPVDSR(SEQ ID NO:67)、GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS(SEQ ID NO:68)、EAAAK(SEQ ID NO:69)、或PAPAP(SEQ ID NO:70)。

[0093] 在一些实施方案中,多肽具有至少七天的血清半衰期。

[0094] 在一些实施方案中,与野生型ActRIIB相比,多肽具有增加或减少的与一种或多种ActRIIB配体(例如激活素、肌肉生长抑制素、GDF-11或BMP9)的结合。

[0095] 在一些实施方案中,多肽以200pM或更高的K_D与人骨形态生成蛋白9(BMP9)结合。

[0096] 在一些实施方案中,多肽与激活素和/或肌肉生长抑制素结合,并且具有与人BMP9减少的结合或弱结合。

[0097] 在一些实施方案中,多肽基本上不与人BMP9结合。

[0098] 在一些实施方案中,多肽以800pM或更小的K_D与人激活素A结合。

[0099] 在一些实施方案中,多肽以800pM或更小的K_D与人激活素B结合。

[0100] 在一些实施方案中,多肽以5pM或更高的K_D与人GDF-11结合。

[0101] 在另一个方面,本发明的特征在于编码本文所述的多肽(例如包括具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体的多肽)的核酸分子。

[0102] 在另一个方面,本发明的特征在于包括本文所述的核酸分子的载体。

[0103] 在另一个方面,本发明的特征在于表达本文所述的多肽的宿主细胞,其中所述宿主细胞包括在前两个方面所述的核酸分子或载体,其中所述核酸分子或载体在宿主细胞中表达。

[0104] 在另一个方面,本发明的特征在于制备本文所述的多肽的方法,其中所述方法包括:a)提供包含本文所述的核酸分子或载体的宿主细胞,并且b)在允许多肽形成的条件下,在宿主细胞中表达核酸分子或载体。

[0105] 在另一个方面,本发明的特征在于药物组合物,其包括本文所述的多肽、核酸分子或载体,和一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂。在药物组合物的一些实施方案中,多肽、核酸分子或载体为治疗有效量。

[0106] 在另一个方面,本发明的特征在于包括两个等同多肽的构建体(例如同二聚体),所述多肽各自包括与Fc结构域单体(例如SEQ ID NO:19的序列)的N末端或C末端融合的本文所述的细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的ActRIIB变体)。两个多肽中的两个Fc结构域单体相互作用,以在构建体中形成

Fc结构域。

[0107] 在另一个方面,本发明的特征在于包括两个不同多肽的构建体(例如异二聚体),所述多肽各自包括与Fc结构域单体(例如SEQ ID NO:19的序列)的N末端或C末端融合的本文所述的细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的ActRIIB变体)。两个多肽中的两个Fc结构域单体相互作用,以在构建体中形成Fc结构域。

[0108] 在另一个方面,本发明的特征在于增加有此需要的受试者中的瘦体重的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物。

[0109] 在另一个方面,本发明的特征在于增加有此需要的受试者中的肌重量的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物。

[0110] 在增加受试者中的瘦体重或肌重量的方法的一些实施方案中,受试者患有以下疾病或处于发展以下疾病的风险中:杜兴氏肌营养不良症(DMD)、面肩肱型肌营养不良症(FSHD)、包涵体肌炎(IBM)、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、肌少症或癌症恶病质。

[0111] 在另一个方面,本发明的特征在于治疗患有肌肉疾病或处于发展肌肉疾病的风险中的受试者的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物。在一些实施方案中,肌肉疾病是DMD、FSHD、IBM、ALS、肌少症或癌症恶病质。

[0112] 在另一个方面,本发明的特征在于影响患有疾病或状况或处于发展疾病或状况的风险中的受试者中的肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导(例如减少或抑制肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9与其内源性受体的结合)的方法,所述疾病或状况涉及肌无力和萎缩,其中所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物。在这个方面的一些实施方案中,疾病或状况是DMD、FSHD、IBM、ALS、肌少症或癌症恶病质。

[0113] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来治疗患有DMD或处于发展DMD的风险中的受试者的方法。

[0114] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来治疗患有FSHD或处于发展FSHD的风险中的受试者的方法。

[0115] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来治疗患有IBM或处于发展IBM的风险中的受试者的方法。

[0116] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来治疗患有ALS或处于发展ALS的风险中的受试者的方法。

[0117] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来治疗患有肌少症或处于发展肌少症的风

险中的受试者的方法。

[0118] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来治疗患有癌症恶病质或处于发展癌症恶病质的风险中的受试者的方法。

[0119] 在另一个方面,本发明的特征在于增加有此需要的受试者中的骨矿物质密度的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物。

[0120] 在另一个方面,本发明的特征在于减少有此需要的受试者中的骨再吸收的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物。

[0121] 在另一个方面,本发明的特征在于增加有此需要的受试者中的骨形成的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物。

[0122] 在另一个方面,本发明的特征在于增加有此需要的受试者中的骨强度的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物。

[0123] 在另一个方面,本发明的特征在于减少有此需要的受试者中的骨折风险的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物。

[0124] 在任何上述方面的一些实施方案中,受试者患有以下疾病或处于发展以下疾病的风险中:原发性骨质疏松症、继发性骨质疏松症、骨质减少症、骨硬化症、骨折、骨癌或与癌症转移相关的骨损失、佩吉特氏病、肾性骨营养不良、治疗相关的骨损失、饮食相关的骨损失、肥胖治疗有关的骨损失、低重力相关的骨损失或固定相关的骨损失。在一些实施方案中,受试者患有骨质疏松症或处于发展骨质疏松症的风险中。

[0125] 在另一个方面,本发明的特征在于治疗患有骨疾病或处于发展骨疾病的风险中的受试者的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物。在一些实施方案中,骨疾病是原发性骨质疏松症、继发性骨质疏松症、骨质减少症、骨硬化症、骨折、骨癌或与癌症转移相关的骨损失、佩吉特氏病、肾性骨营养不良、治疗相关的骨损失、饮食相关的骨损失、肥胖治疗有关的骨损失、低重力相关的骨损失或固定相关的骨损失。在一些实施方案中,骨疾病是骨质疏松症。

[0126] 在另一个方面,本发明的特征在于影响患有疾病或状况或处于发展疾病或状况的风险中的受试者中的肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导(例如减少或抑制肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9与其内源性受体的结合)的方法,所述疾病或状况涉及骨损伤,其中所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物。在这个方面的一些实施方案中,疾病或状况是原发性骨质疏松症、继发性骨质疏松症、骨质减少症、骨硬化症、骨折、骨癌或与癌症转移相关的骨损失、佩吉特氏病、肾性骨营养不良、治疗相关的骨损失、饮食相关的骨损失、肥胖治疗有关的骨损失、低重力相关的骨损失或固定相关的骨损失。在一些实施方案中,骨疾病或状况是骨质疏松症。

[0127] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多

肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来治疗患有原发性骨质疏松症或处于发展原发性骨质疏松症的风险中的受试者的方法。

[0128] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来治疗患有继发性骨质疏松症或处于发展继发性骨质疏松症的风险中的受试者的方法。

[0129] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来治疗患有骨质减少症或处于发展骨质减少症的风险中的受试者的方法。

[0130] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来治疗患有骨折或处于发展骨折的风险中的受试者的方法。

[0131] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来治疗患有骨癌或与癌症转移相关的骨损失或处于发展骨癌或与癌症转移相关的骨损失的风险中的受试者的方法。

[0132] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来治疗患有佩吉特氏病或处于发展佩吉特氏病的风险中的受试者的方法。

[0133] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来治疗患有肾性骨营养不良或处于发展肾性骨营养不良的风险中的受试者的方法。

[0134] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来治疗患有治疗相关的骨损失或处于发展治疗相关的骨损失的风险中的受试者的方法。

[0135] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来治疗患有饮食相关的骨损失或处于发展饮食相关的骨损失的风险中的受试者的方法。

[0136] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来治疗患有低重力相关的骨损失或处于发展低重力相关的骨损失的风险中的受试者的方法。

[0137] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来治疗患有固定相关的骨损失或处于发展固定相关的骨损失的风险中的受试者的方法。

[0138] 在任何上述方面的一些实施方案中,原发性骨质疏松症是与年龄相关的骨质疏松症或与激素相关的骨质疏松症。

[0139] 在任何上述方面的一些实施方案中,继发性骨质疏松症是固定诱导的骨质疏松症或糖皮质激素诱导的骨质疏松症。

[0140] 在任何上述方面的一些实施方案中,癌症是多发性骨髓瘤。

[0141] 在任何上述方面的一些实施方案中,治疗是FGF-21治疗、GLP-1治疗、癌症疗法、或用于肥胖或2型糖尿病的治疗。

[0142] 在任何上述方面的一些实施方案中,饮食相关的骨损失是佝偻病。

[0143] 在任何上述方面的一些实施方案中,受试者处于骨折的风险中。

[0144] 在任何上述方面的一些实施方案中,该方法增加受试者中的骨形成。在任何上述方面的一些实施方案中,该方法减少受试者中的骨再吸收。在任何上述方面的一些实施方案中,该方法减少受试者中的骨损失。在任何上述方面的一些实施方案中,该方法增加成骨细胞活性或成骨细胞生成。在任何上述方面的一些实施方案中,该方法减少破骨细胞活性或减少破骨细胞生成。在任何上述方面的一些实施方案中,该方法减少骨折的风险。在任何上述方面的一些实施方案中,该方法增加骨强度。

[0145] 在任何上述方面的一些实施方案中,骨是皮质骨。在任何上述方面的一些实施方案中,骨是小梁骨。

[0146] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来减少或预防有此需要的受试者中的纤维化的方法。

[0147] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来减慢或抑制有此需要的受试者中的纤维化进展的方法。

[0148] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来减少有此需要的受试者中发展纤维化的风险的方法。

[0149] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来治疗患有纤维化或处于发展纤维化的风险中的受试者的方法。

[0150] 在任何上述方面的一些实施方案中,纤维化是化学治疗药物诱导的纤维化、放射诱导的纤维化、肺纤维化、肝纤维化、肾纤维化(例如与慢性肾疾病相关的纤维化)、角膜纤维化、心脏纤维化、骨髓纤维化、纵隔纤维化、腹膜后纤维化、关节纤维化、骨关节纤维化、组织纤维化、肿瘤基质、促纤维增生性肿瘤、手术粘连、肥厚性瘢痕或瘢痕疙瘩。

[0151] 在上述方面的一些实施方案中,纤维化是与以下有关的纤维化:伤口、烧伤、乙型或丙型肝炎感染、脂肪肝疾病、血吸虫感染、肾疾病(例如慢性肾疾病)、心脏病、黄斑变性、克罗恩氏病、视网膜或玻璃体视网膜病变、全身性或局限性硬皮病、动脉粥样硬化或再狭窄。在任何上述方面的一些实施方案中,纤维化起因于慢性肾疾病。

[0152] 在另一个方面,本发明的特征在于影响受试者中的肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导(例如减少或抑制肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9与其内源性受体的结合)的方法,所述受试者患有纤维化或处于发展纤维化的风险中、或患有涉及纤维化的疾病或状况或处于发展涉及纤维化的疾病或状况的风险中,其中所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物。在这个方面的一些实施方案中,疾病或状况是化学治疗药物诱导的纤维化、放射诱导的纤维化、肺纤维化、肝纤维化、肾纤维化(例如与慢性肾疾病相关的纤维化)、角膜纤维化、心脏纤维化、骨髓纤维化、纵隔纤维化、腹膜后纤维化、关节纤维化、骨关节纤维化、组织纤维化、肿瘤基质、促纤维增生性肿瘤、手术粘连、肥厚性瘢痕或瘢痕疙瘩。在这个方面的一些实施方案中,疾病或

状况是与以下有关的纤维化:伤口、烧伤、乙型或丙型肝炎感染、脂肪肝疾病、血吸虫感染、肾疾病(例如慢性肾疾病)、心脏病、黄斑变性、克罗恩氏病、视网膜或玻璃体视网膜病变、全身性或局限性硬皮病、动脉粥样硬化或再狭窄。在这个方面的一些实施方案中,纤维化起因于慢性肾疾病。

[0153] 在任何上述方面的一些实施方案中,组织纤维化是影响选自以下的组织的纤维化:肌肉组织、皮肤表皮、皮肤真皮、肌腱、软骨、胰腺组织、子宫组织、神经组织、睾丸、卵巢、肾上腺、动脉、静脉、结肠、小肠、大肠、胆道和肠。

[0154] 在任何上述方面的一些实施方案中,该方法改善纤维化组织或器官的功能。在任何上述方面的一些实施方案中,该方法减慢或抑制纤维化的进展。在任何上述方面的一些实施方案中,该方法减少(例如减少其频率或严重性)纤维化的一种或多种症状。

[0155] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来增加有此需要的受试者中的红血细胞水平(例如增加血红蛋白水平、红血细胞计数或血细胞比容)的方法。

[0156] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来促进或增加有此需要的受试者中的红血细胞形成的方法。

[0157] 在任何上述方面的一些实施方案中,受试者患有贫血或失血或处于发展贫血或失血的风险中。

[0158] 在另一个方面,本发明的特征在于影响患有疾病或状况或处于发展疾病或状况的风险中的受试者中的肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导(例如减少或抑制肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9与其内源性受体的结合)的方法,所述疾病或状况涉及低红血细胞水平(例如低血红蛋白水平、低红血细胞计数或低血细胞比容),其中所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物。

[0159] 在上述方面的一些实施方案中,疾病或状况是贫血或失血。

[0160] 在任何上述方面的一些实施方案中,贫血或失血与以下有关:癌症、癌症治疗、肾疾病或衰竭(例如慢性肾疾病或急性肾疾病或衰竭)、骨髓增生异常综合症、地中海贫血、营养缺乏、对药物的不良反应、炎性或自身免疫性疾病、脾肿大、卟啉症、血管炎、溶血、骨髓缺损、骨髓移植、糖尿病、肝疾病(例如急性肝疾病或慢性肝疾病)、出血(例如急性或慢性出血)、感染、血红蛋白病、药物使用、酒精滥用、高龄、丘斯二氏综合征、费尔蒂综合征、移植物抗宿主病、造血干细胞移植、骨髓纤维化、全血细胞减少症、纯红细胞再生障碍、过敏性紫癜、舒瓦克曼综合征(例如舒戴二氏综合征)、输血禁忌证、手术、创伤、伤口、溃疡、泌尿道出血、消化道出血、频繁献血或月经出血过多。

[0161] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来治疗患有贫血或处于发展贫血的风险中的受试者的方法。在一些实施方案中,贫血与以下相关:癌症、癌症治疗、肾疾病或衰竭(例如慢性肾疾病或急性肾疾病或衰竭)、骨髓增生异常综合症、地中海贫血、营养缺乏、对药物的不良反应、炎性或自身免疫性疾病、脾肿大、卟啉症、血管炎、溶血、骨髓缺损、骨髓移植、糖尿病、肝疾病(例如急性肝疾病或慢性肝疾病)、出血(例如急性或慢性出血)、感染、血红蛋白病、药物使用、酒精滥用、高龄、丘斯二氏综合征、费尔蒂综合征、移植物抗宿主病、造血

干细胞移植、骨髓纤维化、全血细胞减少症、纯红细胞再生障碍、过敏性紫癜、舒瓦克曼综合征(例如舒戴二氏综合征)、输血禁忌证、手术、创伤、伤口、溃疡、泌尿道出血、消化道出血、频繁献血或月经出血过多。

[0162] 在任何上述方面的一些实施方案中,贫血起因于慢性肾疾病。

[0163] 在任何上述方面的一些实施方案中,贫血是再生障碍性贫血、缺铁性贫血、维生素缺乏性贫血、慢性疾病的贫血、与骨髓疾病有关的贫血、溶血性贫血、镰状细胞性贫血、小红细胞性贫血、低色素性贫血、铁粒幼细胞性贫血、戴布二氏贫血、范可尼贫血或难治性贫血伴胚细胞增多。

[0164] 在任何上述方面的一些实施方案中,受试者并未良好响应用促红细胞生成素(EPO)的治疗,或易受EPO的不利效应影响。

[0165] 在任何上述方面的一些实施方案中,该方法增加红血细胞形成、红血细胞计数、血红蛋白水平或血细胞比容。

[0166] 在任何上述方面的一些实施方案中,该方法减少受试者对于输血的需要。

[0167] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来预防在有此需要的受试者中的肺性高血压症(PH)的方法。

[0168] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来减少有此需要的受试者中发展PH的风险的方法。

[0169] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来减慢或抑制有此需要的受试者中的PH进展的方法。

[0170] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来治疗患有PH或处于发展PH的风险中的受试者的方法。

[0171] 在另一个方面,本发明的特征在于影响患有PH或处于发展PH的风险中的受试者中的肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导(例如减少或抑制肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9与其内源性受体的结合)的方法,所述疾病或状况涉及肌无力和萎缩,其中所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物。

[0172] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来减少患有PH或处于发展PH的风险中的受试者中的血管重塑的方法。

[0173] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来减少患有PH或处于发展PH的风险中的受试者中的右心室肥大的方法。

[0174] 在另一个方面,本发明的特征在于通过向受试者施用治疗有效量的本文所述的多肽、核酸分子或载体、或本文所述的药物组合物,来减少患有PH或处于发展PH的风险中的受试者中的肺血管阻力的方法。

[0175] 在任何上述方面的一些实施方案中,PH是肺动脉高压(PAH)。在一些实施方案中,PAH是特发性PAH。在一些实施方案中,PAH是可遗传性PAH。在一些实施方案中,PAH与以下有关:HIV感染、血吸虫病、肝硬化、先天性心脏异常、门脉高压、肺静脉闭塞性疾病、肺毛细血管血管瘤病、结缔组织病症、自身免疫性病症(例如硬皮病或狼疮)、或药物使用或滥用(例如可卡因或甲基苯丙胺的使用)。

[0176] 在任何上述方面的一些实施方案中,PH是静脉PH。在一些实施方案中,静脉PH与以下有关:左心室收缩功能障碍、左心室舒张功能障碍、瓣膜性心脏病、先天性心肌病、或先天性或获得性肺静脉狭窄。

[0177] 在任何上述方面的一些实施方案中,PH是低氧PH。在一些实施方案中,低氧PH与以下有关:慢性阻塞性肺疾病(例如肺气肿)、间质性肺疾病、睡眠障碍性呼吸(例如睡眠呼吸暂停)、肺疾病(例如肺纤维化)、肺泡通气不足病症、长期暴露于高海拔或发育异常。

[0178] 在任何上述方面的一些实施方案中,PH是血栓栓塞性PH。在一些实施方案中,血栓栓塞性PH与以下有关:慢性血栓栓塞性肺性高血压症、肺栓塞、血管肉瘤、动脉炎、先天性肺动脉狭窄或寄生虫感染。

[0179] 在任何上述方面的一些实施例中,PH是杂项PH。在一些实施方案中,杂项PH与以下有关:血液系统疾病(例如慢性溶血性贫血、镰状细胞病)、系统性疾病(例如类肉瘤病、肺朗格汉斯细胞组织细胞增生症、淋巴管平滑肌瘤病、神经纤维瘤病或血管炎)、代谢病症(例如糖原贮积病、戈谢病或甲状腺疾病)、肺肿瘤血栓性微血管病、纤维化纵隔炎、慢性肾衰竭或节段性肺性高血压症。

[0180] 在任何上述方面的一些实施方案中,该方法减少PH的一种或多种症状的频率或严重性(例如减少呼吸急促(呼吸困难),疲劳,腿、足、腹部(腹水)或颈部的肿胀(例如水肿),胸痛或压力,疾脉或心悸,嘴唇或皮肤呈蓝色(紫绀),头晕或晕厥中的一种或多种的频率或严重性)。

[0181] 在任何上述方面的一些实施方案中,该方法减少肺血管重塑。

[0182] 在任何上述方面的一些实施方案中,该方法减少心脏中的血管重塑。

[0183] 在任何上述方面的一些实施方案中,该方法减少右心室肥大。

[0184] 在任何上述方面的一些实施方案中,该方法减少肺血管阻力(例如与治疗之前进行的测量相比,减少肺血管阻力)。

[0185] 在任何上述方面的一些实施方案中,该方法改善6分钟步行测试中的表现(例如与治疗之前进行的测量相比,改善表现)。

[0186] 在任何上述方面的一些实施方案中,该方法减少或抑制激活素和/或肌肉生长抑制素与其受体的结合。

[0187] 在任何上述方面的一些实施方案中,施用的多肽、核酸、载体或药物组合物的量足以增加肌重量和/或强度,增加骨矿物质密度,减少骨再吸收,减少骨损失,减少骨再吸收速率,增加骨形成,增加骨形成速率,减少破骨细胞活性,增加成骨细胞活性,减少骨折的风险,增加骨强度,减少纤维化,预防纤维化的发展,延迟纤维化的发展,减慢或抑制纤维化的进展,减少发展纤维化的风险,减少纤维化的一种或多种症状,改善纤维化组织或器官的功能,增加红血细胞水平,增加血红蛋白水平,增加血细胞比容,减少关于输血的需要,增加红血细胞形成,增加红血细胞计数,治疗贫血,增加预防PH,减少发展PH的风险,减少PH的一种

或多种症状的严重性或频率,延迟PH的发展,减慢或抑制PH的进展,治疗PH,减少肺血管重塑,减少心脏中的血管重塑,减少右心室肥大,减少肺血管阻力,改善6分钟步行测试中的表现,影响受试者中的肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导,或减少或抑制激活素和/或肌肉生长抑制素与其受体的结合。在一些实施方案中,PH是PAH。在一些实施方案中,PH是静脉PH。在一些实施方案中,PH是低氧PH。在一些实施方案中,PH是血栓栓塞性PH。在一些实施例中,PH是杂项PH。

[0188] 在任何上述方面的一些实施方案中,该方法不在受试者中引起血管并发症。在一些实施方案中,该方法不增加血管通透性或渗漏。

[0189] 定义

如本文使用的,术语"细胞外激活素受体IIB型(ActRIIB)变体"指包括单个跨膜受体ActRIIB的可溶性细胞外部分的肽,其具有相对于野生型细胞外ActRIIB(例如下文显示的SEQ ID NO:18的序列的粗体部分)的至少一个氨基酸取代。野生型人ActRIIB的序列显示于下文(SEQ ID NO:18),其中信号肽是斜体的,而细胞外部分是粗体的。

[0190] 野生型人ActRIIB(SEQ ID NO:18):

*MTAPWVALALLWGSLCAGS***GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCY**
ASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG
GPEVTYEPPPTAPTLLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEDPGPPP
PSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCVWKAQLMNDFVAVKIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMK
HENLLQFIAAEKRGSNLEVELWLITAFHDKGSLTDYLKGNIITWNELCHVAETMSRGLSY
LHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTAVLADFGLAVRFEPGKPPGDTHGQVG
TRRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWELVSRCKAADGPVDEYMLPFEEEIGQ
HPSLEELQEVVVHKKMRPTIKDHWLKHPGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSL
IRRSVNGTTSDCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI

[0191] 细胞外ActRIIB变体可以具有SEQ ID NO:1-15中任何一个的序列。在特定的实施方案中,细胞外ActRIIB变体具有SEQ ID NO:2-15中任何一个的序列(表2)。在一些实施方案中,细胞外ActRIIB变体可以与野生型细胞外ActRIIB的序列(SEQ ID NO:17)具有至少85%(例如至少85%、87%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或更高)的氨基酸序列同一性。

[0192] 如本文使用的,术语"接头"是指两个元件(例如肽或蛋白结构域)之间的连接。本文所述的多肽可以包括与部分融合的细胞外ActRIIB变体(例如,具有SEQ ID NO:1-15(例如,SEQ ID NO:2-15)中的任一个的序列的细胞外ActRIIB变体)。所述部分可以增加稳定性或改善多肽的药代动力学特性。所述部分(例如,Fc结构域单体,野生型Fc结构域,具有氨基酸取代(例如,一个或多个减少二聚化的取代)的Fc结构域,白蛋白结合肽,纤连蛋白结构域或人血清白蛋白)可以通过接头的方式与多肽融合。接头可以是共价键或间隔区。术语"键"是指化学键,例如酰胺键或二硫键,或由化学反应(例如,化学缀合)产生的任何种类的键。术语"间隔区"是指在两个元件(例如,肽或蛋白结构域)之间存在以提供两个元件之间的空间和/或柔性的部分(例如,聚乙二醇(PEG)聚合物)或氨基酸序列(例如,1-200个氨基酸序列)。氨基酸间隔区是多肽的一级序列的一部分(例如,通过多肽主链与间隔的肽融合)。例如在形成Fc结构域的两个铰链区之间形成二硫键不被认为是接头。

[0193] 如本文使用的,术语“Fc结构域”是指两个Fc结构域单体的二聚体。Fc结构域与包含至少C_H2结构域和C_H3结构域的人Fc结构域具有至少80％序列同一性(例如,至少85％、90％、95％、97％或100％序列同一性)。Fc结构域单体包含第二和第三抗体恒定结构域(C_H2和C_H3)。在一些实施方案中,所述Fc结构域单体还包含铰链结构域。Fc结构域不包含能够充当抗原识别区域的免疫球蛋白的任何部分,例如可变结构域或互补决定区(CDR)。在野生型Fc结构域中,两个Fc结构域单体通过两个C_H3抗体恒定结构域以及在两个二聚化Fc结构域单体的铰链结构域之间形成的一个或多个二硫键之间的相互作用而二聚化。在一些实施方案中,可以使Fc结构域突变以缺乏效应子功能,这是典型的“死亡Fc结构域”。在某些实施方案中,Fc结构域中的每个Fc结构域单体包含C_H2抗体恒定结构域中的减少Fc结构域和Fc γ受体之间的相互作用或结合的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述Fc结构域含有一个或多个减少或抑制Fc结构域二聚化的氨基酸取代。Fc结构域可以是任何免疫球蛋白抗体同种型,包括IgG、IgE、IgM、IgA或IgD。另外,Fc结构域可以是IgG亚型(例如,IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3或IgG4)。所述Fc结构域也可以是非天然存在的Fc结构域,例如重组Fc结构域。

[0194] 如本文使用的,术语“白蛋白结合肽”是指12至16个氨基酸的氨基酸序列,其具有对血清白蛋白的亲和力和结合血清白蛋白的功能。白蛋白结合肽可以是不同来源(例如,人、小鼠或大鼠)的。在一些实施方案中,白蛋白结合肽具有序列DICLPRWGCLW(SEQ ID NO:72)。

[0195] 如本文使用的,术语“内源的”描述了这样的分子(例如多肽、核酸或辅因子),其在特定生物(例如人)或生物内的特定位置(例如器官、组织或细胞,例如人细胞,例如人毛细胞)中天然发现。

[0196] 如本文使用的,术语“纤连蛋白结构域”是指细胞外基质的高分子量糖蛋白或其片段,其结合例如跨膜受体蛋白诸如整联蛋白和细胞外基质组分诸如胶原蛋白和纤维蛋白。在一些实施方案中,纤连蛋白结构域是具有UniProt ID NO:P02751的序列的氨基酸610-702的纤连蛋白III型结构域(SEQ ID NO:73)。在其他实施方案中,纤连蛋白结构域是adnectin蛋白。

[0197] 如本文使用的,术语“人血清白蛋白”是指存在于人血浆中的白蛋白。人血清白蛋白是血液中最丰富的蛋白。其构成血清蛋白的约一半。在一些实施方案中,人血清白蛋白具有UniProt ID NO:P02768的序列(SEQ ID NO:74)。

[0198] 如本文使用的,术语“融合”用于描述两个或更多个元件、组分或蛋白结构域(例如,肽或多肽)通过包括化学缀合、重组手段和化学键(例如,酰胺键)的手段的组合或附接。例如,串联系列的两个单一肽可以通过化学缀合、化学键、肽接头或任何其他共价连接的手段融合以形成一个连续的蛋白结构,例如多肽。在本文所述多肽的一些实施方案中,细胞外ActRIIB变体(例如,具有SEQ ID NO:1-15(例如,SEQ ID NO:2-15)中的任一个的序列的细胞外ActRIIB变体)可以与部分(例如,Fc结构域单体(例如,SEQ ID NO:19的序列),野生型Fc结构域(例如,SEQ ID NO:71的序列),具有氨基酸取代(例如,一个或多个减少二聚化的取代)的Fc结构域,白蛋白结合肽(例如,SEQ ID NO:72的序列),纤连蛋白结构域(例如,SEQ ID NO:73的序列)或人血清白蛋白(例如,SEQ ID NO:74的序列))的N-或C-末端通过接头的方式以串联系列融合。例如,细胞外ActRIIB变体与部分(例如,Fc结构域单体,野生型Fc结构域,具有氨基酸取代(例如,一个或多个减少二聚化的取代)的Fc结构域,白蛋白结合肽,

纤连蛋白结构域或人血清白蛋白)通过肽接头的方式融合,其中肽接头的N-末端通过化学键(例如,肽键)与细胞外ActRIIB变体的C-末端融合,并且肽接头的C-末端与部分(例如,Fc结构域单体,野生型Fc结构域,具有氨基酸取代(例如,一个或多个减少二聚化的取代)的Fc结构域,白蛋白结合肽,纤连蛋白结构域或人血清白蛋白)通过化学键(例如,肽键)融合。

[0199] 如本文使用的,术语“骨矿物质密度(BMD)”、“骨密度”和“骨量”是指骨组织中骨矿物质(例如钙)的量的量度。BMD可以通过本领域技术人员已知的良好确立的临床技术(例如,通过单一-1或双能光子或X射线吸收测定法)来测量。BMD的概念涉及每体积骨的矿物质量,尽管临床上其通过代理人根据成像时每平方厘米骨表面的光密度来测量。BMD测量值在临床医学中用作骨质疏松症和骨折风险的间接指标。在一些实施方案中,BMD测试结果作为T-评分提供,其中T-评分代表与健康的30岁成人的理想或峰值骨矿物质密度相比的受试者的BMD。0的评分表示BMD等于健康年轻成人的正常参考值。测量的受试者BMD和健康年轻成人的参考值之间的差异以标准偏差单位(SD)测量。因此,在+1SD和-1SD之间的T-评分可以指示正常BMD,在-1SD和-2.5SD之间的T-评分可以指示低骨量(例如,骨质减少症),且低于-2.5SD的T-评分可以指示骨质疏松症或严重的骨质疏松症。在一些实施方案中,将本发明的包含细胞外ActRIIB变体(例如,具有SEQ ID NO:1-15(例如,SEQ ID NO:2-15)中的任一个的序列的细胞外ActRIIB变体)的多肽、编码这种多肽的核酸或含有这种核酸分子的载体施用于有此需要的受试者,其中所述患者具有低骨量(例如,T-评分在-1SD和-2.5SD之间)。在一些实施方案中,将本发明的包含细胞外ActRIIB变体(例如,具有SEQ ID NO:1-15(例如,SEQ ID NO:2-15)中的任一个的序列的细胞外ActRIIB变体)的多肽、编码这种多肽的核酸或含有这种核酸分子的载体施用于有此需要的受试者,其中所述患者具有骨质疏松症(例如,T-评分小于-2.5SD)。在一些实施方案中,本发明的包含细胞外ActRIIB变体(例如,具有SEQ ID NO:1-15(例如,SEQ ID NO:2-15)中的任一个的序列的细胞外ActRIIB变体)的多肽、编码这种多肽的核酸或含有这种核酸分子的载体的施用通过增加其BMD来治疗受试者。在一些实施方案中,本发明的包含细胞外ActRIIB变体(例如,具有SEQ ID NO:1-15(例如,SEQ ID NO:2-15)中的任一个的序列的细胞外ActRIIB变体)的多肽、编码这种多肽的核酸或含有这种核酸分子的载体的施用增加受试者的BMD,导致受试者的T-评分增加(例如,导致受试者的T-评分增加0.1或更多、0.2或更多、0.3或更多、0.4或更多、0.5或更多、1.0或更多或2.0或更多)。

[0200] 如本文使用的,术语“骨强度”指除骨矿物质密度之外,还通过骨质量确定的骨的量度。骨质量受骨几何形状、微结构和构成组织的特性影响。骨强度可以用于评价骨的骨折风险。

[0201] 如本文使用的,术语“骨疾病”指特征在于骨损伤(例如骨矿物质密度减少、骨强度减少和/或骨损失)的状况。此类疾病或状况可能由成骨细胞和/或破骨细胞活性中的失衡(例如骨再吸收增加或骨形成减少)引起。骨疾病包括原发性骨质疏松症、继发性骨质疏松症、骨质减少症、骨硬化症、骨折、骨癌或与癌症转移相关的骨损失(例如与多发性骨髓瘤相关的骨损失)、佩吉特氏病、肾性骨营养不良、治疗相关的骨损失、饮食相关的骨损失、肥胖治疗有关的骨损失、低重力相关的骨损失和固定相关的骨损失。

[0202] 如本文使用的,术语“骨重塑”或“骨代谢”是指通过用新合成的蛋白质基质包替换旧骨的离散部分来维持骨强度和离子内稳态的过程。骨被破骨细胞吸收,并且在称为骨化

的过程中通过成骨细胞沉积。骨细胞活性在该过程中起关键作用。导致骨量减少的病况可以由吸收的增加或骨化的减少引起。在健康的个体中,在儿童期期间,骨形成超过吸收。随着老化过程发生,吸收超过形成。由于与更年期相关的雌激素缺乏,骨吸收率在绝经后老年女性中通常也高得多。

[0203] 如本文使用的,术语“骨吸收”或“骨分解代谢活性”是指破骨细胞分解骨中的组织并且释放矿物质、导致矿物质(例如,钙)从骨组织转移至血液的过程。骨吸收速率的增加与衰老(包括绝经后妇女)相关。高骨吸收速率或超过骨化速率的骨吸收速率,与骨骼病症(诸如骨矿物质密度减少,包括骨质减少症和骨质疏松症)相关,并可以导致骨损失。在一些实施方案中,将本发明的包含细胞外ActRIIB变体(例如,具有SEQ ID NO:1-15(例如,SEQ ID NO:2-15)中的任一个的序列的细胞外ActRIIB变体)的多肽、编码这种多肽的核酸或含有这种核酸分子的载体施用于有此需要的受试者,以减少受试者中的骨吸收(例如,减少骨损失)(例如,受试者中的骨吸收的量或速率)。

[0204] 如本文使用的,术语“骨形成”、“骨化”、“骨生成”或“骨合成代谢活性”是指通过成骨细胞形成新骨组织的过程。在一些实施方案中,将本发明的包含细胞外ActRIIB变体(例如,具有SEQ ID NO:1-15(例如,SEQ ID NO:2-15)中的任一个的序列的细胞外ActRIIB变体)的多肽、编码这种多肽的核酸或含有这种核酸分子的载体施用于有此需要的受试者,以增加骨形成(例如,增加受试者中的骨形成或骨生成的量或速率)。减少的骨形成速率或由骨再吸收速率超过的骨形成速率可以导致骨损失。

[0205] 如本文使用的,术语“增加”和“减少”指相对于参考分别导致度量更大或更小量的功能、表达或活性的调节。例如,在以本文所述的方法施用包括细胞外ActRIIB变体的本发明的多肽之后,相对于在施用前标记物的量,如本文所述的度量(例如瘦体重)的标记物的量可以是增加或减少的。一般地,度量在施用后的时间进行测量,在所述时间施用已达到所述效应,例如在治疗方案已开始后至少一周、一个月、3个月或6个月。

[0206] 如本文使用的,术语“纤维化”指纤维结缔组织的过度形成的病理过程。纤维化的特征在于成纤维细胞积累和胶原蛋白沉积超过任何特定组织中的正常沉积。响应炎症或组织损害,附近的成纤维细胞可以迁移到伤口内,增殖并产生大量的胶原细胞外基质。当纤维化响应损害而发生时,术语“疤痕”可以作为同义词使用。纤维化可以发生在身体的许多组织中,包括例如肺、皮肤、肝、肾、心脏、眼、腱、软骨、胰腺组织、子宫组织、神经组织、睾丸、卵巢、肾上腺、动脉、静脉、结肠、小肠和大肠、胆道和肠道。

[0207] 如本文使用的,术语“肺性高血压症”或“PH”指特征在于肺与心脏之间的血压增加的疾病,其可以包括肺动脉(肺动脉高压)、肺静脉或肺毛细血管中的血压增加。肺性高血压症可以具有多种症状,呼吸急促(呼吸困难),疲劳,腿、足、腹部(腹水)或颈部的肿胀(例如水肿),胸痛或压力,疾脉或心悸,嘴唇或皮肤呈蓝色(紫绀),头晕或晕厥。PH的特点还在于减少运动耐量,并且可能导致心力衰竭。

[0208] 如本文使用的,术语“肺动脉高压”或“PAH”指肺性高血压症的一种形式,其特征在于经常由疤痕引起的小肺动脉中的狭窄或阻塞和肺动脉血压中的增加。PAH也被称为WHO I类PH。PAH可以基于在休息时高于25mmHg的肺动脉平均肺动脉压中的血压增加,伴随正常肺动脉毛细血管楔压来诊断。PAH可以导致呼吸急促、头晕、晕厥和其它症状,所有这些症状因劳累而加剧。PAH可以是具有明显减少的运动耐量和心力衰竭的严重疾病。PAH的两种主要

类型包括特发性PAH(例如其中未鉴定素质性因子的PAH)和可遗传性PAH(例如与BMPR2、ALK1、SMAD9、caveolin 1、KCNK3或EIF2AK4中的突变相关的PAH)。在70％的家族性PAH病例中,突变位于BMPR2基因中。关于PAH发展的风险因素包括PAH的家族史、药物使用(例如甲基苯丙胺或可卡因使用)、感染(例如HIV感染或血吸虫病)、肝硬化、先天性心脏异常、门脉高压、肺静脉闭塞性疾病、肺毛细血管血管瘤病、或结缔组织/自身免疫性病症(例如硬皮病或狼疮)。

[0209] 如本文使用的,术语“肺静脉高压”和“静脉PH”指继发于左心疾病的肺性高血压症的一种形式。静脉PH也被称为WHO II类PH。静脉PH可能与以下有关或由以下引起:左心室收缩功能障碍(例如左心室衰竭)、左心室舒张功能障碍、瓣膜性心脏病(例如二尖瓣或主动脉瓣疾病)、先天性心肌病、或先天性/获得性肺静脉狭窄。

[0210] 如本文使用的,术语“低氧性肺性高血压症”和“低氧PH”指由于肺疾病或慢性低氧的肺性高血压症的一种形式。这种形式的PH也称为WHO III类PH。低氧PH可能与以下有关或由以下引起:慢性阻塞性肺疾病(例如肺气肿)、间质性肺疾病、睡眠障碍性呼吸(例如睡眠呼吸暂停)、肺疾病(例如肺纤维化)、肺泡通气不足病症、长期暴露于高海拔或发育异常。

[0211] 如本文使用的,术语“血栓栓塞性肺性高血压症”和“血栓栓塞性PH”指与慢性动脉阻塞(例如血块)相关的肺性高血压症的一种形式。血栓栓塞性PH也称为WHO IV类PH。血栓栓塞性PH可能与以下有关或由以下引起:慢性血栓栓塞性肺性高血压症、或其它肺动脉阻塞(例如肺栓塞、血管肉瘤、动脉炎、先天性肺动脉狭窄或寄生虫感染)。

[0212] 如本文使用的,术语“杂项肺性高血压症”和“杂项PH”指具有不明确或多因素机制的肺性高血压症的一种形式。这种形式的PH分类为WHO V类PH。杂项PH可能与以下有关或由以下引起:血液系统疾病(例如慢性溶血性贫血、镰状细胞病)、系统性疾病(例如类肉瘤病、肺朗格汉斯细胞组织细胞增生症、淋巴管平滑肌瘤病、神经纤维瘤病或血管炎)、代谢病症(例如糖原贮积病、戈谢病或甲状腺疾病)、肺肿瘤血栓性微血管病、纤维化纵隔炎、慢性肾衰竭或节段性肺性高血压症。

[0213] 如本文使用的,术语“增加红血细胞水平”和“促进红血细胞形成”指临床上可观察到的度量,例如血细胞比容、红血细胞计数和血红蛋白测量,并且关于此类变化通过其发生的机制预期是中性的。如本文使用的,术语“低红血细胞水平”指低于对于受试者的年龄和性别视为正常的值范围的红血细胞计数、血细胞比容和血红蛋白测量。

[0214] 如本文使用的,术语“红血细胞形成”和“红血细胞产生”指红血球的生成,例如其中红血细胞在骨髓中产生的红细胞生成过程。

[0215] 如本文使用的,术语“贫血”指血红蛋白或红血细胞中导致血液中的氧水平减少的任何异常。贫血可以与红细胞和/或血红蛋白的异常产生、加工或性能有关。术语贫血指相对于正常血液水平,血液中的红血细胞数目和/或血红蛋白水平中的任何减少。

[0216] 如本文使用的,术语“同一性百分比(％)”指在比对序列并引入缺口(需要时)以实现最大同一性百分比(即,可以在候选序列和参考序列之一或两者中引入缺口用于最佳比对,并且非同源序列对于比较的目的可以被忽略)之后,候选序列中与参考序列的氨基酸(或核酸)残基相同的氨基酸(或核酸)残基的百分比。为了确定百分比同一性的目的的比对可以以本领域技术内的各种方式,例如,使用公开获得的计算机软件诸如BLAST、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件来实现。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括

实现待比较序列全长内的最大比对所需的任何算法。在一些实施方案中,给定候选序列对、与或针对给定参考序列的百分比氨基酸(或核酸)序列同一性(其可以替代地表达为对、与或针对给定参考序列具有或包括特定百分比氨基酸(或核酸)序列同一性的给定候选序列)如下计算:

100x(A/B的分数)

其中A是在候选序列和参考序列的比对中评分为相同的氨基酸(或核酸)残基的数目,并且其中B是参考序列中氨基酸(或核酸)残基的总数。在其中候选序列的长度不等于参考序列的长度的一些实施方案中,候选序列与参考序列的百分比氨基酸(或核酸)序列同一性不等于参考序列与候选序列的百分比氨基酸(或核酸)序列同一性。

[0217] 在具体实施方案中,比对用于与候选序列比较的参考序列可以显示候选序列在候选序列的全长或候选序列的连续氨基酸(或核酸)残基的选择部分上表现出50%至100%同一性。为了比较目的而比对的候选序列的长度为参考序列的长度的至少30%,例如,至少40%,例如,至少50%、60%、70%、80%、90%或100%。当候选序列中的位置被与参考序列中的相应位置相同的氨基酸(或核酸)残基占据时,则分子在该位置是相同的。

[0218] 如本文使用的,在向受试者施用治疗性蛋白质的情况下,术语"血清半衰期"指受试者中蛋白质的血浆浓度减少一半所需的时间。蛋白质可以重新分布或从血流中清除,或降解,即通过蛋白酶解。如本文所述的,包括具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体的多肽在人中展示7天的血清半衰期。

[0219] 如本文使用的,术语"瘦体重"指身体组成的组分,其包括例如瘦体重、体脂和体液。通常,瘦体重通过从总体重中减去体脂和体液的重量来计算。通常,受试者的瘦体重是总体重的60%至90%。在本发明中,包括具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体的多肽、编码包括细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体)的多肽的核酸分子、或含有此类核酸分子的载体对受试者的施用增加了受试者的瘦体重。

[0220] 如本文使用的,术语"亲和力"或"结合亲和力"指两种分子之间的结合相互作用的强度。一般地,结合亲和力指分子及其结合配偶体(例如细胞外ActRIIB变体和BMP9或激活素A)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另有说明,否则结合亲和力指内在结合亲和力,其反映结合对的成员之间的1:1相互作用。两种分子之间的结合亲和力通常通过解离常数(K_D)或亲和常数(K_A)来描述。对于彼此具有低结合亲和力的两种分子一般缓慢结合,趋于容易解离,并且显示出大的K_D。对于彼此具有高亲和力的两种分子一般容易结合,趋于保持结合更久,并且显示出小的K_D。可以使用本领域众所周知的方法和技术,例如表面等离振子共振,确定两种相互作用分子的K_D。K_D计算为k_{off}/k_{on}的比率。

[0221] 如本文使用的,术语"肌重量"指身体组成的组分。通常,肌重量通过从总体重中减去体脂和体液的重量来计算。肌重量的百分比在个体中可能极大不同,取决于受试者的基因组成、年龄、种族和健康状况等。通常,受试者的肌重量可能为总体重的20%至50%。

[0222] 如本文使用的,短语"影响肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导"意指改变肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9与其受体例如ActRIIA、ActRIIB和BMPRII(例如内源性ActRIIB)的结合。在一些实施方案中,本文所述的包括细胞外ActRIIB变体的多肽减少或抑制肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9与其受体例如ActRIIA、ActRIIB和BMPRII(例如内源

性ActRIIB)的结合。如本文所述的,包括具有具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体的本发明的多肽可能对BMP9具有弱结合亲和力(例如200pM或更高的K_D)。

[0223] 如本文使用的,术语“血管并发症”是指血管病症或对血管的任何损伤,诸如对血管壁的损伤。对血管壁的损伤可以引起血管通透性或渗漏的增加。术语“血管渗透性或渗漏”是指血管壁允许小分子、蛋白和细胞流入和流出血管的能力。血管渗透性或渗漏的增加可能由内衬血管壁的内皮细胞之间的间隙增加(例如,间隙的大小和/或数量的增加)和/或血管壁变薄引起。

[0224] 如本文使用的,术语“多肽”描述单一聚合物,其中单体是通过酰胺键共价缀合在一起的氨基酸残基。多肽旨在涵盖天然存在的、重组的或合成产生的任何氨基酸序列。

[0225] 如本文使用的,术语“同二聚体”是指由两个相同的大分子(诸如蛋白或核酸)形成的分子构建体。两个相同的单体可以通过共价键或非共价键形成同二聚体。例如,如果两个Fc结构域单体含有相同的序列,则Fc结构域可以是两个Fc结构域单体的同二聚体。在另一个实例中,本文所述的包含与Fc结构域单体融合的细胞外ActRIIB变体的多肽可以通过两个Fc结构域单体的相互作用形成同二聚体,所述Fc结构域单体在同二聚体中形成Fc结构域。

[0226] 如本文使用的,术语“异二聚体”是指由两个不同的大分子(诸如蛋白或核酸)形成的分子构建体。两个单体可以通过共价键或非共价键形成异二聚体。例如,本文所述的包含与Fc结构域单体融合的细胞外ActRIIB变体的多肽可以通过两个Fc结构域单体(其各自与不同的ActRIIB变体融合)的相互作用形成异二聚体,所述Fc结构域单体在异二聚体中形成Fc结构域。

[0227] 如本文使用的,术语“宿主细胞”是指包含从其相应核酸表达蛋白所需的必需细胞组分(例如细胞器)的媒介物。核酸通常包括在核酸载体中,所述核酸载体可以通过本领域中已知的常规技术(转化、转染、电穿孔、磷酸钙沉淀、直接显微注射等)引入宿主细胞中。宿主细胞可以是原核细胞,例如细菌细胞,或真核细胞,例如哺乳动物细胞(例如CHO细胞或HEK293细胞)。

[0228] 如本文使用的,术语“治疗有效量”指有效实现治疗患有疾病或处于发展疾病的风险中的患者的所需疗效的本发明的多肽、核酸或载体,或含有本发明的多肽、核酸或载体的药物组合物的量,所述疾病例如肌肉疾病,涉及肌无力和萎缩的状况,例如杜兴氏肌营养不良症(DMD)、面肩肱型肌营养不良症(FSHD)、包涵体肌炎(IBM)、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、肌少症或癌症恶病质,涉及骨损伤的疾病或状况(例如骨质疏松症或涉及骨损伤的状况,例如原发性骨质疏松症、继发性骨质疏松症、骨质减少症、骨硬化症、骨折、骨癌或与癌症转移相关的骨损失、佩吉特氏病、肾性骨营养不良、治疗相关的骨损失、饮食相关的骨损失、肥胖治疗有关的骨损失、低重力相关的骨损失或与固定有关的骨损失),涉及低红血细胞水平的疾病或状况(例如贫血或失血),涉及纤维化的疾病或状况,或PH(例如PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH)。特别地,多肽、核酸或载体的治疗有效量避免了不利副作用。

[0229] 如本文使用的,术语“药物组合物”是指包含活性成分以及使得活性成分能够适合于施用方法的赋形剂和稀释剂的医药或药物制剂。本发明的药物组合物包含与所述多肽、核酸或载体相容的药学上可接受的组分。药物组合物可以呈用于口服施用的片剂或胶囊形

式,或呈用于静脉内或皮下施用的水性形式。

[0230] 如本文使用的,术语“药学上可接受的载体或赋形剂”是指药物组合物中的赋形剂或稀释剂。药学上可接受的载体必须与制剂的其他成分相容并且对受体无害。在本发明中,药学上可接受的载体或赋形剂必须为包含细胞外ActRIIB变体的多肽、编码所述多肽的核酸分子或含有这种核酸分子的载体提供足够的药物稳定性。载体或赋形剂的性质随着施用模式而不同。例如,对于静脉内施用,通常使用水溶液载体;对于口服施用,优选固体载体。

[0231] 如本文使用的,术语“治疗和/或预防”指使用本发明的方法和组合物的疾病治疗和/或预防,所述疾病例如肌肉疾病(例如DMD、FSHD、IBM和ALS)、骨疾病(例如涉及骨损伤的疾病或状况,例如骨质疏松症、骨质减少症、骨硬化症、骨折、骨癌或与癌症转移相关的骨损失、佩吉特氏病、肾性骨营养不良、治疗相关的骨损失、饮食相关的骨损失、肥胖治疗有关的骨损失、低重力相关的骨损失或与固定有关的骨损失)、涉及低血细胞水平的疾病(例如贫血或失血)、纤维化、或PH(例如PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH)。一般地,治疗肌肉、骨骼、低血细胞或纤维化疾病或PH(例如PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH)发生在受试者已发展肌肉、骨骼、低血细胞或纤维化疾病或PH(例如PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH),和/或已经诊断有肌肉、骨骼、低血细胞或纤维化疾病或PH(例如PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH)之后。预防肌肉、骨骼、低血细胞或纤维化疾病或PH(例如PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH),指当受试者处于发展肌肉、骨骼、低血细胞或纤维化疾病或PH(例如PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH)的风险中时所采取的步骤或程序。受试者可能显示由医生判断为发展肌肉、骨骼、低血细胞或纤维化疾病或PH(例如PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH)的指示或风险因素的体征或轻度症状,具有与肌肉、骨骼、低血细胞或纤维化疾病或PH(例如PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH)的发展相关的另一种疾病或状况,正在经历可能引起贫血、纤维化或骨密度丧失的治疗(例如手术、化学疗法或放射),或具有发展肌肉、骨骼、低血细胞或纤维化疾病或PH(例如PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH)的家族史或遗传倾向,但仍未发展该疾病。

[0232] 如本文使用的,术语“受试者”是指哺乳动物,例如优选人。哺乳动物包括但不限于人类和家畜和农场动物,诸如猴(例如,食蟹猴),小鼠,狗,猫,马和牛等。

附图说明

图1是显示细胞外ActRIIA和ActRIIB的野生型序列和ActRIIB变体中的氨基酸取代的序列比对。图1还展示了起因于用相应变体治疗小鼠的体重变化百分比。

[0234] 图2是描绘了在28天结束时,细胞外ActRIIB变体对体重的作用的条形图。小鼠接受了编码所示ActRIIB变体的质粒构建体或对照质粒的单次流体动力学注射。图例从左到右列出了条形图的条(“媒介物”是最靠近y轴的条,而“pLEV-113-ActRIIb-2.10”是最远离y轴的条)。

[0235] 图3A和3B是描绘了通过组织分析的细胞外ActRIIB变体对个体肌重量的作用的条形图。

[0236] 图4是描绘了经过28天的过程,细胞外ActRIIB变体ActRIIB 2.11-Fc和ActRIIB 2.12-Fc对体重百分比的作用的图。

[0237] 图5A-5C是描绘了ActRIIB变体ActRIIB 2.11-Fc和ActRIIB 2.12-Fc对红血细胞计数、血红蛋白水平和血细胞比容的作用的一系列图。

[0238] 图6A-6D是描述了在骨质疏松症的小鼠模型中,ActRIIB变体ActRIIB 2.12-Fc对小梁骨的作用的一系列图。

[0239] 图7A-7C是描述了ActRIIB变体ActRIIB 2.12-Fc对野生型大鼠中的红细胞量参数的作用的一系列图。

[0240] 图8A-8E是描述了ActRIIB变体ActRIIB 2.12-Fc对野生型大鼠中的小梁骨的作用的一系列图。

具体实施方式

本发明的特征在于包括细胞外激活素受体IIB型(ActRIIB)变体的多肽。在一些实施方案中,本发明的多肽包括与部分(例如Fc结构域单体、野生型Fc结构域、具有氨基酸取代(例如减少二聚化的一个或多个取代)的Fc结构域、白蛋白结合肽、纤连蛋白结构域或人血清白蛋白)融合的细胞外ActRIIB变体。包括与Fc结构域单体融合的细胞外ActRIIB变体的多肽还可以通过两个Fc结构域单体之间的相互作用形成二聚体(例如同二聚体或异二聚体)。相对于野生型细胞外ActRIIB,本文描述的ActRIIB变体可能具有与骨形态生成蛋白9(BMP9)减少的结合,或与对激活素和肌肉生长抑制素的结合亲和力相比,与BMP9具有弱结合亲和力或没有结合亲和力。本发明还包括通过向受试者施用本文所述的包括细胞外ActRIIB变体的多肽,通过增加肌重量和强度来治疗涉及肌无力和萎缩的疾病和状况的方法,通过增加骨矿物质密度、增加骨形成或减少骨再吸收来治疗或预防骨损伤的方法,治疗或预防纤维化的方法,通过增加红血细胞水平(例如红血细胞计数、血红蛋白水平或血细胞比容)或红血细胞产生来治疗或预防低血细胞水平(例如贫血或失血)的方法,治疗或预防肺性高血压症(PH)(例如PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH)的方法,或影响受试者中的肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导的方法。

[0242] I.细胞外激活素受体IIB型变体

激活素II型受体是单跨膜结构域受体,其调节转化生长因子β(TGF-β)超家族中的配体的信号。TGF-β超家族中的配体涉及许多生理过程,例如肌肉生长、血管生长、细胞分化、稳态和成骨。TGF-β超家族中的配体的实例包括例如激活素(例如激活素A和激活素B)、抑制素、生长分化因子(GDF)(例如GDF8,也称为肌肉生长抑制素)和骨形态生成蛋白(BMP)(例如BMP9)。已知肌肉生长抑制素和激活素在骨骼肌生长的调节中起作用。例如,不含肌肉生长抑制素的小鼠显示骨骼肌重量中的大量增加。肌肉生长抑制素也已牵涉促进纤维化。例如,缺乏肌肉生长抑制素的小鼠显示肌肉纤维化中的减少,而肌肉生长抑制素包被的珠的注射在小鼠中诱导肌肉纤维化。过表达激活素亚基的小鼠也显示出纤维化,所述激活素亚基导致可扩散的激活素A的产生。另外,激活素在骨组织中丰富表达,并且通过控制成骨细胞和破骨细胞功能两者来调节骨形成。激活素已报道在骨疾病中是上调的并抑制成骨细胞活性。肌肉生长抑制素还通过增加成骨作用和抑制成骨细胞活性而涉及骨稳态。在临床和实验性肺性高血压症中也观察到激活素A升高。因此,减少或抑制激活素或肌肉生长抑制素信号传导的方法,可以用于治疗涉及以下的疾病和状况:肌肉萎缩或无力、纤维化、骨损伤、低红血细胞水平(例如贫血)、或肺性高血压症(例如PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH

或杂项PH)。

[0243] 存在两种类型的II型激活素受体:ActRIIA和ActRIIB。研究已显示,BMP9结合ActRIIB的结合亲和力比ActRIIA高约300倍(参见例如,Townson等人,J.Biol.Chem.287:27313,2012)。ActRIIA已知具有与ActRIIB相比更长的半衰期。本发明描述了细胞外ActRIIB变体,其通过将ActRIIA的氨基酸残基引入ActRIIB内、或通过引入新型氨基酸取代而构建,目的是减少BMP9结合,以预防或减少内源性BMP9信号传导的破坏。氨基酸取代还可以赋予ActRIIA有益的生理和药代动力学特性,例如更长的半衰期或增加红血细胞水平的能力。最佳肽赋予瘦体重、肌重量、骨矿物质密度和/或红血细胞水平(例如增加红细胞的产生)中的显著增加,纤维化中的减少,或治疗PH(例如PAH、静脉PH、缺氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH),同时例如具有与BMP9减少的结合亲和力。与野生型ActRIIB相比,优选的ActRIIB变体还显示出与激活素和/或肌肉生长抑制素相似或改善的结合,这允许其与内源性激活素受体竞争配体结合,并且减少或抑制内源性激活素受体信号传导。这些变体可以用于治疗其中激活素受体信号传导升高的病症,例如骨疾病(例如涉及骨损伤的疾病或状况)、肌肉疾病、纤维化、PH(例如PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH)和/或贫血,导致骨再吸收或破骨细胞活性中的减少、骨形成或骨矿物质密度中的增加、肌重量或强度中的增加、纤维化中的减少(例如减少的纤维化或纤维化进展的减慢或停止)、红血细胞水平中的增加(例如血红蛋白水平、血细胞比容或红血细胞计数中的增加,例如红血细胞生产中的增加)、或PH(例如PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH)的症状或进展中的减少。在一些实施方案中,可以将氨基酸取代引入细胞外ActRIIB变体中,以减少或去除变体对BMP9的结合亲和力。人ActRIIA和ActRIIB的细胞外部分的野生型氨基酸序列显示于下文。

[0244] 人ActRIIA,细胞外部分(SEQ ID NO:16):

GAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGC
WLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTS

人ActRIIB,细胞外部分(SEQ ID NO:17):

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWL
DDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT

[0245] 本文所述的多肽包括相对于具有SEQ ID NO:17序列的野生型细胞外ActRIIB,具有至少一个氨基酸取代的细胞外ActRIIB变体。在28个不同位置处的可能氨基酸取代可以引入细胞外ActRIIB变体中(表1)。细胞外ActRIIB变体可以具有相对于野生型细胞外ActRIIB的序列(SEQ ID NO:17)的一个或多个(例如1-28、1-25、1-23、1-21、1-19、1-17、1-15、1-13、1-11、1-9、1-7、1-5、1-3或1-2;例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27)个氨基酸取代。在一些实施方案中,细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1的序列的细胞外ActRIIB变体)可以包括在如表1中列出的所有28个位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,细胞外ActRIIB变体可以包括在如表1中列出的多个位置处,例如在28个位置中的3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、16、18、20、22、24、26或27个位置处的氨基酸取代。在一些实施方案中,取代是来自ActRIIA的氨基酸在ActRIIB中的相同位置内的取代。在一些实施方案中,取代是新型改变(例如不在ActRIIA的相应位置中的氨基酸取代,例如S48T、I51L、Q69D或E70T)。

[0246] 氨基酸取代可以恶化或改善本发明的ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体)的活性和/或结合亲和力。在一些实施方案中,氨基酸取代恶化ActRIIB变体与BMP9的结合亲和力(例如变体具有相对于野生型细胞外ActRIIB与BMP9减少的结合,或具有与其它ActRIIB配体(例如激活素A或B、肌肉生长抑制素或GDF-11)相比与BMP9更低的结合。在一些实施方案中,ActRIIB变体具有与BMP9减少的结合、弱结合或基本不结合。在一些实施方案中,氨基酸取代改善ActRIIB与肌肉生长抑制素、激活素A或B和/或GDF-11的结合亲和力(例如变体具有相对于野生型细胞外ActRIIB改善的结合亲和力,或与肌肉生长抑制素、激活素A或B或GDF-11比BMP9更强地结合)。在一些实施方案中,氨基酸取代减少了ActRIIB对肌肉生长抑制素、激活素A或B和/或GDF-11的结合亲和力(例如变体具有相对于野生型细胞外ActRIIB减少的结合亲和力,或与肌肉生长抑制素、激活素A或B或GDF-11比BMP9更弱地结合)。在一些实施方案中,氨基酸取代基本上不改变细胞外ActRIIB功能(例如ActRIIB变体通过与野生型细胞外ActRIIB相似的量增加瘦体重、肌重量或骨矿物质密度,或减少或预防纤维化,例如ActRIIB变体在功能上等价于野生型细胞外ActRIIB)。在一些实施方案中,氨基酸取代对ActRIIB变体赋予ActRIIA特性或活性(例如ActRIIB变体可以增加红血细胞水平、或具有比WT细胞外ActRIIB更长的半衰期)。优选地,ActRIIB变体具有上述特性(例如减少的BMP9结合以及增加的与激活素A或B、肌肉生长抑制素和/或GDF-11的结合,或减少的BMP9结合,和在增加瘦体重、肌重量或骨矿物质密度,或减少或预防纤维化方面与野生型ActRIIB等价的功能)中的一种或多种、两种或更多种、或三种或更多种。

[0247] 本发明的ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体)优选具有减少BMP9结合的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中,减少BMP9结合的氨基酸取代是E75K(例如X_{24}在SEQ ID NO:1中是K)。在一些实施方案中,减少BMP9结合的氨基酸取代是Q69T和E70D(例如X_{21}在SEQ ID NO:1中是T并且X_{22}是D)。在一些实施方案中,减少BMP9结合的氨基酸取代是Q69D和E70T(例如X_{21}在SEQ ID NO:1中是D并且X_{22}是T)。在一些实施方案中,减少BMP9结合的氨基酸取代是T74K、E75K、E76D、N77S和Q79E(例如X_{23}、X_{24}、X_{25}、X_{26}和X_{28}在SEQ ID NO:1中分别是K、K、D、S和E)。在一些实施方案中,ActRIIB变体具有减少BMP9结合的多于一个上述氨基酸取代(例如取代E75K以及取代Q69D和E70T、或取代E75K以及取代Q69T和E70D)。在一些实施方案中,本发明的ActRIIB变体具有减少BMP9结合的一个或多个氨基酸取代和一个或多个另外的氨基酸取代。另外的氨基酸取代可以赋予其它有益特性,例如与激活素或肌肉生长抑制素改变的结合或改善的活性。例如,氨基酸取代T74K、E75K、E76D、N77S和Q79E导致ActRIIB变体活性中的减少(例如与野生型细胞外ActRIIB相比,变体具有减少的对瘦体重和肌重量的作用),但包括另外的取代S25T和S47I;E31Y、E33D和Q34K;或Y41F、R45K和K56Q改善ActRIIB变体对瘦体重和/或肌重量的作用。另外的氨基酸取代可以包括取代I11L、Y12F、L19K、E20D、S25T、L27V、R29P、E31Y、E33D、Q34K、L38R、Y41F、R45K、S47I、S48T、T50S、I51L、L53I、K56Q和F63I、T74K、E76D、N77S、Q79E或F89M中的一种或多种。

[0248] 在一些实施方案中,本文所述的多肽包括具有SEQ ID NO:1的序列的细胞外ActRIIB变体。

[0249] 表1.具有SEQ ID NO:1的序列的细胞外ActRIIB变体中的氨基酸取代

GRGEAETRECX$_1$X$_2$YNANWEX$_3$X$_4$RTNQX$_5$GX$_6$EX$_7$CX$_8$GX$_9$X$_{10}$DKRX$_{11}$HCX$_{12}$ASWX$_{13}$NX$_{14}$X$_{15}$GX$_{16}$X$_{17}$EX$_{18}$VKX$_{19}$GCWLDDX$_{20}$NCYDRX$_{21}$X$_{22}$CVAX$_{23}$X$_{24}$X$_{25}$X$_{26}$PX$_{27}$VYFCCCEGNX$_{28}$CNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT (SEQ ID NO: 1)			
X$_1$	I或L	X$_{15}$	S或T
X$_2$	F或Y	X$_{16}$	S或T
X$_3$	L或K	X$_{17}$	I或L
X$_4$	D或E	X$_{18}$	I或L
X$_5$	T或S	X$_{19}$	K或Q
X$_6$	L或V	X$_{20}$	F或I
X$_7$	P或R	X$_{21}$	Q,T,或D
X$_8$	Y或E	X$_{22}$	E,D,或T
X$_9$	D或E	X$_{23}$	K或T
X$_{10}$	K或Q	X$_{24}$	K或E
X$_{11}$	R或L	X$_{25}$	D或E
X$_{12}$	Y或F	X$_{26}$	S或N
X$_{13}$	R或K	X$_{27}$	E或Q
X$_{14}$	S或I	X$_{28}$	F或M

。

[0250] 在一些实施方案中,本文描述的多肽包括具有SEQ ID NO:2-15中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体(表2)。

[0251] 表2.具有SEQ ID NO:2-15的序列的细胞外ActRIIB变体

SEQ ID NO	氨基酸序列
2	GRGEAETRECIFYNANWEKDRTNQSGLEPCYGDQDKRRHCFASWKNSSGTIELVKQGCWLDDINCYDRQECVAKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT
3	GRGEAETRECIYYNANWELDRTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDINCYDRQECVATKENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT

SEQ ID NO	氨基酸序列
4	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK KGCWLDDFNCYDRQECVAKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEP PPTAPT
5	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQTGLERCEGEQDKRLHCYASWRNISGTIELVK KGCWLDDFNCYDRQECVAKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEP PPTAPT
6	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQTGLERCEGEQDKRLHCYASWRNITGTIELVKK GCWLDDFNCYDRQECVAKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPP PTAPT
7	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLEPCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK KGCWLDDFNCYDRQECVAKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEP PPTAPT
8	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDKDKRLHCYASWRNSSGTIELVK KGCWLDDFNCYDRQECVAKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEP PPTAPT
9	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCFASWKNSSGTIELVK QGCWLDDFNCYDRQECVAKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEP PPTAPT
10	GRGEAETRECIFYNANWEKDRTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK KGCWLDDFNCYDRQECVAKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEP PPTAPT
11	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCYGDQDKRRHCYASWRNSSGTIELV KKGCWLDDFNCYDRQECVAKKDSPEVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYE PPPTAPT
12	GRGEAETRECLYYNANWELERTNQSGVERCEGEKDKRLHCYASWRNSSGSLEIV KKGCWLDDFNCYDRTDCVATEENPQVYFCCCEGNMCNERFTHLPEAGGPEVTYE PPPTAPT
13	GRGEAETRECLYYNANWELERTNQSGVERCEGEKDKRLHCYASWRNSSGSLEIV KKGCWLDDFNCYDRDTCVATEENPQVYFCCCEGNMCNERFTHLPEAGGPEVTYE PPPTAPT
14	GRGEAETRECLYYNANWELERTNQSGVERCEGEKDKRLHCYASWRNSSGSLEIV KKGCWLDDFNCYDRTDCVATKENPQVYFCCCEGNMCNERFTHLPEAGGPEVTYE PPPTAPT
15	GRGEAETRECLYYNANWELERTNQSGVERCEGEKDKRLHCYASWRNSSGSLEIV KKGCWLDDFNCYDRDTCVATKENPQVYFCCCEGNMCNERFTHLPEAGGPEVTYE PPPTAPT

。

[0252] 在一些实施方案中,包括细胞外ActRIIB变体的本发明的多肽可以进一步包括部分(例如Fc结构域单体、野生型Fc结构域、具有氨基酸取代(例如减少二聚化的一个或多个取代)的Fc结构域、白蛋白结合肽、纤连蛋白结构域或人血清白蛋白),所述部分可以通过接头或其它共价键融合至细胞外ActRIIB变体的N末端或C末端(例如C末端)。包括与Fc结构域单体融合的细胞外ActRIIB变体的多肽可以通过两个Fc结构域单体之间的相互作用形成二

聚体(例如同二聚体或异二聚体),所述两个Fc结构域单体在二聚体中组合以形成Fc结构域。

[0253] 此外,在一些实施方案中,本文所述的多肽在人类中具有至少7天的血清半衰期。所述多肽可以以200pM或更高的K_D结合骨形态发生蛋白9(BMP9)。所述多肽可以以10pM或更高的K_D结合激活素A。在一些实施方案中,所述多肽不结合BMP9或激活素A。在一些实施方案中,所述多肽结合激活素和/或肌肉生长抑制素且表现出与BMP9的结合减少(例如,微弱)。

[0254] 另外,在一些实施方案中,所述多肽可以以约200pM或更高的K_D(例如,约200、300、400、500、600、700、800或900pM或更高的K_D,例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40或50nM或更高的K_D,例如,约200pM至约50nM的K_D)结合人BMP9。在一些实施方案中,所述多肽实质上不结合人BMP9。在一些实施方案中,所述多肽可以以约800pM或更低的K_D(例如,约800、700、600、500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1pM或更低的K_D,例如,约800pM至约200pM的K_D)结合人激活素A。在一些实施方案中,所述多肽可以以约800pM或更低的K_D(例如,约800、700、600、500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1pM或更低的K_D,例如,约800pM至约200pM的K_D)结合人激活素B。所述多肽也可以以约5pM或更高的K_D(例如,约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195或200pM或更高的K_D)结合生长和分化因子11(GDF-11)。

[0255] II.Fc结构域

在一些实施方案中,本文所述的多肽可以包含与免疫球蛋白的Fc结构域单体或Fc结构域的片段融合以增加多肽的血清半衰期的细胞外ActRIIB变体。包含与Fc结构域单体融合的细胞外ActRIIB变体的多肽可以通过两个Fc结构域单体之间的相互作用形成二聚体(例如,同二聚体或异二聚体),所述两个Fc结构域单体在二聚体中形成Fc结构域。如本领域常规已知,Fc结构域是在免疫球蛋白的C-末端发现的蛋白结构。Fc结构域包含两个Fc结构域单体,其通过C_H3抗体恒定结构域之间的相互作用而二聚化。野生型Fc结构域形成结合Fc受体的最小结构,例如FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa、FcγRIIIb、FcγRIV。在一些实施方案中,可以突变Fc结构域以缺乏效应子功能,这是典型的“死亡”Fc结构域。例如,Fc结构域可以包含已知使Fc结构域和Fcγ受体之间的相互作用最小化的特定氨基酸取代。在一些实施方案中,Fc结构域来自IgG1抗体并且包含氨基酸取代L234A、L235A和G237A。在一些实施方案中,Fc结构域来自IgG1抗体并且包含氨基酸取代D265A、K322A和N434A。上述氨基酸位置根据Kabat(Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes ofHealth,Bethesda,MD.(1991))定义。通过在抗体序列的同源性区域与“标准”Kabat编号序列比对,可以确定给定抗体的氨基酸残基的Kabat编号。此外,在一些实施方案中,Fc结构域不诱导任何免疫系统相关的应答。例如,可以修饰包含与Fc结构域单体融合的细胞外ActRIIB变体的多肽的二聚体中的Fc结构域,以减少Fc结构域和Fcγ受体之间的相互作用或结合。可以与细胞外ActRIIB变体融合的Fc结构域单体的序列如下所示(SEQ ID NO:19):

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGPFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0256] 在一些实施方案中,Fc结构域来自IgG1抗体且相对于SEQ ID NO:19的序列包含氨基酸取代L12A、L13A和G15A。在一些实施方案中,Fc结构域来自IgG1抗体且相对于SEQ ID NO:19的序列包含氨基酸取代D43A、K100A和N212A。在一些实施方案中,本文所述的细胞外ActRIIB变体(例如,具有SEQ ID NO:1-15(例如,SEQ ID NO:2-15)中的任一个的序列的细胞外ActRIIB变体))可以通过常规遗传或化学方式、例如化学缀合,与Fc结构域单体(例如,SEQ ID NO:19)的N-或C-末端融合。如果期望,可以在细胞外ActRIIB变体和Fc结构域单体之间插入接头(例如,间隔区)。Fc结构域单体可以与细胞外ActRIIB变体的N-或C-末端(例如,C-末端)融合。

[0257] 在一些实施方案中,本文所述的多肽可以包含与Fc结构域融合的细胞外ActRIIB变体。在一些实施方案中,所述Fc结构域含有一个或多个减少或抑制Fc结构域二聚化的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述Fc结构域含有铰链结构域。所述Fc结构域可以是免疫球蛋白抗体同种型IgG、IgE、IgM、IgA或IgD的Fc结构域。另外,所述Fc结构域可以是IgG亚型(例如,IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3或IgG4)。所述Fc结构域也可以是非天然存在的Fc结构域,例如重组Fc结构域。

[0258] 工程改造具有减少的二聚化的Fc结构域的方法是本领域中已知的。在一些实施方案中,可以将一个或多个具有大侧链的氨基酸(例如,酪氨酸或色氨酸)引入C_H3-C_H3二聚体界面以由于空间碰撞而阻碍二聚体形成。在其他实施方案中,可以将一个或多个具有小侧链的氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸或苏氨酸)引入C_H3-C_H3二聚体界面以除去有利的相互作用。在C_H3结构域中引入具有大或小侧链的氨基酸的方法描述于例如Ying等人(J Biol Chem.287:19399-19408,2012),美国专利公开号2006/0074225,美国专利号8,216,805和5,731,168,Ridgway等人(Protein Eng.9:617-612,1996),Atwell等人(J Mol Biol.270:26-35,1997),和Merchant等人(NatBiotechnol.16:677-681,1998),其全部都通过引用以其整体并入本文。

[0259] 在还有其他实施方案中,构成两个Fc结构域之间的C_H3-C_H3界面的C_H3结构域中的一个或多个氨基酸残基用带正电荷的氨基酸残基(例如,赖氨酸、精氨酸或组氨酸)或带负电荷的氨基酸残基(例如,天冬氨酸或谷氨酸)替代,使得相互作用变得静电不利,这取决于引入的特定带电荷的氨基酸。在C_H3结构域中引入带电荷的氨基酸以不利于或阻止二聚体形成的方法描述于例如Ying等人(J Biol Chem.287:19399-19408,2012),美国专利公开号2006/0074225,2012/0244578和2014/0024111,其全部都通过引用以其整体并入本文。

[0260] 在本发明的一些实施方案中,相对于人IgG1的序列,Fc结构域包含以下氨基酸取代中的一个或多个:T366W、T366Y、T394W、F405W、Y349T、Y349E、Y349V、L351T、L351H、L351N、L352K、P353S、S354D、D356K、D356R、D356S、E357K、E357R、E357Q、S364A、T366E、L368T、L368Y、L368E、K370E、K370D、K370Q、K392E、K392D、T394N、P395N、P396T、V397T、V397Q、L398T、D399K、D399R、D399N、F405T、F405H、F405R、Y407T、Y407H、Y407I、K409E、K409D、K409T和K409I。在一个具体实施方案中,相对于人IgG1的序列,Fc结构域包含氨基酸取代T366W。

野生型Fc结构域的序列(SEQ ID NO:71)为：

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0261] III.白蛋白结合肽

在一些实施方案中,本文所述的多肽可以包含与血清蛋白结合肽融合的细胞外ActRIIB变体。与血清蛋白肽的结合可以改善蛋白药物的药代动力学。

[0262] 作为一个实例,可用于本文所述的方法和组合物中的白蛋白结合肽通常是本领域中已知的。在一个实施方案中,所述白蛋白结合肽包含序列DICLPRWGCLW(SEQ ID NO:72)。

[0263] 在本发明中,白蛋白结合肽可以连接至本文所述的细胞外ActRIIB变体(例如,具有SEQ ID NO:1-15(例如,SEQ ID NO:2-15)中的任一个的序列的细胞外ActRIIB变体)的N-或C-末端(例如,C-末端)以增加细胞外ActRIIB变体的血清半衰期。在一些实施方案中,白蛋白结合肽直接或通过接头连接至细胞外ActRIIB变体的N-或C-末端。

[0264] 在一些实施方案中,本文所述的细胞外ActRIIB变体(例如,具有SEQ ID NO:1-15(例如,SEQ ID NO:2-15)中的任一个的序列的细胞外ActRIIB变体)可以通过常规遗传或化学方式、例如化学缀合,与白蛋白结合肽(例如,SEQ ID NO:72)的N-或C-末端融合。如果期望,可以在细胞外ActRIIB变体和白蛋白结合肽之间插入接头(例如,间隔区)。不受理论束缚,预期在本文所述的细胞外ActRIIB变体中包含白蛋白结合肽可以通过其与血清白蛋白的结合而导致治疗性蛋白的延长保留。

[0265] IV.纤连蛋白结构域

在一些实施方案中,本文所述的多肽可以包含与纤连蛋白结构域融合的细胞外ActRIIB变体。与纤连蛋白结构域的结合可以改善蛋白药物的药代动力学。

[0266] 纤连蛋白结构域是细胞外基质的高分子量糖蛋白或其片段,其结合例如跨膜受体蛋白诸如整联蛋白和细胞外基质组分诸如胶原蛋白和纤维蛋白。在本发明的一些实施方案中,纤连蛋白结构域连接至本文所述的细胞外ActRIIB变体(例如,具有SEQ ID NO:1-15(例如,SEQ ID NO:2-15)中的任一个的序列的细胞外ActRIIB变体)的N-或C-末端(例如,C-末端)以增加细胞外ActRIIB变体的血清半衰期。纤连蛋白结构域可以直接或通过接头连接至细胞外ActRIIB变体的N-或C-末端。

[0267] 作为一个实例,可用于本文所述的方法和组合物中的纤连蛋白结构域通常是本领域中已知的。在一个实施方案中,所述纤连蛋白结构域是具有UniProt ID NO:P02751的序列的氨基酸610-702的纤连蛋白III型结构域(SEQ ID NO:73)：

GPVEVFITETPSQPNSHPIQWNAPQPSHISKYILRWRPKNSVGRWKEATIPGHLNSYTIKGLKPGV
VYEGQLISIQQYGHQEVTRFDFTTTST

[0268] 在另一个实施方案中,所述纤连蛋白结构域是adnectin蛋白。

[0269] 在一些实施方案中,本文所述的细胞外ActRIIB变体(例如,具有SEQ ID NO:1-15(例如,SEQ ID NO:2-15)中的任一个的序列的细胞外ActRIIB变体))可以通过常规遗传或化学方式、例如化学缀合,与纤连蛋白结构域(例如,SEQ ID NO:73)的N-或C-末端融合。如果期望,可以在细胞外ActRIIB变体和纤连蛋白结构域之间插入接头(例如,间隔区)。不受

理论束缚,预期在本文所述的细胞外ActRIIB变体中包含纤连蛋白结构域可以通过其与整联蛋白和细胞外基质组分(诸如胶原蛋白和纤维蛋白)的结合而导致治疗性蛋白的延长保留。

[0270] V.血清白蛋白

在一些实施方案中,本文所述的多肽可以包含与血清白蛋白融合的细胞外ActRIIB变体。与血清白蛋白的结合可以改善蛋白药物的药代动力学。

[0271] 血清白蛋白是一种球状蛋白,其为哺乳动物中最丰富的血液蛋白。血清白蛋白在肝脏中产生,并且占血清蛋白的约一半。它是单体的且可溶于血液中。血清白蛋白的一些最重要的功能包括在体内运输激素、脂肪酸和其他蛋白,缓冲pH,和维持体液在血管和身体组织之间的正确分布所需的渗透压。在优选实施方案中,血清白蛋白是人血清白蛋白。在本发明的一些实施方案中,人血清白蛋白连接至本文所述的细胞外ActRIIB变体(例如,具有SEQ ID NO:1-15(例如,SEQ ID NO:2-15)中的任一个的序列的细胞外ActRIIB变体)的N-或C-末端(例如,C-末端)以增加细胞外ActRIIB变体的血清半衰期。人血清白蛋白可以直接或通过接头连接至细胞外ActRIIB变体的N-或C-末端。

[0272] 作为一个实例,可用于本文所述的方法和组合物中的血清白蛋白通常是本领域中已知的。在一个实施方案中,所述血清白蛋白包含UniProt ID NO:P02768的序列(SEQ ID NO:74)。:

MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPF
EDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEP
ERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLF
FAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAV
ARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLK
ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYAR
RHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFE
QLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVV
LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTL
SEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLV
AASQAALGL

[0273] 在一些实施方案中,本文所述的细胞外ActRIIB变体(例如,具有SEQ ID NO:1-15(例如,SEQ ID NO:2-15)中的任一个的序列的细胞外ActRIIB变体))可以通过常规遗传或化学方式、例如化学缀合,与人血清白蛋白(例如,SEQ ID NO:74)的N-或C-末端融合。如果期望,可以在细胞外ActRIIB变体和人血清白蛋白之间插入接头(例如,间隔区)。不受理论束缚,预期在本文所述的细胞外ActRIIB变体中包含人血清白蛋白可以导致治疗性蛋白的延长保留。

[0274] VI.接头

本文所述的多肽可以包含通过接头的方式与部分融合的细胞外ActRIIB变体(例如,具有SEQ ID NO:1-15(例如,SEQ ID NO:2-15)中的任一个的序列的细胞外ActRIIB变体)。在一些实施方案中,所述部分增加多肽的稳定性。示例性部分包括Fc结构域单体,野生型Fc结构域,具有氨基酸取代(例如,一个或多个减少二聚化的取代)的Fc结构域,白蛋白结

合肽,纤连蛋白结构域或人血清白蛋白。在本发明中,部分(例如,Fc结构域单体(例如,SEQ ID NO:19的序列),野生型Fc结构域(例如,SEQ ID NO:71),具有氨基酸取代(例如,一个或多个减少二聚化的取代)的Fc结构域,白蛋白结合肽(例如,SEQ ID NO:72),纤连蛋白结构域(例如,SEQ ID NO:73),或人血清白蛋白(例如,SEQ ID NO:74))和细胞外ActRIIB变体(例如,具有SEQ ID NO:1-15(例如,SEQ ID NO:2-15)中的任一个的序列的细胞外ActRIIB变体)之间的接头,可以是包括1-200个氨基酸的氨基酸间隔区。合适的肽间隔区是本领域中已知的,并且包括例如含有柔性氨基酸残基(诸如甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸)的肽接头。在一些实施方案中,间隔区可以含有GA、GS、GG、GGA、GGS、GGG、GGGA(SEQ ID NO:20)、GGGS(SEQ ID NO:21)、GGGG(SEQ ID NO:22)、GGGGA(SEQ ID NO:23)、GGGGS(SEQ ID NO:24)、GGGGG(SEQ ID NO:25)、GGAG(SEQ ID NO:26)、GGSG(SEQ ID NO:27)、AGGG(SEQ ID NO:28)或SGGG(SEQ ID NO:29)的基序,例如多个或重复基序。在一些实施方案中,间隔区可以含有2至12个氨基酸,包括GA或GS,例如GA、GS、GAGA(SEQ ID NO:30)、GSGS(SEQ ID NO:31)、GAGAGA(SEQ ID NO:32)、GSGSGS(SEQ ID NO:33)、GAGAGAGA(SEQ ID NO:34)、GSGSGSGS(SEQ ID NO:35)、GAGAGAGAGA(SEQ ID NO:36)、GSGSGSGSGS(SEQ ID NO:37)、GAGAGAGAGAGA(SEQ ID NO:38)和GSGSGSGSGSGS(SEQ ID NO:39)的基序。在一些实施方案中,间隔区可以含有3至12个氨基酸,包括GGA或GGS,例如GGA、GGS、GGAGGA(SEQ ID NO:40)、GGSGGS(SEQ ID NO:41)、GGAGGAGGA(SEQ ID NO:42)、GGSGGSGGS(SEQ ID NO:43)、GGAGGAGGAGGA(SEQ ID NO:44)和GGSGGSGGSGGS(SEQ ID NO:45)的基序。在还有一些实施方案中,间隔区可以含有4至12个氨基酸,包括GGAG(SEQ ID NO:26)、GGSG(SEQ ID NO:27),例如,GGAG(SEQ ID NO:26)、GGSG(SEQ ID NO:27)、GGAGGGAG(SEQ ID NO:46)、GGSGGGSG(SEQ ID NO:47)、GGAGGGAGGGAG(SEQ ID NO:48)和GGSGGGSGGGSG(SEQ ID NO:49)的基序。在一些实施方案中,间隔区可以含有GGGGA(SEQ ID NO:23)或GGGGS(SEQ ID NO:24),例如,GGGGAGGGGAGGGGA(SEQ ID NO:50)和GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:51)的基序。在本发明的一些实施方案中,部分(例如,Fc结构域单体,野生型Fc结构域,具有氨基酸取代(例如,一个或多个减少二聚化的取代)的Fc结构域,白蛋白结合肽,纤连蛋白结构域,或人血清白蛋白)和细胞外ActRIIB变体(例如,具有SEQ ID NO:1-15(例如,SEQ ID NO:2-15)中的任一个的序列的细胞外ActRIIB变体)之间的接头可以是GGG、GGGA(SEQ ID NO:20)、GGGG(SEQ ID NO:22)、GGGAG(SEQ ID NO:52)、GGGAGG(SEQ ID NO:53)或GGGAGGG(SEQ ID NO:54)。

[0275] 在一些实施方案中,间隔区还可以含有除了甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸以外的氨基酸,例如AAAL(SEQ ID NO:55)、AAAK(SEQ ID NO:56)、AAAR(SEQ ID NO:57)、EGKSSGSGSESKST(SEQ ID NO:58)、GSAGSAAGSGEF(SEQ ID NO:59)、AEAAAKEAAAKA(SEQ ID NO:60)、KESGSVSSEQLAQFRSLD(SEQ ID NO:61)、GENLYFQSGG(SEQ ID NO:62)、SACYCELS(SEQ ID NO:63)、RSIAT(SEQ ID NO:64)、RPACKIPNDLKQKVMNH(SEQ ID NO:65)、GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG(SEQ ID NO:66)、AAANSSIDLISVPVDSR(SEQ ID NO:67)或GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS(SEQ ID NO:68)。在一些实施方案中,间隔区可以含有EAAAK(SEQ ID NO:69)的基序,例如多个或重复基序。在一些实施方案中,间隔区可以含有富含脯氨酸的序列(诸如$(XP)_n$)的基序,例如多个或重复基序,其中X可以是任何氨基酸(例如,A、K或E)且n为1-5,和PAPAP(SEQ ID NO:70)。

[0276] 肽间隔区的长度和使用的氨基酸可以根据所涉及的两种蛋白和最终蛋白融合多

肽中期望的柔性程度进行调节。可以调节间隔区的长度以确保适当的蛋白折叠并避免聚集体形成。

[0277] VII.载体、宿主细胞和蛋白质产生

本发明的多肽可以从宿主细胞产生。宿主细胞是指包含从其相应的核酸表达本文所述的多肽和融合多肽所需的必需细胞组分(例如,细胞器)的媒介物。核酸可以包括在核酸载体中,所述核酸载体可以通过本领域中已知的常规技术(例如,转化、转染、电穿孔、磷酸钙沉淀、直接显微注射、注射等)引入宿主细胞中。核酸载体的选择部分取决于待使用的宿主细胞。通常,优选的宿主细胞是真核生物(例如,哺乳动物)或原核生物(例如,细菌)来源的。

[0278] 核酸载体构建和宿主细胞

编码本发明的多肽的氨基酸序列的核酸序列可以通过本领域中已知的各种方法制备。这些方法包括但不限于寡核苷酸介导的(或定点的)诱变和PCR诱变。编码本发明的多肽的核酸分子可以使用标准技术(例如,基因合成)获得。或,可以使用本领域中的标准技术(例如,QuikChange™诱变)突变编码野生型细胞外ActRIIB的核酸分子以包括特定氨基酸取代。可以使用核苷酸合成仪或PCR技术合成核酸分子。

[0279] 可以将编码本发明的多肽的核酸序列插入能够在原核或真核宿主细胞中复制和表达核酸分子的载体中。许多载体在本领域中可得,并且可用于本发明的目的。每种载体可以包括可以针对与特定宿主细胞的相容性进行调整和优化的各种组分。例如,载体组分可以包括但不限于复制起点、选择标记基因、启动子、核糖体结合位点、信号序列、编码目标蛋白的核酸序列和转录终止序列。

[0280] 在一些实施方案中,哺乳动物细胞可用作本发明的宿主细胞。哺乳动物细胞类型的实例包括但不限于人胚肾(HEK)(例如,HEK293、HEK 293F)、中国仓鼠卵巢(CHO)、HeLa、COS、PC3、Vero、MC3T3、NS0、Sp2/0、VERY、BHK、MDCK、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20、T47D、NS0(不内源性产生任何免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系)、CRL7030和HsS78Bst细胞。在一些实施方案中,大肠杆菌细胞也可用作本发明的宿主细胞。大肠杆菌菌株的实例包括但不限于大肠杆菌294(ATCC®31,446)、大肠杆菌λ1776(ATCC®31,537,大肠杆菌BL21(DE3)(ATCC®BAA-1025),和大肠杆菌RV308(ATCC®31,608)。不同宿主细胞具有转录后加工和修饰蛋白产物的特征和特定机制(例如,糖基化)。可以选择适当的细胞系或宿主系统以确保所表达的多肽的正确的修饰和加工。可以使用本领域中的常规技术(例如,转化、转染、电穿孔、磷酸钙沉淀和直接显微注射)将上述表达载体引入适当的宿主细胞中。一旦将载体引入宿主细胞中用于蛋白生产,宿主细胞在适当改良的常规营养培养基中培养,用于诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望序列的基因。用于表达治疗性蛋白的方法是本领域中已知的,参见,例如,Paulina Balbas,Argelia Lorence(编)Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols(Methods in Molecular Biology),Humana Press;第2版2004以及Vladimir Voynov和Justin A.Caravella(编)Therapeutic Proteins:Methods andProtocols(Methods in MolecularBiology)Humana Press;第2版2012。

[0281] 蛋白质生产、回收和纯化

用于产生本发明的多肽的宿主细胞可以在本领域中已知且适合于培养选择的宿主细胞的培养基中生长。用于哺乳动物宿主细胞的合适培养基的实例包括最小必需培养基

(MEM)、Dulbecco氏改良的Eagle氏培养基(DMEM)、Expi293™表达培养基、补充胎牛血清(FBS)的DMEM和RPMI-1640。用于细菌宿主细胞的合适培养基的实例包括Luria肉汤(LB)加必需的补充剂,诸如选择剂,例如氨苄青霉素。宿主细胞在合适的温度诸如约20℃至约39℃,例如25℃至约37℃,优选37℃,和CO_2水平,诸如5至10%下培养。培养基的pH通常为约6.8至7.4,例如7.0,这主要取决于宿主生物体。如果在本发明的表达载体中使用诱导型启动子,则在适合于激活启动子的条件下诱导蛋白表达。

[0282] 在一些实施方案中,取决于使用的表达载体和宿主细胞,表达的蛋白可以从宿主细胞(例如,哺乳动物宿主细胞)分泌至细胞培养基中。蛋白回收可以涉及过滤细胞培养基以去除细胞碎片。可以进一步纯化蛋白。本发明的多肽可以通过蛋白纯化领域中已知的任何方法,例如,通过色谱法(例如,离子交换、亲和力和大小排阻柱色谱法)、离心、差异溶解度或通过用于蛋白纯化的任何其他标准技术进行纯化。例如,可以通过适当选择和组合亲和柱、诸如蛋白A柱(例如,POROS蛋白A色谱))和色谱柱(例如,POROS HS-50阳离子交换色谱)、过滤、超滤、盐析和透析程序来分离和纯化蛋白。

[0283] 在其他实施方案中,可以破坏宿主细胞,例如通过渗透压休克、超声处理或裂解破坏宿主细胞,以回收表达的蛋白。一旦细胞被破坏,就可以通过离心或过滤除去细胞碎片。在一些情况下,多肽可以与标记序列(诸如肽)缀合以促进纯化。标记氨基酸序列的实例是六组氨酸肽(His-标签),其以微摩尔亲和力结合镍官能化的琼脂糖亲和柱。可用于纯化的其他肽标签包括但不限于血凝素"HA"标签,其对应于衍生自流感血凝素蛋白的表位(Wilson等人,Cell 37:767,1984)。

[0284] 可替换地,本发明的多肽可以由受试者(例如,人)的细胞产生,例如,在基因疗法的背景下,通过施用含有编码本发明的多肽的核酸分子的载体(诸如病毒载体(例如,逆转录病毒载体、腺病毒载体、痘病毒载体(例如,牛痘病毒载体,诸如修饰的牛痘病毒Ankara(MVA))、腺相关病毒载体和甲病毒载体))来产生。载体,一旦在受试者的细胞内(例如,通过转化、转染、电穿孔、磷酸钙沉淀、直接显微注射、感染等),将促进多肽的表达,然后所述多肽从细胞分泌。如果疾病或病症的治疗是期望的结果,则可能不需要进一步行动。如果期望收集蛋白,则可以从受试者收集血液,并且通过本领域中已知的方法从血液纯化蛋白。

[0285] VIII.药物组合物和制剂

本发明的特征在于药物组合物,其包含本文所述的多肽(例如,包含细胞外ActRIIB变体(例如,具有SEQ ID NO:1-15(例如,SEQ ID NO:2-15)中的任一个的序列的细胞外ActRIIB变体)的多肽)。在一些实施方案中,本发明的药物组合物包含与部分(例如,Fc结构域单体或其二聚体、野生型Fc结构域、具有氨基酸取代(例如,一个或多个减少二聚化的取代)的Fc结构域、白蛋白结合肽、纤连蛋白结构域或人血清白蛋白)融合的包含细胞外ActRIIB变体(例如,具有SEQ ID NO:1-15(例如,SEQ ID NO:2-15)中的任一个的序列的细胞外ActRIIB变体)的多肽作为治疗性蛋白。在一些实施方案中,包含本发明的多肽的本发明的药物组合物可以与其他药剂(例如,治疗性生物制剂和/或小分子)或组合物组合用于疗法中。除了治疗有效量的多肽以外,所述药物组合物还可以包含一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂,其可以通过本领域技术人员已知的方法配制。在一些实施方案中,本发明的药物组合物包含编码本发明的多肽的核酸分子(DNA或RNA,例如mRNA),或含有这种核酸分子的载体。

[0286] 药物组合物中可接受的载体和赋形剂在所用剂量和浓度下对受体无毒。可接受的载体和赋形剂可以包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐、HEPES和TAE,抗氧化剂,诸如抗坏血酸和甲硫氨酸,防腐剂,诸如氯化六甲基铵、十八烷基二甲基苄基氯化铵、间苯二酚和苯扎氯铵,蛋白,诸如人血清白蛋白、明胶、葡聚糖和免疫球蛋白,亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮,氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、组氨酸和赖氨酸,和碳水化合物,诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖和山梨糖醇。本发明的药物组合物可以以可注射制剂的形式肠胃外施用。可以使用无菌溶液或任何药学上可接受的液体作为媒介物配制用于注射的药物组合物。药学上可接受的媒介物包括但不限于无菌水、生理盐水和细胞培养基(例如Dulbecco氏改良的Eagle培养基(DMEM),α-改良的Eagles培养基(α-MEM),F-12培养基)。配制方法是本领域中已知的,参见例如,Banga(编)Therapeutic Peptides and Proteins:Formulation,Processing andDelivery Systems(第3版)Taylor&Francis Group,CRC Press(2015)。

[0287] 本发明的药物组合物可以在微胶囊、诸如羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊中制备。本发明的药物组合物还可以在其他药物递送系统、诸如脂质体、白蛋白微球、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊中制备。此类技术描述于Remington:The Science and Practice ofPharmacy第22版(2012)。待用于体内施用的药物组合物必须是无菌的。这可以通过无菌过滤膜过滤而容易地完成。

[0288] 本发明的药物组合物也可以制备为持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有本发明的多肽的固体疏水聚合物的半透性基质。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶、聚丙交酯、L-谷氨酸和γ-乙基-L-谷氨酸的共聚物,不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯,可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如LUPRON DEPOT™和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。一些持续释放制剂使得能够经几个月、例如一至六个月释放分子,而其他制剂释放本发明的药物组合物较短时间段,例如数天至数周。

[0289] 药物组合物可以根据需要以单位剂型形成。药物制备物中包括的活性成分(例如,本发明的多肽)的量是使得提供指定范围内的合适剂量(例如,0.01-100mg/kg体重范围内的剂量)。

[0290] 用于基因疗法的药物组合物可以在可接受的稀释剂中,或可以包含其中嵌入基因递送载体的缓释基质。如果使用流体动力学注射作为递送方法,则含有编码本文所述的多肽的核酸分子或含有所述核酸分子的载体(例如,病毒载体)的药物组合物以大流体体积静脉内快速递送。可用作体内基因递送媒介物的载体包括但不限于逆转录病毒载体、腺病毒载体、痘病毒载体(例如,牛痘病毒载体,诸如修饰的牛痘病毒Ankara)、腺相关病毒载体和甲病毒载体。

[0291] IX.途径、剂量和施用

包含本发明的多肽作为治疗性蛋白的药物组合物可以配制用于例如静脉内施用、肠胃外施用、皮下施用、肌内施用、动脉内施用、鞘内施用或腹膜内施用。所述药物组合物还可以配制用于口服、鼻、喷雾、气溶胶、直肠或阴道施用或经由口服、鼻、喷雾、气溶胶、直肠或阴道施用而施用。对于可注射制剂,各种有效的药物载体是本领域中已知的。参见,例如,ASHP Handbook on Injectable Drugs,Toissel,第18版(2014)。

[0292] 在一些实施方案中,包含编码本发明的多肽的核酸分子或含有这种核酸分子的载体的药物组合物可以通过基因递送的方式施用。基因递送的方法是本领域技术人员众所周

知的。可用于体内基因递送和表达的载体包括但不限于逆转录病毒载体、腺病毒载体、痘病毒载体(例如,牛痘病毒载体,诸如修饰的牛痘病毒Ankara(MVA))、腺相关病毒载体和甲病毒载体。在一些实施方案中,编码本发明的多肽的mRNA分子可以直接施用于受试者。

[0293] 在本发明的一些实施方案中,可以使用流体动力学注射平台施用编码本文所述的多肽的核酸分子或含有此类核酸分子的载体。在流体动力学注射方法中,将编码本文所述的多肽的核酸分子置于工程改造的质粒(例如病毒质粒)中的强启动子的控制下。经常以大流体体积静脉内快速递送质粒。流体动力学注射使用静脉中的受控流体动力学压力来增强细胞通透性,使得来自快速注射大流体体积的升高的压力导致流体和质粒从静脉外渗。核酸分子的表达主要由肝脏驱动。在小鼠中,经常通过将质粒注射至尾静脉中来进行流体动力学注射。在某些实施方案中,可以使用流体动力学注射施用编码本文所述的多肽的mRNA分子。

[0294] 本发明的药物组合物的剂量取决于因素,包括施用途径、待治疗的疾病和受试者的身体特征,例如年龄、体重、总体健康状况。本发明的药物组合物可以包括范围为如下的本发明的多肽的剂量:0.01至500mg/kg(例如,0.01、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、150、200、250、300、350、400、450或500mg/kg),并且在一个更具体实施方案中,约0.1至约30mg/kg,并且在一个更具体实施方案中,约0.3至约30mg/kg。剂量可以由医师根据常规因素、诸如疾病的程度和受试者的不同参数进行调整。

[0295] 药物组合物以与剂量制剂相容的方式和导致症状的改善或补救的治疗有效的量施用。药物组合物以各种剂型、例如静脉内剂型、皮下剂型和口服剂型(例如,可摄入的溶液、药物释放胶囊)施用。通常,治疗性蛋白以0.1-100mg/kg、例如1-50mg/kg给药。包含本发明的多肽的药物组合物可以施用于有此需要的受试者,例如,每天、每周、每两周、每月、每两月、每季度、每两年、每年一次或多次(例如,1-10次或更多次),或在医疗上必需时。在一些实施方案中,包含本发明的多肽的药物组合物可以每周、每两周、每月、每两月或每季度施用于有此需要的受试者。剂量可以以单剂量或多剂量方案提供。随着患者的健康状况下降,随着医疗条件改善或增加,施用之间的时机可以减少。

[0296] X.治疗方法

本发明是基于以下发现:将来自ActRIIA的细胞外部分的氨基酸取代到ActRIIB的细胞外部分内,产生具有改善特性的ActRIIB变体。通过将来自ActRIIA的残基引入ActRIIB内而生成的ActRIIB变体可以保留ActRIIB的有益特性,例如增加肌重量的能力以及对激活素A和B的高结合亲和力,并且获得ActRIIA的一些有益特性,例如与BMP9减少的结合亲和力或增加红血细胞水平的能力。由于ActRIIB变体含有受体的细胞外部分,因此它们将是可溶的并且能够通过结合并螯合配体(例如激活素A和B、肌肉生长抑制素、GDF11)与内源性激活素受体竞争,而不激活细胞内信号传导途径。因此,本文所述的细胞外ActRIIB变体可以用于治疗其中升高的激活素信号传导已牵涉发病机制的疾病或状况(例如其中已观察到激活素受体或激活素受体配体的增加表达的疾病或状况)。例如,肌肉生长抑制素的丧失已显示增加骨骼肌重量,提示肌肉生长抑制素抑制骨骼肌生长。肌肉生长抑制素还已牵涉促进纤维化,因为肌肉生长抑制素的丧失已显示减少纤维化,而增加的肌肉生长抑制素或激活素诱导纤维化。另外,激活素已发现在骨疾病中是上调的,并且已知抑制成骨细胞活性,提示增加的激活素水平促成骨疾病。激活素A还已发现在临床和实验性肺性高血压症中是升高

的。在另一个实例中,激活素受体配体GDF11在溶血性贫血的小鼠模型中是过表达的,并且与红血细胞产生中的缺陷有关。不希望受理论束缚,与激活素受体配体(例如GDF11、肌肉生长抑制素和/或激活素)结合并减少其与内源性激活素受体的结合或相互作用的治疗剂,可以具有用于治疗或预防各种疾病或状况的治疗效用,所述疾病或状况例如肌肉疾病、骨疾病、纤维化、贫血或PH(例如PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH)。

[0297] 本文所述的组合物和方法可以用于治疗和/或预防(例如预防其发展或治疗诊断有其的受试者)医学状况,例如肌肉疾病、骨疾病、低红血细胞水平(例如低血红蛋白水平或低红血细胞计数,例如贫血)、纤维化或PH(例如PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH)。在一些实施方案中,可以在有此需要的受试者中施用本文所述的多肽(例如包括细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体的多肽,例如有效量的ActRIIB变体),以增加肌重量和强度。在一些实施方案中,可以施用本文所述的多肽以增加瘦体重。与治疗之前获得的测量相比,本文所述的多肽可以增加肌重量或瘦体重。在一些实施方案中,受试者可能患有疾病或处于发展疾病的风险中,所述疾病导致肌无力或萎缩(例如骨骼肌无力或萎缩)。在一些实施方案中,本文所述的方法涉及影响患有涉及肌无力和萎缩的疾病或状况的受试者中的肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导(例如减少或抑制激活素、肌肉生长抑制素和/或BMP9与其内源性受体的结合)。

[0298] 在一些实施方案中,可以在有此需要的受试者中施用本文所述的多肽(例如包括细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体的多肽,例如有效量的ActRIIB变体),以增加骨矿物质密度、增加骨形成、增加骨强度、减少骨折的风险或减少骨再吸收。与治疗之前获得的测量相比,本文所述的多肽可以增加骨矿物质密度、增加骨形成或减少骨再吸收。在一些实施方案中,受试者可能患有疾病或处于发展疾病的风险中,所述疾病导致骨损伤(例如骨质疏松症或骨质减少症)。在一些实施方案中,本文所述的方法涉及影响患有骨损伤的疾病或状况的受试者中的肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导(例如减少或抑制激活素、肌肉生长抑制素和/或BMP9与其内源性受体的结合)。

[0299] 在一些实施方案中,可以在有此需要的受试者中施用本文所述的多肽(例如包括细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体的多肽,例如有效量的ActRIIB变体),以增加红血细胞水平(例如增加血红蛋白水平、增加红血细胞计数、增加血细胞比容、或增加红血细胞形成或产生)。与治疗之前获得的测量相比,本文所述的多肽可以增加红血细胞水平(例如增加血红蛋白水平、红血细胞计数、血细胞比容或红血细胞形成)。在一些实施方案中,受试者可能患有与低红血细胞水平相关的疾病或状况(例如贫血或失血)。在一些实施方案中,受试者可能患有贫血或失血或处于发展贫血或失血的风险中(例如由于其它疾病或状况、或由于医学治疗(例如化学疗法、放射疗法或手术),受试者可能处于发展贫血的风险中,所述其它疾病或状况例如慢性肾疾病、类风湿性关节炎、癌症或炎性疾病(例如克罗恩氏病、SLE或溃疡性结肠炎)。在一些实施方案中,本文所述的方法涉及影响患有涉及低红血细胞水平的疾病或状况(例如贫血或失血)的受试者中的肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导(例如减少或抑制激活素、肌肉生长抑制素和/或BMP9与其内源性受体的结合)。

[0300] 在一些实施方案中,可以在有此需要的受试者中施用本文所述的多肽(例如包括细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体的多肽,例如有效量的ActRIIB变体),以预防或减少纤维化。在一些实施方案中,可以施用本文所述的多肽,以减慢或停止纤维化的进展,以减少发展纤维化的风险,或减少(例如减少其频率或严重性)纤维化的一种或多种症状。与治疗之前的纤维化进展相比、或与未治疗的受试者中的纤维化进展相比,本文所述的多肽可以至少减少纤维化或减慢纤维化的进展。在一些实施方案中,受试者可能患有纤维化或处于发展纤维化的风险中(例如受试者可能患有与纤维化相关的疾病或状况,例如伤口、乙型或丙型肝炎、脂肪肝疾病、肾疾病(例如慢性肾疾病)、心脏病或动脉粥样硬化,或可能正在经历与纤维化发展相关的治疗,例如化学疗法、放射或手术)。在一些实施方案中,本文所述的多肽预防或延迟处于发展纤维化的风险中的受试者(例如正在接受化学疗法、放射或手术治疗的受试者,或患有与纤维化相关的疾病或状况,例如伤口、乙型或丙型肝炎、脂肪肝疾病、肾疾病(例如慢性肾疾病)、心脏病或动脉粥样硬化的受试者)中的纤维化发展。在一些实施方案中,本文所述的方法涉及影响患有纤维化或与纤维化有关的疾病或状况的受试者中的肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导(例如减少或抑制激活素、肌肉生长抑制素和/或BMP9与其内源性受体的结合)。

[0301] 在一些实施方案中,可以在有此需要的受试者中施用本文所述的多肽(例如包括细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体的多肽,例如有效量的ActRIIB变体),以治疗PH,减少PH(例如减少PH的一种或多种症状的严重性或频率,所述症状例如呼吸急促(呼吸困难),疲劳,腿、足、腹部(腹水)或颈部的肿胀(例如水肿),胸痛或压力,疾脉或心悸,嘴唇或皮肤呈蓝色(紫绀),头晕或晕厥),预防PH(例如预防其发展),减少发展PH的风险,或减慢或停止PH的进展。与治疗之前的观察到的症状或进展相比、或与未治疗的受试者中的PH症状或进展相比,本文所述的多肽可以减少PH的症状(例如减少一种或多种症状的严重性或频率,所述症状例如呼吸急促(呼吸困难),疲劳,腿、足、腹部(腹水)或颈部的肿胀(例如水肿),胸痛或压力,疾脉或心悸,嘴唇或皮肤呈蓝色(紫绀),头晕或晕厥),或减慢PH(例如PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH)的进展。在一些实施方案中,受试者可能患有PH或处于发展PH的风险中(例如受试者可能患有特发性PAH;受试者可能患有与PAH相关的疾病或状况(例如导致发展PAH的风险增加的疾病或状况),例如HIV感染、血吸虫病、门脉高压、肺静脉闭塞性疾病、肺毛细血管血管瘤病、肝硬化、先天性心脏异常、结缔组织/自身免疫性病症(例如硬皮病或狼疮)、或药物使用或滥用(例如甲基苯丙胺或可卡因使用);受试者可能具有PH的家族史(例如可遗传性PAH);受试者可能患有与静脉PH相关的疾病或状况(例如导致发展静脉PH的风险增加的疾病或状况),例如左心室收缩功能障碍、左心室舒张功能障碍、瓣膜性心脏病、先天性心肌病、或先天性/获得性肺静脉狭窄;受试者可能患有与低氧PH相关的疾病或状况(例如导致发展低氧PH的风险增加的疾病或状况),例如慢性阻塞性肺疾病(例如肺气肿)、间质性肺疾病、睡眠障碍性呼吸(例如睡眠呼吸暂停)、肺疾病(例如肺纤维化)、肺泡通气不足病症、长期暴露于高海拔或发育异常;受试者可能患有与血栓栓塞性PH有关的疾病或状况(例如导致发展血栓栓塞性PH的风险增加的疾病或状况),例如慢性血栓栓塞性肺性高血压症、或其它肺动脉阻塞(例如肺栓塞、血管肉瘤、动脉炎、先天性肺动脉狭窄或寄生虫感

染);或受试者可能患有与杂项PH相关的疾病或状况(例如导致发展杂项PH的风险增加的疾病或状况),例如血液系统疾病(例如慢性溶血性贫血、镰状细胞病)、系统性疾病(例如类肉瘤病、肺朗格汉斯细胞组织细胞增生症、淋巴管平滑肌瘤病、神经纤维瘤病或血管炎)、代谢病症(例如糖原贮积病、戈谢病或甲状腺疾病)、肺肿瘤血栓性微血管病、纤维化纵隔炎、慢性肾衰竭或节段性肺性高血压症(局限于一个或多个肺叶的肺性高血压症))。在一些实施方案中,本文所述的多肽预防或延迟处于发展PH的风险中的受试者(例如具有PH的家族史(例如可遗传性PAH)的受试者,或患有导致发展PAH(例如HIV感染、血吸虫病、肝硬化、先天性心脏异常、结缔组织/自身免疫性病症(例如硬皮病或狼疮)、或药物使用或滥用(例如甲基苯丙胺或可卡因使用)、静脉PH(例如左心室收缩功能障碍、左心室舒张功能障碍、瓣膜性心脏病、先天性心肌病、或先天性/获得性肺静脉狭窄)、低氧PH(例如慢性阻塞性肺疾病(例如肺气肿)、间质性肺疾病、睡眠障碍性呼吸(例如睡眠呼吸暂停)、肺疾病(例如肺纤维化)、肺泡通气不足病症、长期暴露于高海拔或发育异常)、血栓栓塞性PH(例如慢性血栓栓塞性肺性高血压症、或其它肺动脉阻塞(例如肺栓塞、血管肉瘤、动脉炎、先天性肺动脉狭窄或寄生虫感染))、或杂项PH(例如血液系统疾病(例如慢性溶血性贫血、镰状细胞病)、系统性疾病(例如类肉瘤病、肺朗格汉斯细胞组织细胞增生症、淋巴管平滑肌瘤病、神经纤维瘤病或血管炎)、代谢病症(例如糖原贮积病、戈谢病或甲状腺疾病)、肺肿瘤血栓性微血管病、纤维化纵隔炎、慢性肾衰竭或节段性肺性高血压症)的风险增加的疾病或状况的受试者)中的PH发展。在一些实施方案中,本文所述的方法涉及影响患有PH或与PH有关的疾病或状况的受试者中的肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导(例如减少或抑制激活素、肌肉生长抑制素和/或BMP9与其内源性受体的结合)。在一些实施方案中,PH是PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH。

[0302] 在一些实施方案中,包括本文所述的细胞外ActRIIB变体的多肽减少或抑制肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9与其内源性受体例如ActRIIA、ActRIIB和BMPRII(例如ActRIIB)的结合。与在不存在本发明的多肽的情况下,肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9与其内源性受体的结合相比,本文所述的多肽可以减少肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9与其内源性受体的结合。在一些实施方案中,影响肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导(例如减少或抑制肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9与其内源性受体例如ActRIIA、ActRIIB和BMPRII(例如ActRIIB)的结合)导致受试者的肌重量中的增加、受试者的骨矿物质密度或骨形成中的增加、受试者的骨再吸收中的减少、受试者的红血细胞水平(例如血红蛋白水平、血细胞比容或红血细胞计数,例如促进或增加红血细胞形成或产生)中的增加、受试者的纤维化或发展纤维化的风险中的减少、纤维化发展中的延迟、纤维化进展中的减少(例如减慢或抑制)、PH症状中的减少(例如呼吸急促(呼吸困难),疲劳,腿、足、腹部(腹水)或颈部的肿胀(例如水肿),胸痛或压力,疾脉或心悸,嘴唇或皮肤呈蓝色(紫绀),头晕或晕厥中的减少)、发展PH的风险中的减少、PH发展中的延迟和/或PH进展中的减少(例如减慢或抑制)。PH可以是PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH。

[0303] 在一些实施方案中,本文所述的多肽(例如包括细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体的多肽,例如有效量的ActRIIB变体)可以施用于受试者,以增加肌重量或强度,增加骨矿物质密度,增加骨形成,增加骨强度,减少骨折的风险,减少骨再吸收,增加红血细胞水平(例如增加血红蛋

白水平、增加血细胞比容、增加红血细胞计数、或诱导或增加红血细胞形成),预防或减少纤维化(例如减少纤维化、预防或延迟纤维化的发展、或减慢或停止纤维化的进展),预防或治疗PH(例如减少PH的症状、预防或延迟PH的发展、或减慢或停止PH的进展,所述PH例如PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH),或影响受试者中的肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导。与治疗之前获得的测量相比、或与得自患有相同疾病或状况的未治疗的受试者的测量相比,细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体,例如有效量的ActRIIB变体)可以增加肌重量或强度、增加骨矿物质密度、增加骨形成、增加骨强度、减少骨折的风险、减少骨再吸收、增加红血细胞水平、预防或减少纤维化、或预防或治疗PH。在一些实施方案中,本文所述的方法不引起受试者中的任何血管并发症,例如增加的血管通透性或渗漏。在本文所述的方法的一些实施方案中,受试者患有疾病或状况或处于发展疾病或状况的风险中,所述疾病或状况涉及肌无力和萎缩(例如杜兴氏肌营养不良症(DMD)、面肩肱型肌营养不良症(FSHD)、包涵体肌炎(IBM)、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、肌少症或癌症恶病质)。在本文所述的方法的一些实施方案中,受试者患有疾病或状况或处于发展疾病或状况的风险中,所述疾病或状况涉及骨损伤(例如原发性骨质疏松症、继发性骨质疏松症、骨质减少症、骨硬化症、骨折、骨癌或与癌症转移相关的骨损失、佩吉特氏病、肾性骨营养不良、治疗相关的骨损失、饮食相关的骨损失、肥胖治疗有关的骨损失、低重力相关的骨损失或固定相关的骨损失)。在本文所述的方法的一些实施方案中,受试者患有疾病或状况或处于发展疾病或状况的风险中,所述疾病或状况涉及低红血细胞水平(例如贫血或失血,例如与以下相关的贫血:癌症(例如多发性骨髓瘤、白血病、乳腺癌、肺癌、结肠癌)、癌症治疗(例如化学疗法或放射疗法)、骨髓增生异常综合症、慢性或急性肾疾病或衰竭(例如慢性肾疾病)、炎性或自身免疫性疾病(例如类风湿性关节炎、炎性肠病例如克罗恩氏病或溃疡性结肠炎、SLE)或手术)。在本文所述的方法的一些实施方案中,受试者患有疾病或状况或处于发展疾病或状况的风险中,所述疾病或状况涉及纤维化(例如化学治疗药物诱导的纤维化、放射诱导的纤维化、肺纤维化、肝纤维化(例如肝硬化)、肾纤维化(例如与慢性肾疾病相关的纤维化)、角膜纤维化、心脏纤维化、骨关节纤维化、组织纤维化、肿瘤基质、促纤维增生性肿瘤、手术粘连、肥厚性瘢痕、瘢痕疙瘩、或与以下有关的纤维化:伤口、烧伤、乙型或丙型肝炎感染、脂肪肝疾病、血吸虫感染、肾疾病、心脏病、黄斑变性、视网膜或玻璃体视网膜病变、全身性或局限性硬皮病、动脉粥样硬化或再狭窄)。在本文所述的方法的一些实施方案中,受试者患有疾病或状况或处于发展疾病或状况的风险中,所述疾病或状况涉及PH(例如PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH,例如特发性PAH;可遗传性PAH;与以下有关或由以下引起的PAH:HIV感染、血吸虫病、门脉高压、肺静脉闭塞性疾病、肺毛细血管血管瘤病、肝硬化、先天性心脏异常、结缔组织/自身免疫性病症(例如硬皮病或狼疮)、或药物使用或滥用(例如甲基苯丙胺或可卡因使用);与以下有关或由以下引起的静脉PH:左心室收缩功能障碍、左心室舒张功能障碍、瓣膜性心脏病、先天性心肌病、或先天性/获得性肺静脉狭窄;与以下有关或由以下引起的低氧PH:慢性阻塞性肺疾病(例如肺气肿)、间质性肺疾病、睡眠障碍性呼吸(例如睡眠呼吸暂停)、肺疾病(例如肺纤维化)、肺泡通气不足病症、长期暴露于高海拔或发育异常;与以下有关或由以下引起的血栓栓塞性PH:慢性血栓栓塞性肺性高血压症、或其它肺动脉阻塞(例如肺栓塞、血管肉瘤、动脉炎、先天性肺动脉狭窄或寄生虫感染);与以下有关或由以下

引起的杂项PH:血液系统疾病(例如慢性溶血性贫血、镰状细胞病)、系统性疾病(例如类肉瘤病、肺朗格汉斯细胞组织细胞增生症、淋巴管平滑肌瘤病、神经纤维瘤病或血管炎)、代谢病症(例如糖原贮积病、戈谢病或甲状腺疾病)、肺肿瘤血栓性微血管病、纤维化纵隔炎、慢性肾衰竭或节段性肺性高血压症)。

[0304] 本发明还包括通过向受试者施用有效量的本文所述的多肽(例如包括细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体的多肽),来治疗患有以下或处于发展以下的风险中的受试者的方法:杜兴氏肌营养不良症(DMD)、面肩肱型肌营养不良症(FSHD)、包涵体肌炎(IBM)、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、肌少症、癌症恶病质、原发性骨质疏松症、继发性骨质疏松症、骨质减少症、骨硬化症、骨折、骨癌或与癌症转移相关的骨损失、佩吉特氏病、肾性骨营养不良、治疗相关的骨损失、饮食相关的骨损失、肥胖治疗有关的骨损失、低重力相关的骨损失、固定相关的骨损失、贫血、失血、纤维化或PH(例如PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH)。

[0305] 在本文所述的任何方法中,患有骨疾病(例如骨损伤)或处于发展骨疾病(例如骨损伤)的风险中的受试者患有疾病或状况或处于发展疾病或状况的风险中,所述疾病或状况包括原发性骨质疏松症、继发性骨质疏松症、骨质减少症、骨硬化症、骨折、骨癌或与癌症转移相关的骨损失、佩吉特氏病、肾性骨营养不良、治疗相关的骨损失、饮食相关的骨损失、肥胖治疗有关的骨损失、低重力相关的骨损失、或固定相关的骨损失。在一些实施方案中,原发性骨质疏松症是与年龄相关或与激素相关(例如与雌激素中的下降相关)的骨质疏松症。在一些实施方案中,继发性骨质疏松症是固定诱导的或糖皮质激素诱导的骨质疏松症。在一些实施方案中,骨癌是多发性骨髓瘤,或与癌症转移相关的骨损失由多发性骨髓瘤引起。在一些实施方案中,由于用FGF-21或GLP-1的治疗、由于用含有FGF-21或GLP-1的治疗剂的治疗、由于2型糖尿病和/或肥胖的治疗、或由于癌症疗法(例如化学疗法或放射),发生治疗相关的骨损失。在一些实施方案中,饮食相关的骨损失是佝偻病(例如维生素D缺乏)。在一些实施例中,低重力相关的骨损失是与负荷相关的骨损失的缺乏。在一些实施方案中,与治疗之前获得的测量相比、或与通常在未治疗的受试者中观察到的骨矿物质密度相比,本文所述的方法增加骨矿物质密度(例如增加骨量),例如增加骨矿物质密度。在一些实施方案中,与治疗之前获得的测量相比、或与通常在未治疗的受试者中观察到的骨再吸收相比,本文所述的方法减少骨再吸收(例如减少骨分解代谢活性),例如减少骨再吸收。在一些实施方案中,与治疗之前获得的测量相比、或与通常在未治疗的受试者中观察到的骨形成相比,本文所述的方法增加骨形成(例如增加骨合成代谢活性或增加成骨),例如增加骨形成。在一些实施方案中,与治疗之前获得的测量相比、或与通常在未治疗的受试者中观察到的成骨细胞活性或成骨细胞生成相比,本文所述的方法增加成骨细胞活性或成骨细胞生成,例如增加成骨细胞活性或成骨细胞生成。在一些实施方案中,与治疗之前获得的测量相比、或与通常在未治疗的受试者中观察到的破骨细胞活性或破骨细胞生成相比,本文所述的方法减少破骨细胞活性或破骨细胞生成,例如减少破骨细胞活性或破骨细胞生成。在一些实施例中,骨是皮质骨或小梁骨。

[0306] 本发明还包括通过向受试者施用有效量的本文所述的多肽(例如包括细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体的多肽),来治疗患有贫血或失血或处于发展贫血或失血的风险中的受试者

的方法。在本文所述的任何方法中,具有低血红血细胞水平(例如低血红蛋白水平、低血细胞比容或低红血细胞计数)或处于发展低血红血细胞水平的风险中的受试者患有贫血或失血或处于发展贫血或失血的风险中。在一些实施方案中,贫血与以下有关:营养缺乏(例如维生素缺乏)、骨髓缺陷(例如阵发性夜间血红蛋白尿)、对药物治疗(例如抗逆转录病毒HIV药物)的不良反应、骨髓增生异常综合症、骨髓移植、癌症(例如实体瘤,例如乳腺癌、肺癌、结肠癌;淋巴系统肿瘤,例如慢性淋巴细胞性白血病、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤;或造血系统肿瘤,例如白血病或多发性骨髓瘤)、癌症治疗(例如放射或化学疗法,例如用含铂试剂的化学疗法)、炎性或自身免疫性疾病(例如类风湿性关节炎、其它炎性关节炎、系统性红斑狼疮(SLE)、急性或慢性皮肤病(例如牛皮癣)、或炎性肠病(例如克罗恩氏病或溃疡性结肠炎)、膀胱炎、胃炎)、急性或慢性肾疾病或衰竭(例如慢性肾疾病)包括特发性或先天性状况、急性或慢性肝疾病、急性或慢性出血、感染(例如疟疾、骨髓炎)、脾肿大、卟啉症、血管炎、溶血、尿道感染、血红蛋白病(例如镰状细胞病)、地中海贫血、丘斯二氏综合征、费尔蒂综合征、移植物抗宿主病、造血干细胞移植、骨髓纤维化、全血细胞减少症、纯红细胞再生障碍、过敏性紫癜、舒瓦克曼综合征(例如舒戴二氏综合征)、药物使用或滥用(例如酒精滥用)、或输血禁忌证(例如老年患者、具有同种或自身抗体的患者、儿科患者、患有心肺疾病的患者、出于宗教原因而反对输血的患者(例如一些耶和华见证人(Jehovah's Witnesses))。在一些实施方案中,贫血是再生障碍性贫血、缺铁性贫血、维生素缺乏性贫血、慢性疾病的贫血、与骨髓疾病有关的贫血、溶血性贫血、镰状细胞性贫血、小红细胞性贫血、低色素性贫血、铁粒幼细胞性贫血、戴布二氏贫血、范可尼贫血或难治性贫血伴胚细胞增多。本文所述的组合物和方法也可以用于治疗并未良好响应促红细胞生成素(EPO),或易受EPO的不利效应(例如高血压、头痛、血管血栓形成、流感样综合征、分流阻塞和心肌梗塞)影响的受试者。在一些实施方案中,失血是由于手术、创伤、伤口、溃疡、泌尿道出血、消化道出血、频繁献血或月经出血过多(例如月经过多)。在一些实施方案中,与治疗之前获得的测量相比,本文所述的方法增加红血细胞水平(例如血红蛋白水平、血细胞比容或红血细胞计数)。在一些实施方案中,与治疗之前获得的测量相比,本文所述的方法增加或诱导红血细胞形成。在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法减少受试者关于输血的需要(例如受试者不再需要输血,或与用本文所述的组合物和方法治疗前相比,受试者需要更不频繁的输血)。具有正常红血细胞水平的受试者也可以使用本文所述的方法和组合物进行治疗,以增加红血细胞水平,使得血液可以抽取且贮存用于在以后输血中的使用。

[0307] 本发明还包括通过向受试者施用有效量的本文所述的多肽(例如包括细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体的多肽),来治疗患有纤维化或处于发展纤维化的风险中的受试者的方法。在本文所述的任何方法中,受试者患有纤维化或处于发展纤维化的风险中。在一些实施方案中,纤维化是化学治疗药物诱导的纤维化、放射诱导的纤维化、肺纤维化(例如囊性纤维化,特发性纤维化,或与肺结核、肺炎或煤尘相关的纤维化)、肝纤维化(例如肝硬化、胆道闭锁)、肾纤维化(例如与慢性肾疾病相关的纤维化)、角膜纤维化、心脏纤维化(例如心内膜心肌纤维化或与心肌梗塞相关的纤维化)、骨髓纤维化、纵隔纤维化、腹膜后纤维化、关节纤维化、骨关节纤维化、组织纤维化(例如影响肌肉组织、皮肤表皮、皮肤真皮、肌腱、软骨、胰腺组织、子宫组织、神经组织、睾丸、卵巢、肾上腺、动脉、静脉、结肠、小肠、大肠、胆道或肠的纤

维化)、肿瘤基质、促纤维增生性肿瘤、手术粘连、肥厚性瘢痕或瘢痕疙瘩。在一些实施方案中、纤维化与以下有关:伤口、烧伤、乙型或丙型肝炎感染、脂肪肝疾病、血吸虫感染、肾疾病(例如慢性肾疾病)、心脏病、黄斑变性、视网膜或玻璃体视网膜病变、克罗恩氏病、全身性或局限性硬皮病、动脉粥样硬化或再狭窄。在一些实施方案中,受试者处于发展与以下相关的纤维化的风险中:癌症治疗(化学疗法或放射)、疾病或感染(例如肺结核、肺炎、心肌梗塞、乙型或丙型肝炎感染、脂肪肝疾病、血吸虫感染、肾疾病(例如慢性肾疾病)、心脏病、黄斑变性、视网膜或玻璃体视网膜病变、克罗恩氏病、全身性或局限性硬皮病、动脉粥样硬化、再狭窄)、手术、伤口或烧伤。在一些实施方案中,与治疗之前获得的测量相比、或与未治疗的受试者中的纤维化相比,本文所述的方法减少纤维化。在一些实施方案中,本文所述的方法预防纤维化的发展或减少发展纤维化的风险(例如与未治疗的受试者中的纤维化发展相比,减少发展纤维化的风险)。在一些实施方案中,本文所述的方法减慢或停止纤维化的进展(例如与治疗之前的进展相比、或与无治疗或未治疗的受试者中的进展相比,减慢纤维化的进展)。在一些实施方案中,本文所述的方法减少纤维化的一种或多种症状的频率或严重性。在一些实施方案中,与治疗之前的器官或组织功能相比,本文所述的方法改善器官或组织功能(例如具有纤维化的器官或组织的功能)。可以使用通常用于评估组织和器官功能的任何标准临床测试来评价组织和器官功能。

[0308] 本发明还包括通过向受试者施用有效量的本文所述的多肽(例如包括细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体的多肽),来治疗患有PH(例如PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH)或处于发展PH的风险中的受试者的方法。在本文所述的任何方法中,受试者可能患有PH(例如PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH)或处于发展PH的风险中。在一些实施方案中,PH是PAH。在一些实施方案中,PAH是特发性PAH。在一些实施方案中,PAH是可遗传性PAH。在一些实施方案中,PAH是与以下相关(例如由以下引起或与以下有关)的PAH:HIV感染、血吸虫病、门脉高压、肺静脉闭塞性疾病、肺毛细血管血管瘤病、肝硬化、先天性心脏异常、结缔组织/自身免疫性病症(例如硬皮病或狼疮)、或药物使用或滥用(例如甲基苯丙胺或可卡因使用)。在一些实施方案中,PH是静脉PH。在一些实施方案中,静脉PH是与以下相关(例如由以下引起或与以下有关)的静脉PH:左心室收缩功能障碍、左心室舒张功能障碍、瓣膜性心脏病、先天性心肌病、或先天性/获得性肺静脉狭窄。在一些实施方案中,PH是低氧PH。在一些实施方案中,低氧PH是与以下相关(例如由以下引起或与以下有关)的低氧PH:慢性阻塞性肺疾病(例如肺气肿)、间质性肺疾病、睡眠障碍性呼吸(例如睡眠呼吸暂停)、肺疾病(例如肺纤维化)、肺泡通气不足病症、长期暴露于高海拔或发育异常。在一些实施方案中,PH是血栓栓塞性PH。在一些实施方案中,血栓栓塞性PH是与以下相关(例如由以下引起或与以下有关)的血栓栓塞性PH:慢性血栓栓塞性肺性高血压症、或其它肺动脉阻塞(例如肺栓塞、血管肉瘤、动脉炎、先天性肺动脉狭窄或寄生虫感染)。在一些实施例中,PH是杂项PH。在一些实施方案中,杂项PH是与以下相关(例如由以下引起或与以下有关)的杂项PH:血液系统疾病(例如慢性溶血性贫血、镰状细胞病)、系统性疾病(例如类肉瘤病、肺朗格汉斯细胞组织细胞增生症、淋巴管平滑肌瘤病、神经纤维瘤病或血管炎)、代谢病症(例如糖原贮积病、戈谢病或甲状腺疾病)、肺肿瘤血栓性微血管病、纤维化纵隔炎、慢性肾衰竭或节段性肺性高血压症)。在一些实施例中,与治疗之前的症状频率或严重性相比,本文所述的方法减

少PH的症状(例如减少症状的严重性或频率,所述症状例如呼吸急促(呼吸困难),疲劳,腿、足、腹部(腹水)或颈部的肿胀(例如水肿),胸痛或压力,疾脉或心悸,嘴唇或皮肤呈蓝色(紫绀),头晕或晕厥)。在一些实施方案中,本文所述的方法预防PH的发展或减少发展PH的风险(例如与未治疗的受试者中的PH发展相比,减少发展PH(例如PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH)的风险)。在一些实施方案中,本文所述的方法减慢或停止PH的进展(例如与治疗之前的进展相比、或与无治疗或未治疗的受试者中的进展相比,减慢PH(例如PAH、静脉PH、低氧PH、血栓栓塞性PH或杂项PH)的进展)。在一些实施方案中,与治疗之前的血管重塑相比、或与未治疗的受试者中的血管重塑相比,本文所述的方法减少肺血管重塑或受试者的心脏中的血管重塑(例如心脏或肺中的血管重塑的起始或进展)。在一些实施方案中,与治疗之前的右心室肥大相比、或与未治疗的受试者中的右心室肥大相比,本文所述的方法减少右心室肥大(例如减少右心室肥大或右心室肥大的进展)。PH的症状可以在治疗前和治疗后使用标准临床测试进行评估。用于评估PH的常用测试包括心电图、肺功能测试、超声心动图、右心导管插入、计算机断层摄影扫描、肺血管阻力的测量以及6分钟步行测试。在一些实施方案中,本文所述的方法减少肺血管阻力(例如与治疗之前的肺血管阻力相比,导致肺血管阻力中的减少)。在一些实施方案中,与治疗之前的6分钟步行测试中的表现相比,本文所述的方法改善6分钟步行测试中的表现。

[0309] 在本文所述的任何方法中,通过两个Fc结构域单体的相互作用形成的二聚体(例如同二聚体或异二聚体)可以用作治疗性蛋白质,所述两个Fc结构域单体各自融合至包括细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体)的多肽。在本文所述的任何方法中,融合至部分(例如野生型Fc结构域、具有氨基酸取代(例如减少二聚化的一个或多个取代)的Fc结构域、白蛋白结合肽、纤连蛋白结构域或血清白蛋白)、包括细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体)的多肽可以用作治疗性蛋白质。编码本文所述的多肽的核酸、或含有所述核酸的载体也可以根据本文所述的任何方法进行施用。在本文所述的任何方法中,多肽、核酸或载体可以作为药物组合物的部分进行施用。

实施例

[0310] 提供下述实施例以进一步说明本发明的一些实施方案,但并不预期限制本发明的范围;它通过其示例性性质进行理解,可以可替代地使用本领域技术人员已知的其它程序、方法或技术。

[0311] 实施例1-细胞外ActRIIB变体对体重和肌重量的作用

C57Bl/6小鼠接受了质粒构建体的单次流体动力学注射,所述质粒构建体编码下述十四种多肽之一或媒介物对照(n=10/组,参见图1中提供的序列):

(1)媒介物,

(2)通过GGG接头与hFc的N末端融合的细胞外ActRIIA(SEQ ID NO:16);

(3)通过GGG接头与hFc的N末端融合的细胞外ActRIIB(SEQ ID NO:17);

(4)通过GGG接头与hFc的N末端融合的细胞外ActRIIB变体ActRIIB/A(SEQ ID NO:2);

(5)通过GGG接头与hFc的N末端融合的细胞外ActRIIB变体ActRIIBΔ9(SEQ ID NO:3);

(6)通过GGG接头与hFc的N末端融合的细胞外ActRIIB变体ActRIIB 2.01(SEQ ID NO:4);

(7)通过GGG接头与hFc的N末端融合的细胞外ActRIIB变体ActRIIB 2.02(SEQ ID NO:5);

(8)通过GGG接头与hFc的N末端融合的细胞外ActRIIB变体ActRIIB 2.03(SEQ ID NO:6);

(9)通过GGG接头与hFc的N末端融合的细胞外ActRIIB变体ActRIIB 2.04(SEQ ID NO:7);

(10)通过GGG接头与hFc的N末端融合的细胞外ActRIIB变体ActRIIB 2.05(SEQ ID NO:8);

(11)通过GGG接头与hFc的N末端融合的细胞外ActRIIB变体ActRIIB 2.06(SEQ ID NO:9);

(12)通过GGG接头与hFc的N末端融合的细胞外ActRIIB变体ActRIIB 2.07(SEQ ID NO:10);

(13)通过GGG接头与hFc的N末端融合的细胞外ActRIIB变体ActRIIB 2.08(SEQ ID NO:11);

(14)通过GGG接头与hFc的N末端融合的细胞外ActRIIB变体ActRIIB 2.09(SEQ ID NO:12);和

(15)通过GGG接头与hFc的N末端融合的细胞外ActRIIB变体ActRIIB 2.10(SEQ ID NO:13)。

[0312] 经过5-8秒,以10％体重的体积递送100μg质粒构建体。高体积和短注射期提供了将质粒引入质粒在其中表达的肝细胞内所需的压力,特别地目的蛋白质在强且普遍存在的启动子(pLEV113)下表达。目的蛋白质在肝细胞的内源性机制下分泌并自由循环。每周两次对小鼠称重,共28天,并且测量记录为距离基线测量的体重变化的百分比(图1、图2)。在研究结束时也对肌肉称重,并且以毫克记录测量(图3A和3B)。

[0313] 实施例2-通过表面等离振子共振(SPR)评估ActRIIB变体的结合亲和力GE Biacore 3000用于测量ActRIIB-Fc变体与配体激活素A、激活素B、生长分化因子11(GDF11)和BMP-9之间的相互作用的动力学。ActRIIA、ActRIIB、ActRIIB 2.06、ActRIIB 2.11和ActRIIB 2.12是重组蛋白质。所有其它ActRIIB-Fc变体通过在HEK293细胞中的瞬时表达来表达,并且使用Protein-A Sepharose层析从条件培养基中纯化。使用胺偶联试剂盒,使流动池1-4固定有来自GE的抗人/抗小鼠捕获抗体。然后将ActRII-Fc蛋白捕获到流动池2-4中的芯片上,其中流动池1留空作为参考池,以测量且扣除任何非特异性结合。来自GE Healthcare™的HBS-EP+缓冲液用作运行缓冲液。每种配体以40μl/分钟以一式两份浓度系列运行,以避免传质效应。除了使用CM-4的GDF-11之外,所有数据都在CM-5芯片上收集。通过BioLogic™软件使用Scrubber2分析数据,以计算每次相互作用的K_D(表3)。

[0314] 表3:ActRIIB变体与各种配体的结合亲和力(K_D)的比较

构建体	激活素 A (K_D)	激活素 B (K_D)	GDF-11 (K_D)	BMP-9 (K_D)
媒介物	N/A	N/A	N/A	N/A
ActRIIA (SEQ ID NO: 16)	1 nM	370 pM	81 pM	25 nM
ActRIIB (SEQ ID NO: 17)	63 pM	23 pM	120 pM	280 pM
ActRIIB/A 变体 (SEQ ID NO: 2)	未检测到	未检测到	未检测到	88 nM
ActRIIBΔ9 变体 (SEQ ID NO: 3)	390 nM	400 nM	530 nM	28 nM
ActRIIB 2.01 变体 (SEQ ID NO: 4)	未检测到	未检测到	未检测到	未检测到
ActRIIB 2.02 变体 (SEQ ID NO: 5)	未检测到	未检测到	未检测到	未检测到
ActRIIB 2.03 变体 (SEQ ID NO: 6)	未检测到	未检测到	未检测到	未检测到
ActRIIB 2.04 变体 (SEQ ID NO: 7)	未检测到	未检测到	未检测到	未检测到
ActRIIB 2.05 变体 (SEQ ID NO: 8)	未检测到	未检测到	未检测到	未检测到
ActRIIB 2.06 变体 (SEQ ID NO: 9)	53 pM	100 pM	27 pM	300 pM
ActRIIB 2.07 变体 (SEQ ID NO: 10)	未检测到	未检测到	未检测到	未检测到
ActRIIB 2.08 变体 (SEQ ID NO: 11)	未检测到	未检测到	未检测到	未检测到
ActRIIB 2.09 变体 (SEQ ID NO: 12)	100 pM	160 pM	Ka 2e6	440 pM
ActRIIB 2.10 变体 (SEQ ID NO: 13)	450 pM	280 pM	Ka 1.5e6	1.7 nM
ActRIIB 2.11 变体 (SEQ ID NO: 14)	780 pM	370 pM	240 pM	2.7 nM
ActRIIB 2.12 变体 (SEQ ID NO: 15)	140 pM	160 pM	130 pM	31 nM

。

[0315] 实施例3-细胞外ActRIIB变体对骨矿物质密度的作用

成年雄性C57/BL6小鼠接受假手术(SHAM)或去势手术(ORX)。两个手术组均允许在手术后恢复14天。所有动物都放在常规笼中,伴随对食物(常规食物)和水的自由接近。然后将SHAM和ORX动物指定至媒介物治疗组(VEH)或ActRII变体治疗组,并且接受媒介物或ActRII变体(10mg/kg)每两周一次的全身性腹膜内施用,共71天。在治疗时每周两次测量体重。使用MiniSpec LF50 NMR分析仪,在治疗的第0天,然后在治疗开始后的第14、28、47和71天,分析身体组成。在研究终止日期,手术切除目的组织(肌肉、脂肪库和胫骨),称重,并且适当贮存用于进一步分析。在这时,还检查了ORX动物,以确认睾丸的完全去除。在实验终止

后,还使用微型计算机断层摄影术评估了各个骨的皮质形态和小梁结构。

[0316] 实施例4-细胞外ActRIIB变体对肾纤维化的作用

使用肾纤维化的单侧输尿管梗阻(UUO)小鼠模型,来确定细胞外ActRllB变体对肾纤维化的作用。UUO模型涉及左输尿管的完全结扎,同时保持右肾功能完整。简言之,在麻醉下对小鼠执行UUO,由此经由胁腹切口接近左输尿管,并且使用相距5mm的丝线,将两个结扎线置于输尿管的近端三分之一上。假手术以类似的方式执行,而无需在输尿管上放置任何结扎线。在这种模型中,在UUO后的14天内,通过直接测量样品中羟脯氨酸的量来测量肾胶原蛋白评价了在肾中发展严重的纤维化。在UUO后十四天,肾干重由于肾实质损伤而减少。对16周龄的雄性C57BL/6小鼠执行假手术或UUO手术,并且将UUO手术小鼠分成两组。从手术前一天开始,和在手术后1、3、6、8、10和13天时,每个UUO组接受ActRllB变体(10mg/kg)或媒介物(给药的体重体积)的皮下注射,所述媒介物不与任何已知的小鼠蛋白质结合。假手术小鼠在这段时间内使用与UUO组相同的时间表接受媒介物(无菌PBS)。所有小鼠都在手术后第14天时处死。测量肾重量,并且使用液氮将肾快速冷冻,并且保持在-80℃下,直至通过测量羟脯氨酸的量来测量胶原蛋白含量,以评价纤维化。

[0317] 实施例5-细胞外ActRIIB变体对红血细胞的作用

每组十只雄性和十只雌性大鼠接受媒介物的两个SC剂量(第1天和第15天),或6、20或60mg/kg的ActRllB变体。在第29天时测量血液学参数。还进行研究以评估关于RBC、血红蛋白和血细胞比容诱导的时间过程和剂量应答。在第一项研究中,在第1天和第8天时接受ActRllB变体(10mg/kg)的皮下(SC)剂量的雄性和雌性大鼠中,调查了红细胞生成的时间过程。在给药前以及在第3、8、15、29和44天时,评估血液学参数。在第二项研究中,在第1天和第15天时接受媒介物的SC剂量,或0.4、2、10或30mg/kg的ActRllB变体的雄性和雌性大鼠中,调查了血液学剂量应答。在给药前以及在第13天和28天时,评估血液学参数。

[0318] 实施例6-细胞外ActRIIB变体对PAH的作用

在一个实验中,使用野百合碱(MCT,40mg/kg)的单次皮下注射,在雄性大鼠中诱导PAH。为了确定用ActRIIB变体的治疗是否可以预防PAH的发展,在PAH诱导后24小时,将大鼠随机分到媒介物或ActRIIB变体治疗组内,并且每周两次用ActRIIB变体(5或15mg/kg)或媒介物进行治疗,共21天。在第14天,通过心电图检查心室功能和右心室(RV)重塑,其通过用1.5%异氟烷麻醉大鼠,并且使用小型动物高频超声探头,以检测肺血流加速、右心室功能和肥大以及左心室功能,同时将动物保持在仰卧姿势。跨越二尖瓣和三尖瓣的多普勒用于确定用ActRIIB变体的治疗是否诱导任何明显的反流或病变。在第21天时,用戊巴比妥麻醉大鼠,通过气管进行插管,并且使用啮齿类动物呼吸机进行机械通气。使用充满流体的导管通过RV顶点评价血流动力学。大鼠用PBS随后为1%甲醛进行灌注。为了测量RV肥大(RVH),将心脏切除,并且从左心室加中隔(LV+S)解剖无RV壁,并且分开称重。RVH的程度由比率RV/(LV+S)确定。

[0319] 在第二个实验中,使用野百合碱(MCT,40mg/kg)的单次皮下注射,在雄性大鼠中诱导PAH。为了确定用ActRIIB变体的治疗是否可以减慢或减少PAH的进展,大鼠在第18天时再次用MCT进行注射,并且随机分到媒介物或ActRIIB变体治疗组内。大鼠每周3次用ActRIIB变体(15mg/kg)或媒介物进行注射。如上所述,在第35天时检查血流动力学和RVH。

[0320] 实施例7-使用基因萤光素酶报告测定评估ActRIIB变体

C2C12-BRE-萤光素酶和HEK293-SBE-萤光素酶细胞在96孔板上在补充有2%FBS的DMEM中铺平板,并且放置在培养箱中不少于三个小时以适应板表面。对于每种ActRIIB/A-Fc变体或阳性对照(ActRIIA-Fc和ActRIIB-Fc),在2%DMEM中制备稀释系列,并且与GDF-11、激活素A、激活素B和BMP-9一起在37℃下温育30分钟。ActRIIA、ActRIIB、ActRIIB 2.06、ActRIIB 2.11和ActRIIB 2.12是重组蛋白质。所有其它都是来自瞬时转染细胞的条件培养基。抽吸板中的培养基,并且将ActRIIB/A/配体混合物加入板中作为培养基替换。剩余的孔用于阳性对照和背景的重复。使板温育过夜,然后使用Promega Steady Glo和Molecular Devices Spectramax M5e读取。基于细胞的测定证实变体抑制在内源性细胞表面受体处的信号传导的能力。如表4中所示,除了ActRIIB/A和ActRIIB 2.11之外,变体具有激活素A、激活素B和GDF-11的可比较抑制,但与ActRIIB-Fc相比减弱的BMP9抑制。

[0321] 表4:来自萤光素酶报告测定的结果

构建体	激活素 A	激活素 B	GDF-11	BMP-9
ActRIIA (SEQ ID NO: 16)	390 ng/mL	210 ng/mL	390 ng/mL	100 μg/mL
ActRIIB (SEQ ID NO: 17)	65 ng/mL	240 ng/mL	140 ng/mL	82 ng/mL
ActRIIB/A 变体 (SEQ ID NO: 2)	>1 μg/mL	>1 μg/mL	>1 μg/mL	83 μg/mL
ActRIIBΔ9 变体 (SEQ ID NO: 3)	480 ng/mL	400 ng/mL	230 ng/mL	13 μg/mL
ActRIIB 2.06 变体 (SEQ ID NO: 9)	49 ng/mL	150 ng/mL	110 ng/mL	52 μg/mL
ActRIIB 2.09 变体 (SEQ ID NO: 12)	58 ng/mL	400 ng/mL	300 ng/mL	2.6 μg/mL
ActRIIB 2.10 变体 (SEQ ID NO: 13)	64 ng/mL	200 ng/mL	170 ng/mL	9.2 μg/mL
ActRIIB 2.11 变体 (SEQ ID NO: 14)	>1 μg/mL	>1 μg/mL	980 ng/mL	>100 μg/mL
ActRIIB 2.12 变体 (SEQ ID NO: 15)	270 ng/mL	160 ng/mL	15 ng/mL	>100 μg/mL

。

[0322] 实施例8-ActRIIB变体对体重和红血细胞量的作用

将八周龄的雄性C57BL/6小鼠分配到三组内(n=10/组)。各组用5ml/kg的媒介物(Tris-缓冲盐水,pH 7.4)或ActRllB 2.11(SEQ ID NO:14)-Fc或ActRllB 2.12(SEQ ID NO:15)-Fc(20mg/kg)进行给药。治疗每周两次进行腹膜内(IP)施用,共四周(八个剂量),并且研究在研究第28天时终止。研究自始至终在给药日时记录体重。另外,在研究终止时通过血液学评估红细胞量参数。如图4中所示,ActRllB 2.11-Fc和ActRllB 2.12-Fc在野生型小鼠中均增加了体重(*=p<0.05;****=p<0.01)。ActRIIB 2.12-Fc还增加了红细胞量的参数(***=p<0.001;****=p<0.0001),包括红血细胞计数、血红蛋白水平和血细胞比容(图5A-5C)。

[0323] 实施例9-ActRIIB变体在骨质疏松症的小鼠模型中的效应

C57BL/6小鼠在9周龄时接受了睾丸切除术(ORX)或假手术。在六周恢复期之后,在这段时间内,ORX小鼠发展骨质疏松症表型,ORX小鼠接受媒介物或ActRIIB 2.12(SEQ ID NO:15)-Fc(10mg/kg)每周两次的腹膜内注射。在给药开始后第11周进行Micro-CT(Perkin Elmer Quantum Fx)成像。每个数据集的ASBMR骨形态参数使用Bone Morphometry Analysis Add-on,用AnalyzePro软件(AnalyzeDirect,Overland Park KS)进行计算。选择紧邻远端到近端胫骨生长板的CT体积的50切片区域,以评价小梁骨参数中的变化。如图6A-6D中所示,用ActRIIB 2.12-Fc的治疗增加了骨体积,增加了骨体积分数,并且增加了与睾丸切除术相关的小梁数目(*=$p<0.05$;**=$p<0.01$)。这些数据指示,由于增加的骨形成,用ActRIIB 2.12-Fc治疗骨质疏松症小鼠增加了小梁骨量。

[0324] 实施例10-ActRIIB变体2.12对大鼠中的红血细胞量和小梁骨的作用经由侧尾静脉注射向四周龄的Sprague Dawley大鼠递送ActRIIB 2.12(SEQ ID NO:15)-Fc质粒DNA的流体动力学注射。在注射后四周,分析血液的血液学参数和ActRIIB 2.12-Fc水平。MicroCT成像(Perkin Elmer Quantum Fx)对胫骨离体执行。每个数据集的ASBMR骨形态参数使用Bone Morphometry Analysis Add-on,用AnalyzePro软件(AnalyzeDirect,Overland Park KS)进行计算。选择紧邻远端到近端胫骨生长板的CT体积的150切片区域,以评价小梁骨参数中的变化。如图7A-7C中所示,ActRIIB 2.12-Fc增加了野生型大鼠中的红血细胞量的参数(*=$p<0.05$;**=$p<0.01$),包括红血细胞计数、血红蛋白水平和血细胞比容。ActRIIB 2.12-Fc还增加了野生型大鼠中的小梁骨(小梁骨体积、小梁骨分数和小梁厚度)(图8A-8E;*=$p<0.05$;**=$p<0.01$)。这些数据指示,在野生型大鼠中用ActRIIB 2.12-Fc的治疗增加了小梁骨量。

[0325] 实施例11-通过施用细胞外ActRIIB变体来治疗肌肉疾病

根据本文公开的方法,本领域医生可以治疗患有肌肉疾病(例如DMD、ALS或包涵体肌炎)的受试者,例如人患者,以便增加肌重量或维持或改善肌肉强度(例如减少肌无力)。治疗方法可以包括基于用于肌肉疾病的标准临床测试(例如血液测试、肌肉活组织检查、遗传测试和/或肌电图),将受试者诊断或鉴定为用于治疗的候选者。为了治疗受试者,本领域的医生可以向受试者施用含有细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体)的组合物。含有细胞外ActRIIB变体的组合物可以例如通过肠胃外注射(例如静脉内注射)、或通过局部施用(例如注射到肌肉内)施用于受试者,以治疗肌肉疾病。细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体)以治疗有效量施用,所述治疗有效量例如0.01至500mg/kg(例如0.01、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、150、200、250、300、350、400、450或500mg/kg)。在一些实施方案中,细胞外ActRIIB变体每两个月一次、每月一次、每两周一次、或每周至少一次或更多次(例如每周1、2、3、4、5、6或7次或更多次)施用。细胞外ActRIIB变体以足以增加肌重量或维持或改善肌肉强度(例如减少肌无力)的量施用。

[0326] 在组合物施用于患者之后,本领域技术人员可以通过各种方法监测患者响应疗法的改善。例如,医生可以监测患者的肌重量、肌肉强度和运动功能。与组合物施用之前的测试结果相比,在组合物施用之后患者显示出增加的肌重量或维持或改善肌肉强度的发现,指示患者良好地响应治疗应。后续剂量可以根据需要进行确定且施用。

[0327] 实施例12-通过施用细胞外ActRIIB变体来治疗骨疾病

根据本文公开的方法,本领域医生可以治疗患有骨疾病(例如骨质疏松症或骨质减少症)的受试者,例如人患者,以便增加骨矿物质密度、增加骨形成、减少骨再吸收、减少骨损失或减少骨折的风险。治疗方法可以包括基于用于骨矿物质密度的标准临床测试(例如双X射线吸收法),将受试者诊断或鉴定为用于治疗的候选者。为了治疗受试者,本领域的医生可以向受试者施用含有细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体)的组合物。含有细胞外ActRIIB变体的组合物可以例如通过肠胃外注射(例如静脉内注射)施用于受试者,以治疗骨疾病。细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体)以治疗有效量施用,所述治疗有效量例如0.01至500mg/kg(例如0.01、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、150、200、250、300、350、400、450或500mg/kg)。在一些实施方案中,细胞外ActRIIB变体每两个月一次、每月一次、每两周一次、或每周至少一次或更多次(例如每周1、2、3、4、5、6或7次或更多次)施用。细胞外ActRIIB变体以足以增加骨矿物质密度、增加骨形成、减少骨再吸收、减少骨损失或减少骨折的风险的量施用。

[0328] 在组合物施用于患者之后,本领域技术人员可以通过各种方法监测患者响应疗法的改善。例如,医生可以通过执行双X射线吸收法监测患者的骨矿物质密度。与组合物施用之前的测试结果相比,在组合物施用之后患者显示出增加的骨矿物质密度、增加的骨形成、减少的骨再吸收、减少的骨损失或减少的骨折风险的发现,指示患者良好地响应治疗应。后续剂量可以根据需要进行确定且施用。

[0329] 实施例13-通过施用细胞外ActRIIB变体来治疗贫血

根据本文公开的方法,本领域医生可以治疗患有贫血(例如维生素缺乏症贫血或与慢性肾疾病相关的贫血)的受试者,例如人患者,以便增加红血细胞量的参数,例如红血细胞计数、血红蛋白水平或血细胞比容。治疗方法可以包括基于测量血液学参数的血液测试,将受试者诊断或鉴定为用于治疗的候选者。为了治疗受试者,本领域的医生可以向受试者施用含有细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体)的组合物。含有细胞外ActRIIB变体的组合物可以例如通过肠胃外注射(例如静脉内注射)施用于受试者,以治疗贫血疾病。细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体)以治疗有效量施用,所述治疗有效量例如0.01至500mg/kg(例如0.01、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、150、200、250、300、350、400、450或500mg/kg)。在一些实施方案中,细胞外ActRIIB变体每两个月一次、每月一次、每两周一次、或每周至少一次或更多次(例如每周1、2、3、4、5、6或7次或更多次)施用。细胞外ActRIIB变体以足以增加血红蛋白水平、增加红血细胞计数或增加血细胞比容的量施用。

[0330] 在组合物施用于患者之后,本领域技术人员可以通过各种方法监测患者响应疗法的改善。例如,医生可以通过执行血液测试来监测患者的血红蛋白水平、红血细胞计数或血细胞比容。与组合物施用之前的测试结果相比,在组合物施用之后患者显示出改善的血红蛋白水平、红血细胞计数或血细胞比容的发现,指示患者良好地响应治疗应。后续剂量可以根据需要进行确定且施用。

[0331] 实施例14-通过施用细胞外ActRIIB变体来治疗纤维化

根据本文公开的方法,本领域医生可以治疗患有纤维化(例如肺纤维化或与慢性肾疾病相关的纤维化)的受试者,例如人患者,以便减少纤维化的症状或减慢或停止纤维化的进展。治疗方法可以包括基于用于纤维化的临床测试(例如成像测试,例如X射线或CT扫描),将受试者诊断或鉴定为用于治疗的候选者。为了治疗受试者,本领域的医生可以向受试者施用含有细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体)的组合物。含有细胞外ActRIIB变体的组合物可以例如通过肠胃外注射(例如静脉内注射)施用于受试者,以治疗纤维化,或可以局部施用(例如注射)到纤维化组织或器官。细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体)以治疗有效量施用,所述治疗有效量例如0.01至500mg/kg(例如0.01、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、150、200、250、300、350、400、450或500mg/kg)。在一些实施方案中,细胞外ActRIIB变体每两个月一次、每月一次、每两周一次、或每周至少一次或更多次(例如每周1、2、3、4、5、6或7次或更多次)施用。细胞外ActRIIB变体以足以减少纤维化的症状或减慢或停止纤维化的进展的量施用。

[0332] 在组合物施用于患者之后,本领域技术人员可以通过各种方法监测患者响应疗法的改善。例如,医生可以通过执行成像测试来监测患者的纤维化,并且可以使用标准临床测试来监测患者的症状。与组合物施用之前的测试结果相比,在组合物施用之后患者的症状减少或患者纤维化的进展减慢或停止的发现,指示患者良好地响应治疗应。后续剂量可以根据需要进行确定且施用。

[0333] 实施例15-通过施用细胞外ActRIIB变体来治疗肺性高血压症根据本文公开的方法,本领域医生可以治疗患有肺性高血压症(PH,例如PAH)的受试者,例如人患者,以便减少PH的症状或减慢或停止PH的进展。治疗方法可以包括基于用于PH的标准临床测试(例如超声心动图、心电图、胸部X射线或右心导管插入),将受试者诊断或鉴定为用于治疗的候选者。为了治疗受试者,本领域的医生可以向受试者施用含有细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体)的组合物。含有细胞外ActRIIB变体的组合物可以例如通过肠胃外注射(例如静脉内注射)施用于受试者,以治疗PH。细胞外ActRIIB变体(例如具有SEQ ID NO:1-15(例如SEQ ID NO:2-15)中任何一个的序列的细胞外ActRIIB变体)以治疗有效量施用,所述治疗有效量例如0.01至500mg/kg(例如0.01、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、150、200、250、300、350、400、450或500mg/kg)。在一些实施方案中,细胞外ActRIIB变体每两个月一次、每月一次、每两周一次、或每周至少一次或更多次(例如每周1、2、3、4、5、6或7次或更多次)施用。细胞外ActRIIB变体以足以减少PH的症状或减慢或停止PH的进展的量施用。

[0334] 在组合物施用于患者之后,本领域技术人员可以通过各种方法监测患者响应疗法的改善。例如,医生可以使用标准临床测试和患者自我报告来监测患者的症状。与组合物施用之前的测试结果相比,在组合物施用之后患者的PH症状减少或患者的PH进展减慢或停止的发现,指示患者良好地响应治疗应。后续剂量可以根据需要进行确定且施用。

[0335] 其它实施方案

尽管已经结合本发明的具体实施方案描述了本发明,但应该理解,其能够进行进一步的修改,并且本申请旨在覆盖本发明的任何变型、用途或调整,其遵循一般而言本发明的原理且包括属于本发明所属领域内的已知或惯常实践的与本公开的此类偏离,并且可以应用于上文所述的基本特征。

[0336] 所有出版物、专利和专利申请均通过引用以其整体并入本文,其程度如同每个单独的出版物、专利或专利申请被具体和单独地指出通过引用以其整体并入。

[0337] 其他实施方案在以下权利要求内。

[0338] 本发明涉及:

1.一种包含细胞外激活素受体IIB型(ActRIIB)变体的多肽,所述变体具有相对于GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT (SEQ ID NO: 17),的序列的一个或多个氨基酸取代,其中所述变体包含赋予相对于野生型细胞外ActRIIB的减少的BMP9结合的一个或多个氨基酸取代和一个或多个另外的氨基酸取代,其中减少BMP9结合的所述取代包含以下中的一个或多个:

a)氨基酸取代E75K;

b)氨基酸取代Q69T和E70D;或

c)氨基酸取代Q69D和E70T。

[0339] 2.项目1的多肽,其中所述变体包含选自以下的一个或多个氨基酸取代:I11L、Y12F、L19K、E20D、S25T、L27V、R29P、E31Y、E33D、Q34K、L38R、Y41F、R45K、S47I、S48T、T50S、I51L、L53I、K56Q、F63I、T74K、E76D、N77S、Q79E和F89M。

[0340] 3.项目1或2的多肽,其中所述变体包含氨基酸取代E75K、E20D和F63I。

[0341] 4.项目1或2的多肽,其中所述变体包含氨基酸取代E75K。

[0342] 5.项目4的多肽,其中所述变体包含氨基酸取代T74K、E76D、N77S和Q79E。

[0343] 6.项目5的多肽,其中所述变体进一步包含一个或多个另外的氨基酸取代。

[0344] 7.项目6的多肽,其中所述变体包含氨基酸取代Y41F、R45K和K56Q。

[0345] 8.项目7的多肽,其中所述变体进一步包含氨基酸取代Y12F、L19K、E20D、R29P、E31Y、E33D、L38R和F63I。

[0346] 9.项目6的多肽,其中所述变体包含氨基酸取代S25T和S47I。

[0347] 10.项目9的多肽,其中所述变体包含氨基酸取代S48T。

[0348] 11.项目6的多肽,其中所述变体包含氨基酸取代R29P。

[0349] 12.项目6的多肽,其中所述变体包含氨基酸取代E31Y、E33D和Q34K。

[0350] 13.项目6的多肽,其中所述变体包含氨基酸取代Y12F、L19K和E20D。

[0351] 14.项目6的多肽,其中所述变体包含氨基酸取代E31Y、E33D和L38R。

[0352] 15.项目1或2的多肽,其中所述变体包含氨基酸取代Q69T和E70D,和另外的氨基酸取代I11L、L27V、Q34K、T50S、I51L、L53I和F89M。

[0353] 16.项目1或2的多肽,其中所述变体包含氨基酸取代Q69D和E70T,和另外的氨基酸取代I11L、L27V、Q34K、T50S、I51L、L53I和F89M。

[0354] 17.项目15或16的多肽,其中所述变体包含氨基酸取代E75K。

[0355] 18.项目1或2的多肽,其中所述变体具有SEQ ID NO:2-15中任何一个的序列。

[0356] 19.项目1-18中任一项的多肽,其进一步包含通过接头与所述多肽的C末端融合的Fc结构域单体。

[0357] 20.项目19的多肽,其中所述Fc结构域单体包含SEQ ID NO:19的序列。

[0358] 21.项目19或20的多肽,其中所述多肽形成二聚体。

[0359] 22.项目1-18中任一项的多肽,其包含通过接头与所述多肽的C末端融合的野生型Fc结构域。

[0360] 23.项目22的多肽,其中所述野生型Fc结构域包含SEQ ID NO:71的序列。

[0361] 24.项目1-18中任一项的多肽,其包含具有氨基酸取代的Fc结构域,所述Fc结构域通过接头与所述多肽的C末端融合。

[0362] 25.项目24的多肽,其中所述Fc结构域不形成二聚体。

[0363] 26.项目1至18中任一项的多肽,其包含通过接头与所述多肽的C末端融合的白蛋白结合肽。

[0364] 27.项目26的多肽,其中所述白蛋白结合肽包含SEQ ID NO:72的序列。

[0365] 28.项目1至18中任一项的多肽,其包含通过接头与所述多肽的C末端融合的纤连蛋白结构域。

[0366] 29.项目28的多肽,其中所述纤连蛋白结构域包含SEQ ID NO:73的序列。

[0367] 30.项目1-18中任一项的多肽,其包含通过接头与所述多肽的C末端融合的人血清白蛋白。

[0368] 31.项目30的多肽,其中所述人血清白蛋白包含SEQ ID NO:74的序列。

[0369] 32.项目19-31中任一项的多肽,其中所述接头是氨基酸间隔物。

[0370] 33.项目32的多肽,其中所述氨基酸间隔物是GGG、GGGA(SEQ ID NO:20)、GGGG(SEQ ID NO:22)、GGGAG(SEQ ID NO:52)、GGGAGG(SEQ ID NO:53)、或GGGAGGG(SEQ ID NO:54)。

[0371] 34.项目1-33中任一项的多肽,其中所述多肽具有至少七天的血清半衰期。

[0372] 35.项目1-34中任一项的多肽,其中所述多肽以200pM或更高的K_D与人骨形态生成蛋白9(BMP9)结合。

[0373] 36.项目1-35中任一项的多肽,其中所述多肽与激活素和/或肌肉生长抑制素结合,并且具有与人BMP9减少的结合或弱结合。

[0374] 37.项目35或36的多肽,其中所述多肽基本上不与人BMP9结合。

[0375] 38.项目1-37中任一项的多肽,其中所述多肽以800pM或更小的K_D与人激活素A结合。

[0376] 39.项目1-38中任一项的多肽,其中所述多肽以800pM或更小的K_D与人激活素B结合。

[0377] 40.项目1-39中任一项的多肽,其中所述多肽以5pM或更高的K_D与人GDF-11结合。

[0378] 41.一种核酸分子,其编码项目1-40中任一项的多肽。

[0379] 42.一种载体,其包含项目41的核酸分子。

[0380] 43.一种表达项目1-40中任一项的多肽的宿主细胞,其中所述宿主细胞包含项目41的核酸分子或项目42的载体,其中所述核酸分子或载体在宿主细胞中表达。

[0381] 44.一种制备项目1-43中任一项的多肽的方法,所述方法包括:

a)提供包含项目41的核酸分子或项目42的载体的宿主细胞,和

b)在允许所述多肽形成的条件下,在所述宿主细胞中表达核酸分子或载体。

[0382] 45.一种药物组合物,其包含项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子或项目42的载体,和一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂。

[0383] 46.项目45的药物组合物,其中所述多肽为治疗有效量。

[0384] 47.一种增加有此需要的受试者中的瘦体重的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0385] 48.一种增加有此需要的受试者的肌重量的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0386] 49.项目48的方法,其中所述受试者患有杜兴氏肌营养不良症、面肩肱型肌营养不良症、包涵体肌炎、肌萎缩侧索硬化症、肌少症或癌症恶病质。

[0387] 50.一种影响患有涉及肌无力和萎缩的疾病或状况的受试者中的肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0388] 51.项目50所述的方法,其中所述疾病或状况是杜兴氏肌营养不良症、面肩肱型肌营养不良症、包涵体肌炎、肌萎缩侧索硬化症、肌少症或癌症恶病质。

[0389] 52.一种治疗患有杜兴氏肌营养不良症或处于发展杜兴氏肌营养不良症的风险中的受试者的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0390] 53.一种治疗患有面肩肱型肌营养不良症或处于发展面肩肱型肌营养不良症的风险中的受试者的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0391] 54.一种治疗患有包涵体肌炎或处于发展包涵体肌炎的风险中的受试者的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0392] 55.一种治疗患有肌萎缩侧索硬化症或处于发展肌萎缩侧索硬化症的风险中的受试者的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0393] 56.一种治疗患有肌少症或处于发展肌少症的风险中的受试者的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0394] 57.一种治疗患有癌症恶病质或处于发展癌症恶病质的风险中的受试者的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0395] 58.一种增加有此需要的受试者中的骨矿物质密度的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0396] 59.一种减少有此需要的受试者中的骨再吸收的方法,其包括向所述受试者施用

治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0397] 60.一种增加有此需要的受试者中的骨形成的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0398] 61.一种增加有此需要的受试者中的骨强度的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0399] 62.一种减少有此需要的受试者中的骨折风险的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0400] 63.项目58-62中任一项的方法,其中所述受试者患有原发性骨质疏松症、继发性骨质疏松症、骨质减少症、骨硬化症、骨折、骨癌或与癌症转移相关的骨损失、佩吉特氏病、肾性骨营养不良、治疗相关的骨损失、饮食相关的骨损失、肥胖治疗有关的骨损失、低重力相关的骨损失或固定相关的骨损失。

[0401] 64.一种影响患有涉及骨损伤的疾病或状况的受试者中的肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0402] 65.项目64的方法,其中所述疾病或状况是原发性骨质疏松症、继发性骨质疏松症、骨质减少症、骨硬化症、骨折、骨癌或与癌症转移相关的骨损失、佩吉特氏病、肾性骨营养不良、治疗相关的骨损失、饮食相关的骨损失、肥胖治疗有关的骨损失、低重力相关的骨损失或固定相关的骨损失。

[0403] 66.一种治疗患有骨疾病或处于发展骨疾病的风险中的受试者的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0404] 67.项目66的方法,其中所述骨疾病是原发性骨质疏松症、继发性骨质疏松症、骨质减少症、骨硬化症、骨折、骨癌或与癌症转移相关的骨损失、佩吉特氏病、肾性骨营养不良、治疗相关的骨损失、饮食相关的骨损失、肥胖治疗有关的骨损失、低重力相关的骨损失或固定相关的骨损失。

[0405] 68.一种治疗患有原发性骨质疏松症的受试者的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0406] 69.一种治疗患有继发性骨质疏松症的受试者的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0407] 70.一种治疗患有骨质减少症的受试者的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0408] 71.一种治疗患有骨癌或与癌症转移相关的骨损失的受试者的方法,其包括向所

述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0409] 72.一种治疗患有佩吉特氏病的受试者的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0410] 73.一种治疗患有肾性骨营养不良的受试者的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0411] 74.一种治疗患有治疗相关的骨损失的受试者的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0412] 75.一种治疗患有饮食相关的骨损失的受试者的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0413] 76.一种治疗患有低重力相关的骨损失的受试者的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0414] 77.一种治疗患有固定相关的骨损失的受试者的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0415] 78.项目63、65、67或68中任一项的方法,其中所述原发性骨质疏松症是与年龄相关的骨质疏松症或与激素相关的骨质疏松症。

[0416] 79.项目63、65、67或69中任一项的方法,其中所述继发性骨质疏松症是固定诱导的骨质疏松症或糖皮质激素诱导的骨质疏松症。

[0417] 80.项目63、65、67或71中任一项的方法,其中所述癌症是多发性骨髓瘤。

[0418] 81.项目63、65、67或74中任一项的方法,其中所述治疗是FGF-21治疗、GLP-1治疗、癌症疗法、或用于肥胖或2型糖尿病的治疗。

[0419] 82.项目63、65、67或75中任一项的方法,其中所述饮食相关的骨损失是佝偻病。

[0420] 83.项目58-82中任一项的方法,其中所述受试者处于骨折的风险中。

[0421] 84.项目58-83中任一项的方法,其中所述方法增加受试者中的骨形成。

[0422] 85.项目58-84中任一项的方法,其中所述方法减少受试者中的骨再吸收。

[0423] 86.项目58-85中任一项的方法,其中所述方法增加成骨细胞活性或成骨细胞生成。

[0424] 87.项目58-86中任一项的方法,其中所述方法减少破骨细胞活性或减少破骨细胞生成。

[0425] 88.项目58-87中任一项的方法,其中所述方法减少骨折的风险。

[0426] 89.项目58-88中任一项的方法,其中所述方法增加骨强度。

[0427] 90.项目58-89中任一项的方法,其中所述骨是皮质骨。

[0428] 91.项目58-89中任一项的方法,其中所述骨是小梁骨。

[0429] 92.一种减少或预防有此需要的受试者中的纤维化的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0430] 93.一种治疗患有纤维化或处于发展纤维化的风险中的受试者的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0431] 94.一种减慢或抑制有此需要的受试者中的纤维化进展的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0432] 95.一种影响受试者中的肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导的方法,所述受试者患有纤维化或处于发展纤维化的风险中、或患有涉及纤维化的疾病或状况或处于发展涉及纤维化的疾病或状况的风险中,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0433] 96.项目92-95中任一项的方法,其中所述纤维化是化学治疗药物诱导的纤维化、放射诱导的纤维化、肺纤维化、肝纤维化、肾纤维化、角膜纤维化、心脏纤维化、骨髓纤维化、纵隔纤维化、腹膜后纤维化、骨关节纤维化、关节纤维化、组织纤维化、肿瘤基质、促纤维增生性肿瘤、手术粘连、肥厚性瘢痕或瘢痕疙瘩。

[0434] 97.项目96的方法,其中所述组织纤维化是影响选自以下的组织的纤维化:肌肉组织、皮肤表皮、皮肤真皮、肌腱、软骨、胰腺组织、子宫组织、神经组织、睾丸、卵巢、肾上腺、动脉、静脉、结肠、小肠、大肠、胆道和肠。

[0435] 98.项目92-95中任一项的方法,其中所述纤维化是与以下有关的纤维化:伤口、烧伤、乙型或丙型肝炎感染、脂肪肝疾病、血吸虫感染、肾疾病、慢性肾疾病、心脏病、黄斑变性、视网膜或玻璃体视网膜病变、克罗恩氏病、全身性或局限性硬皮病、动脉粥样硬化或再狭窄。

[0436] 99.项目92-98中任一项的方法,其中所述方法改善纤维化组织或器官的功能。

[0437] 100.一种增加有此需要的受试者中的红血细胞水平的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0438] 101.一种促进或增加有此需要的受试者中的红血细胞形成的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0439] 102.项目100或101的方法,其中所述受试者患有贫血或失血或处于发展贫血或失血的风险中。

[0440] 103.一种影响受试者中的肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导的方法,所述受试者患有涉及低红血细胞或低血红蛋白水平的疾病或状况、或处于发展涉及低红血细胞或低血红蛋白水平的疾病或状况的风险中,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0441] 104.项目103的方法,其中所述疾病或状况是贫血或失血。

[0442] 105.项目102或104的方法,其中所述贫血或失血与以下有关:癌症、癌症治疗、慢性肾疾病、急性肾疾病或衰竭、慢性肾疾病或衰竭、骨髓增生异常综合症、地中海贫血、营养缺乏、对药物的不良反应、炎性或自身免疫性疾病、脾肿大、卟啉症、血管炎、溶血、骨髓缺损、骨髓移植、急性肝疾病、慢性肝疾病、急性出血、慢性出血、感染、血红蛋白病、药物使用、酒精滥用、丘斯二氏综合征、费尔蒂综合征、移植物抗宿主病、造血干细胞移植、骨髓纤维化、全血细胞减少症、纯红细胞再生障碍、过敏性紫癜、舒瓦克曼综合征、高龄、输血禁忌证、手术、创伤、伤口、溃疡、泌尿道出血、消化道出血、频繁献血或月经出血过多。

[0443] 106.项目102、104或105的方法,其中所述贫血是再生障碍性贫血、缺铁性贫血、维生素缺乏性贫血、慢性疾病的贫血、与骨髓疾病有关的贫血、溶血性贫血、镰状细胞性贫血、小红细胞性贫血、低色素性贫血、铁粒幼细胞性贫血、戴布二氏贫血、范可尼贫血或难治性贫血伴胚细胞增多。

[0444] 107.一种治疗患有贫血或处于发展贫血的风险中的受试者的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0445] 108.项目107的方法,其中所述贫血与以下有关:癌症、癌症治疗、慢性肾疾病、急性肾疾病或衰竭、慢性肾疾病或衰竭、骨髓增生异常综合症、地中海贫血、营养缺乏、对药物的不良反应、炎性或自身免疫性疾病、脾肿大、卟啉症、血管炎、溶血、骨髓缺损、骨髓移植、急性肝疾病、慢性肝疾病、急性出血、慢性出血、感染、血红蛋白病、药物使用、酒精滥用、丘斯二氏综合征、费尔蒂综合征、移植物抗宿主病、造血干细胞移植、骨髓纤维化、全血细胞减少症、纯红细胞再生障碍、过敏性紫癜、舒瓦克曼综合征、高龄、输血禁忌证、手术、创伤、伤口、溃疡、泌尿道出血、消化道出血、频繁献血或月经出血过多。

[0446] 109.项目107或108的方法,其中所述贫血是再生障碍性贫血、缺铁性贫血、维生素缺乏性贫血、慢性疾病的贫血、与骨髓疾病有关的贫血、溶血性贫血、镰状细胞性贫血、小红细胞性贫血、低色素性贫血、铁粒幼细胞性贫血、戴布二氏贫血、范可尼贫血或难治性贫血伴胚细胞增多。

[0447] 110.项目100-109中任一项的方法,其中所述受试者并未良好响应用促红细胞生成素(EPO)的治疗,或易受EPO的不利效应影响。

[0448] 111.项目100-110中任一项的方法,其中所述方法增加红血细胞形成、红血细胞计数、血细胞比容或血红蛋白水平。

[0449] 112.项目100-111中任一项的方法,其中所述方法减少所述受试者对于输血的需要。

[0450] 113.一种预防在有此需要的受试者中的肺性高血压症(PH)的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0451] 114.一种减慢或抑制有此需要的受试者中的PH进展的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0452] 115.一种治疗患有PH或处于发展PH的风险中的受试者的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目

45或46的药物组合物。

[0453] 116.一种影响患有PH或处于发展PH的风险中的受试者中的肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的项目1-40中任一项的多肽、项目41的核酸分子、项目42的载体、或项目45或46的药物组合物。

[0454] 117.项目113-116中任一项的方法,其中所述PH是肺动脉高压(PAH)。

[0455] 118.项目117的方法,其中所述PAH是特发性PAH。

[0456] 119.项目117的方法,其中所述PAH是可遗传性PAH。

[0457] 120.项目117的方法,其中所述PAH与以下有关:HIV感染、血吸虫病、肝硬化、先天性心脏异常、门脉高压、肺静脉闭塞性疾病、肺毛细血管血管瘤病、结缔组织病症、自身免疫性病症、或药物使用或滥用。

[0458] 121.项目113-116中任一项的方法,其中所述PH是静脉PH。

[0459] 122.项目121的方法,其中所述静脉PH与以下有关:左心室收缩功能障碍、左心室舒张功能障碍、瓣膜性心脏病、先天性心肌病、或先天性或获得性肺静脉狭窄。

[0460] 123.项目113-116中任一项的方法,其中所述PH是低氧PH。

[0461] 124.项目123的方法,其中所述低氧PH与以下有关:慢性阻塞性肺疾病、间质性肺疾病、睡眠障碍性呼吸、肺纤维化、肺泡通气不足病症、长期暴露于高海拔或发育异常。

[0462] 125.项目113-116中任一项的方法,其中所述PH是血栓栓塞性PH。

[0463] 126.项目125的方法,其中所述血栓栓塞性PH与以下有关:慢性血栓栓塞性肺性高血压症、肺栓塞、血管肉瘤、动脉炎、先天性肺动脉狭窄或寄生虫感染。

[0464] 127.项目113-116中的任一项的方法,其中所述PH是杂项PH。

[0465] 128.项目127的方法,其中所述杂项PH与以下有关:血液系统疾病、系统性疾病、代谢病症、肺肿瘤血栓性微血管病、纤维化纵隔炎、慢性肾衰竭或节段性肺性高血压症。

[0466] 129.项目113-128中任一项的方法,其中所述方法减少PH的一种或多种症状的频率或严重性。

[0467] 130.项目113-129中任一项的方法,其中所述方法减少肺血管重塑或受试者的心脏中的血管重塑。

[0468] 131.项目113-130中任一项的方法,其中所述方法减少右心室肥大。

[0469] 132.项目113-131中任一项的方法,其中所述方法减少肺血管阻力。

[0470] 133.项目113-132中任一项的方法,其中所述方法改善6分钟步行测试中的表现。

[0471] 134.项目47-133中任一项的方法,其中所述方法减少或抑制激活素和/或肌肉生长抑制素与其受体的结合。

[0472] 135.项目47-57或134中任一项的方法,其中施用的所述多肽、核酸、载体或药物组合物的量足以增加肌重量和/或强度,影响所述受试者中的肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导,或减少或抑制激活素和/或肌肉生长抑制素与其受体的结合。

[0473] 136.项目58-91或134中任一项的方法,其中施用的所述多肽、核酸、载体或药物组合物的量足以增加矿物质骨密度,减少骨再吸收,减少骨再吸收速率,增加骨形成,增加骨形成速率,减少破骨细胞活性,增加成骨细胞活性,增加骨强度,减少骨折的风险,影响所述受试者中的肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导,或减少或抑制激活素和/或肌肉生长抑制素与其受体的结合。

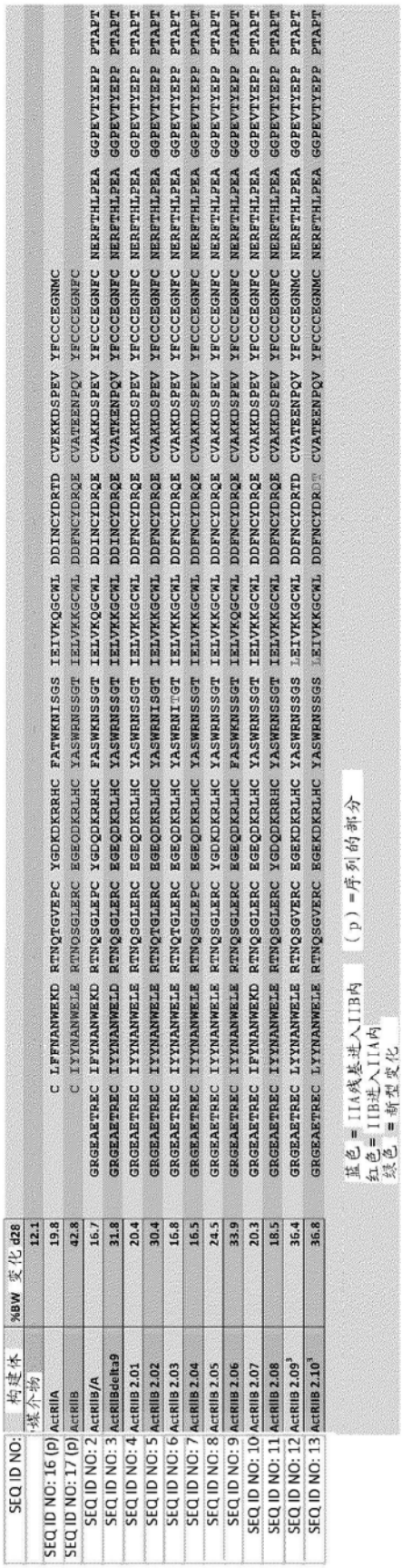
[0474] 137.项目92-99或134中任一项的方法,其中施用的所述多肽、核酸、载体或药物组合物的量足以减少纤维化,预防纤维化,减少发展纤维化的风险,延迟纤维化的发展,减慢或抑制纤维化的进展,治疗纤维化,减少纤维化的一种或多种症状,改善纤维化组织或器官的功能,影响所述受试者中的肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导,或减少或抑制激活素和/或肌肉生长抑制素与其受体的结合。

[0475] 138.项目100-112或134中任一项的方法,其中施用的所述多肽、核酸、载体或药物组合物的量足以增加红血细胞水平,增加血红蛋白水平,增加红血细胞形成,增加红血细胞计数,增加血细胞比容,减少关于输血的需要,治疗贫血,影响所述受试者中的肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导,或减少或抑制激活素和/或肌肉生长抑制素与其受体的结合。

[0476] 139.项目113-134中任一项的方法,其中施用的所述多肽、核酸、载体或药物组合物的量足以预防PH,减少发展PH的风险,减少PH的一种或多种症状的严重性或频率,延迟PH的发展,减慢或抑制PH的进展,治疗PH,减少肺血管重塑,减少心脏中的血管重塑,减少右心室肥大,减少肺血管阻力,改善6分钟步行测试中的表现,影响所述受试者中的肌肉生长抑制素、激活素和/或BMP9信号传导,或减少或抑制激活素和/或肌肉生长抑制素与其内源性受体的结合。

[0477] 140.项目47-139中任一项的方法,其中所述方法不在所述受试者中引起血管并发症。

[0478] 141.项目140的方法,其中所述方法不增加血管通透性或渗漏。



| SEQ ID NO: | 构建体 | %BW 变化 d28 | | |

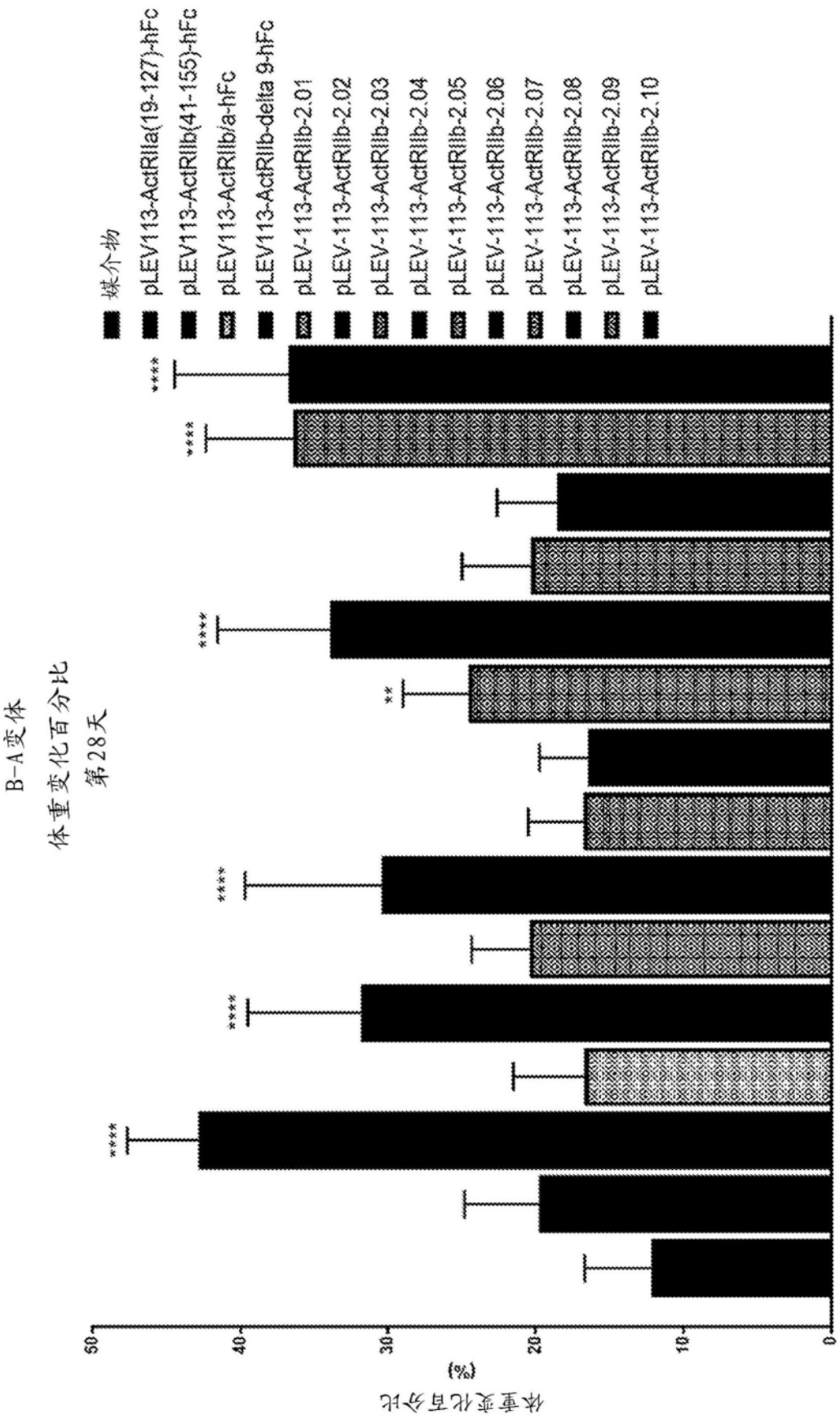

B-A变体
体重变化百分比
第28天
媒介物
pLEV113-ActRIIa(19-127)-hFc
pLEV113-ActRIIb(41-155)-hFc
pLEV113-ActRIIb/a-hFc
pLEV113-ActRIIb-delta 9-hFc
pLEV-113-ActRIIb-2.01
pLEV-113-ActRIIb-2.02
pLEV-113-ActRIIb-2.03
pLEV-113-ActRIIb-2.04
pLEV-113-ActRIIb-2.05
pLEV-113-ActRIIb-2.06
pLEV-113-ActRIIb-2.07
pLEV-113-ActRIIb-2.08
pLEV-113-ActRIIb-2.09
pLEV-113-ActRIIb-2.10
体重变化百分比
(%)
60
40
30
20
10
0
****
****
****
****
****
**
****
****

图2

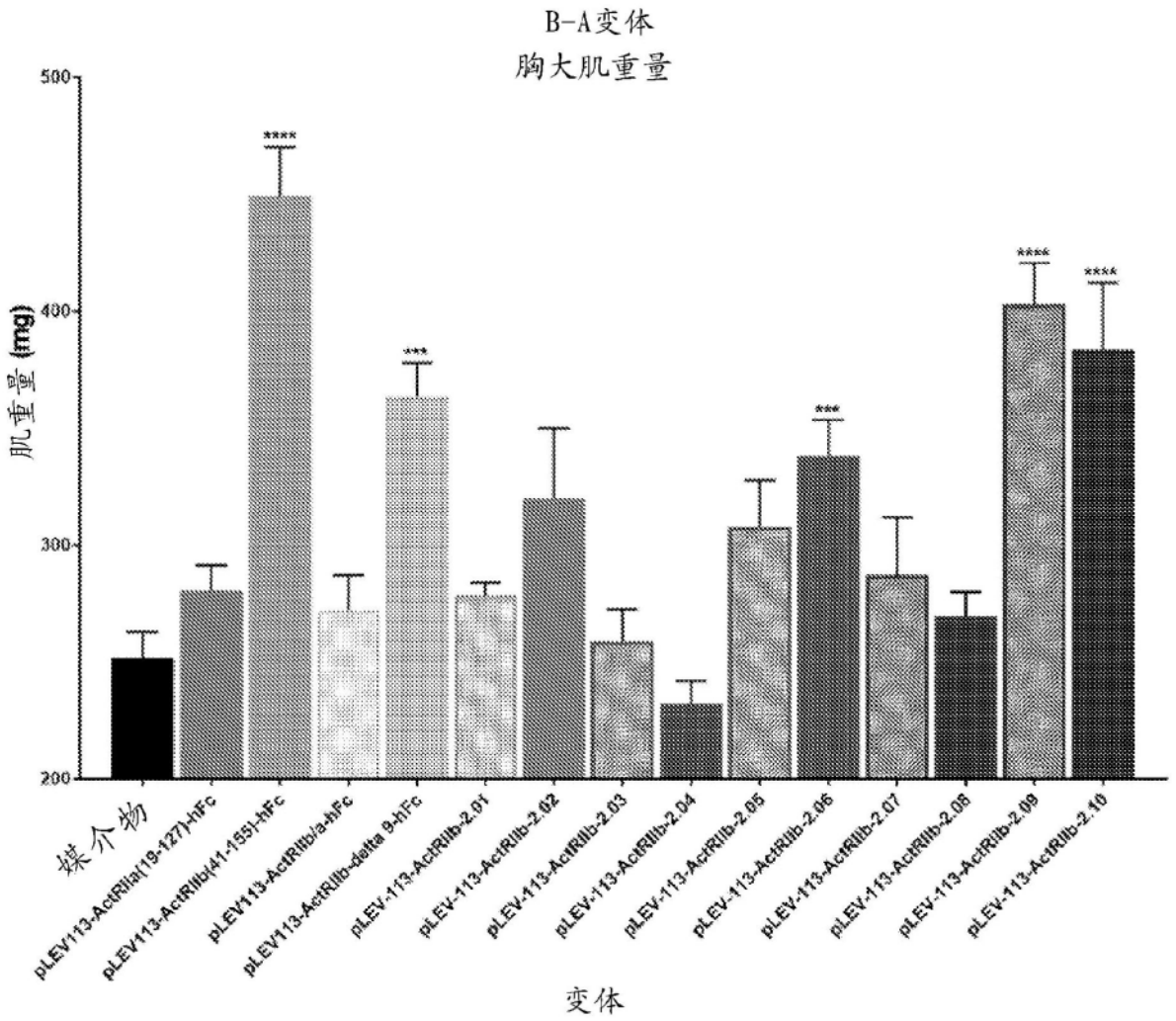

B-A变体
胸大肌重量
肌重量 (mg)
500
400
300
200
****
***
***
****
****
媒介物
pLEV113-ActRIIa[19-127]-hFc
pLEV113-ActRIIb[41-155]-hFc
pLEV113-ActRIIb/a-hFc
pLEV113-ActRIIb-delta 9-hFc
pLEV-113-ActRIIb-2.01
pLEV-113-ActRIIb-2.02
pLEV-113-ActRIIb-2.03
pLEV-113-ActRIIb-2.04
pLEV-113-ActRIIb-2.05
pLEV-113-ActRIIb-2.06
pLEV-113-ActRIIb-2.07
pLEV-113-ActRIIb-2.08
pLEV-113-ActRIIb-2.09
pLEV-113-ActRIIb-2.10
变体

图3A

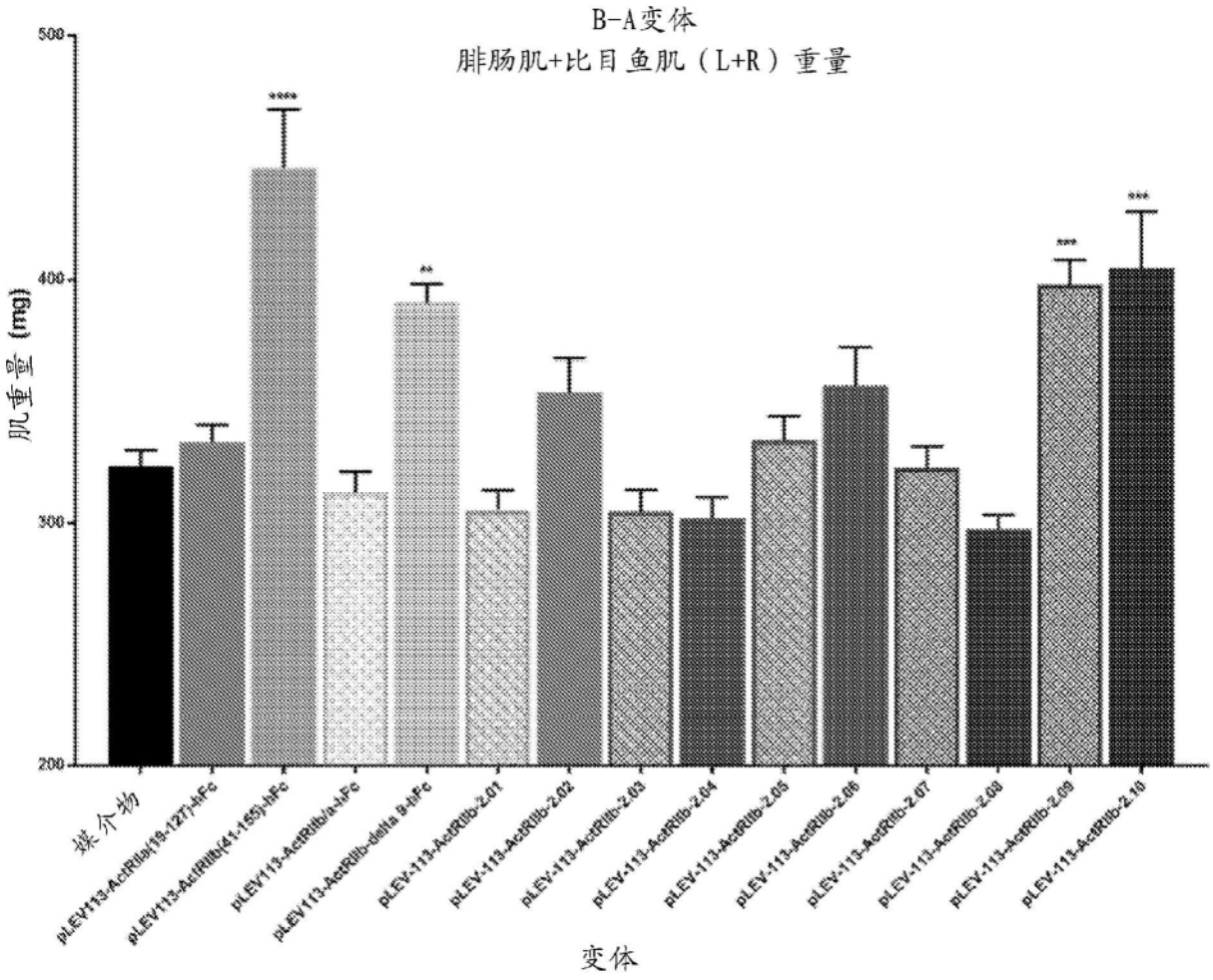

B-A变体
腓肠肌+比目鱼肌（L+R）重量
肌重量 (mg)
500
400
300
200
****
**
***
***
媒介物
pLEV113-ActRIIb(19-127)-hFc
pLEV113-ActRIIb(41-155)-hFc
pLEV113-ActRIIb(a)-hFc
pLEV113-ActRIIb-delta B-hFc
pLEV-113-ActRIIb-2.01
pLEV-113-ActRIIb-2.02
pLEV-113-ActRIIb-2.03
pLEV-113-ActRIIb-2.04
pLEV-113-ActRIIb-2.05
pLEV-113-ActRIIb-2.06
pLEV-113-ActRIIb-2.07
pLEV-113-ActRIIb-2.08
pLEV-113-ActRIIb-2.09
pLEV-113-ActRIIb-2.10
变体

图3B

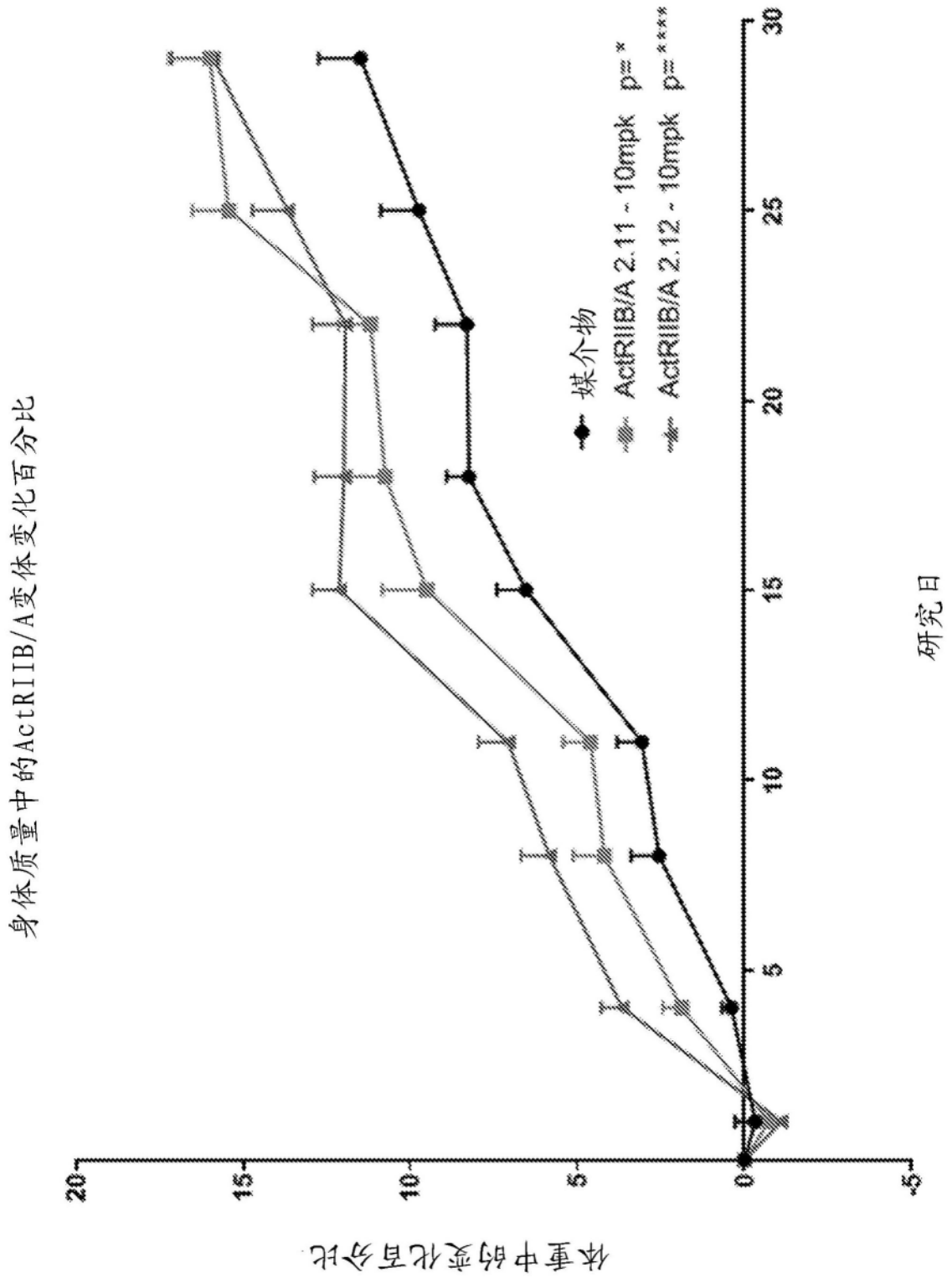

身体质量中的ActRIIB/A变体变化百分比
媒介物
ActRIIB/A 2.11 - 10mpk p= *
ActRIIB/A 2.12 - 10mpk p= ****
研究日
体重中的变化百分比
20
15
10
5
0
-5
0
5
10
15
20
25
30

图4

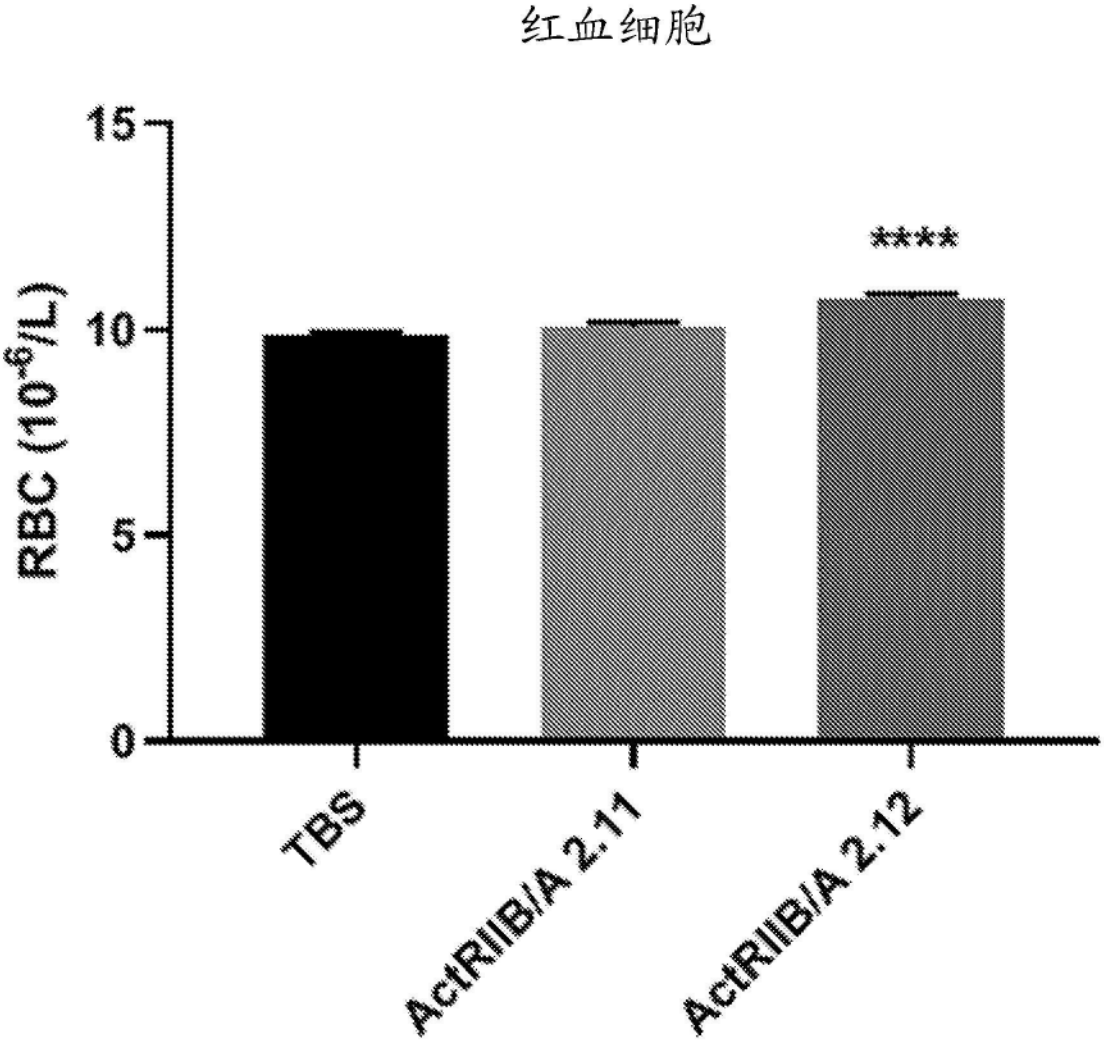


图5A

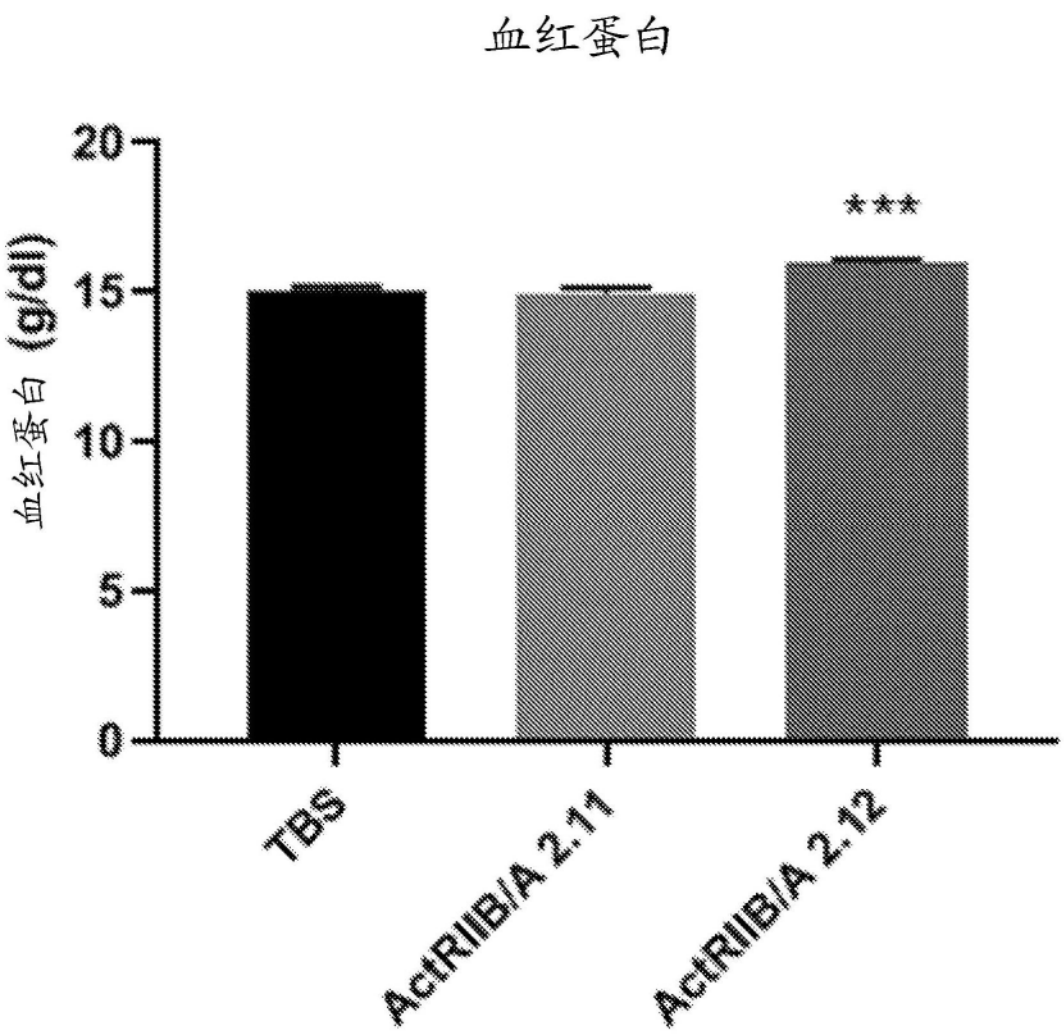


图5B

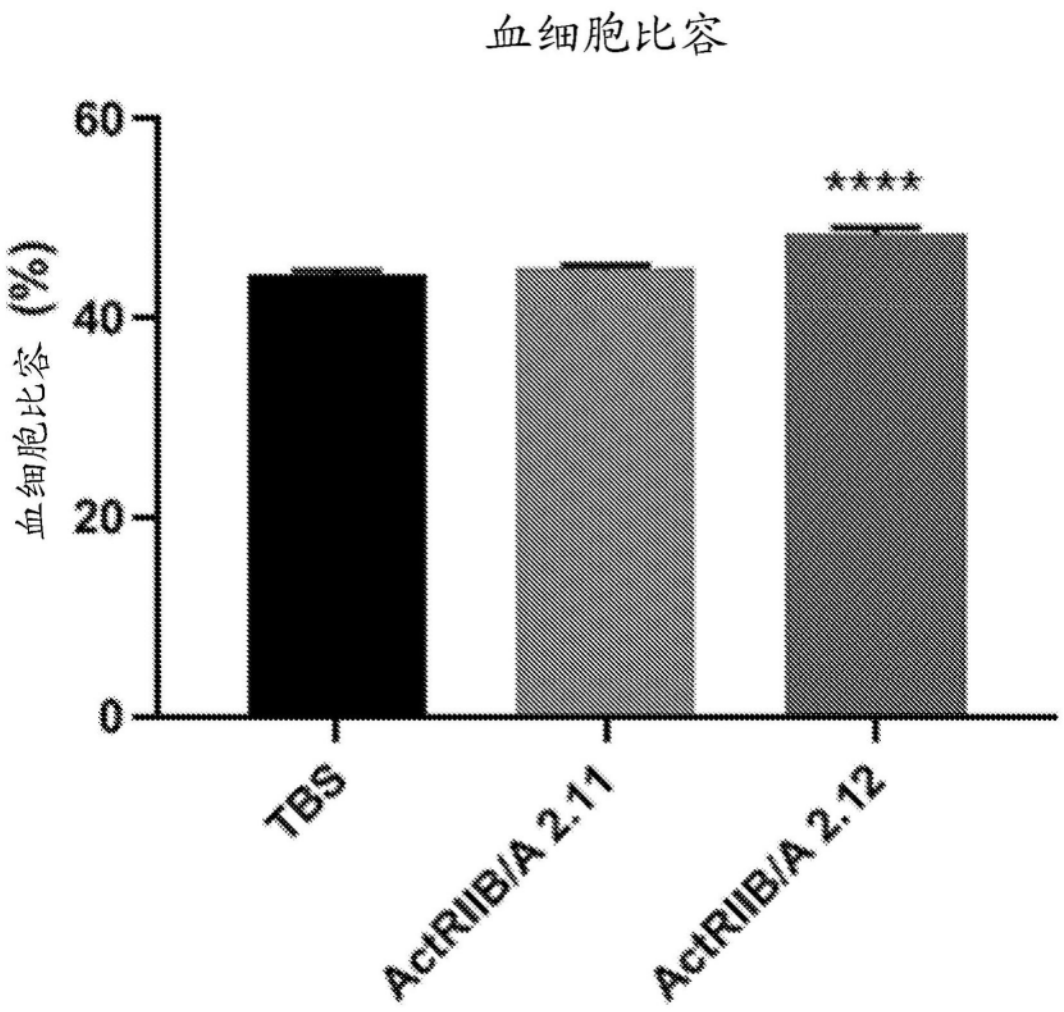


图5C

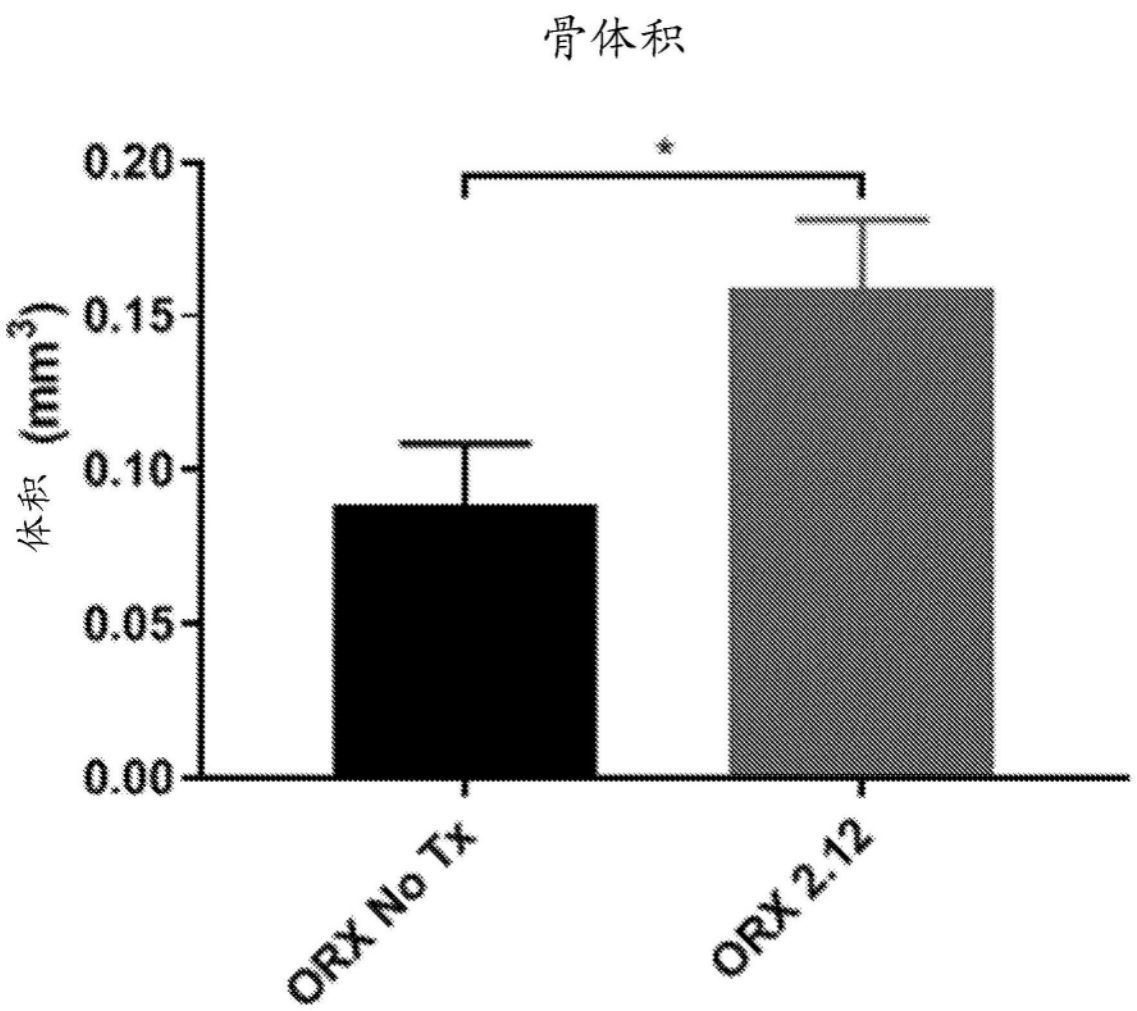


图6A

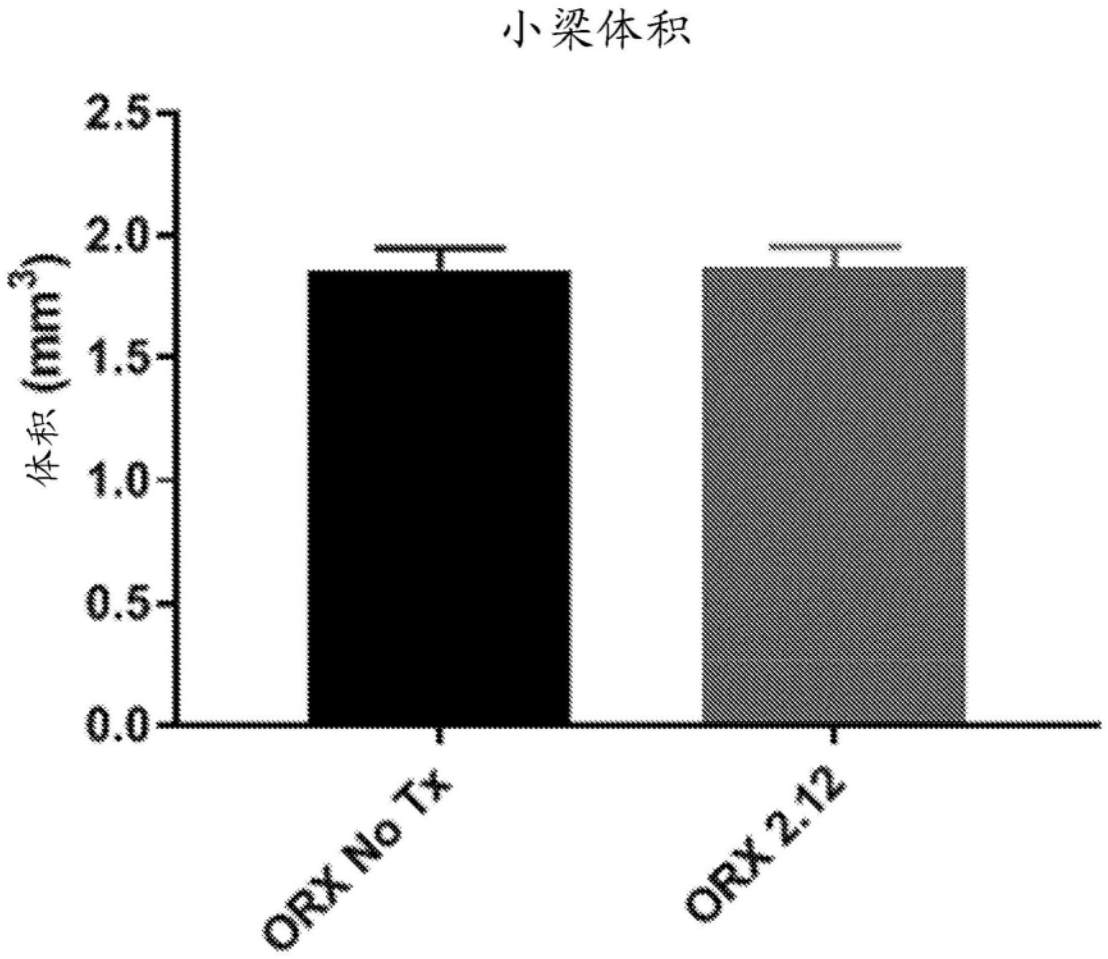


图6B

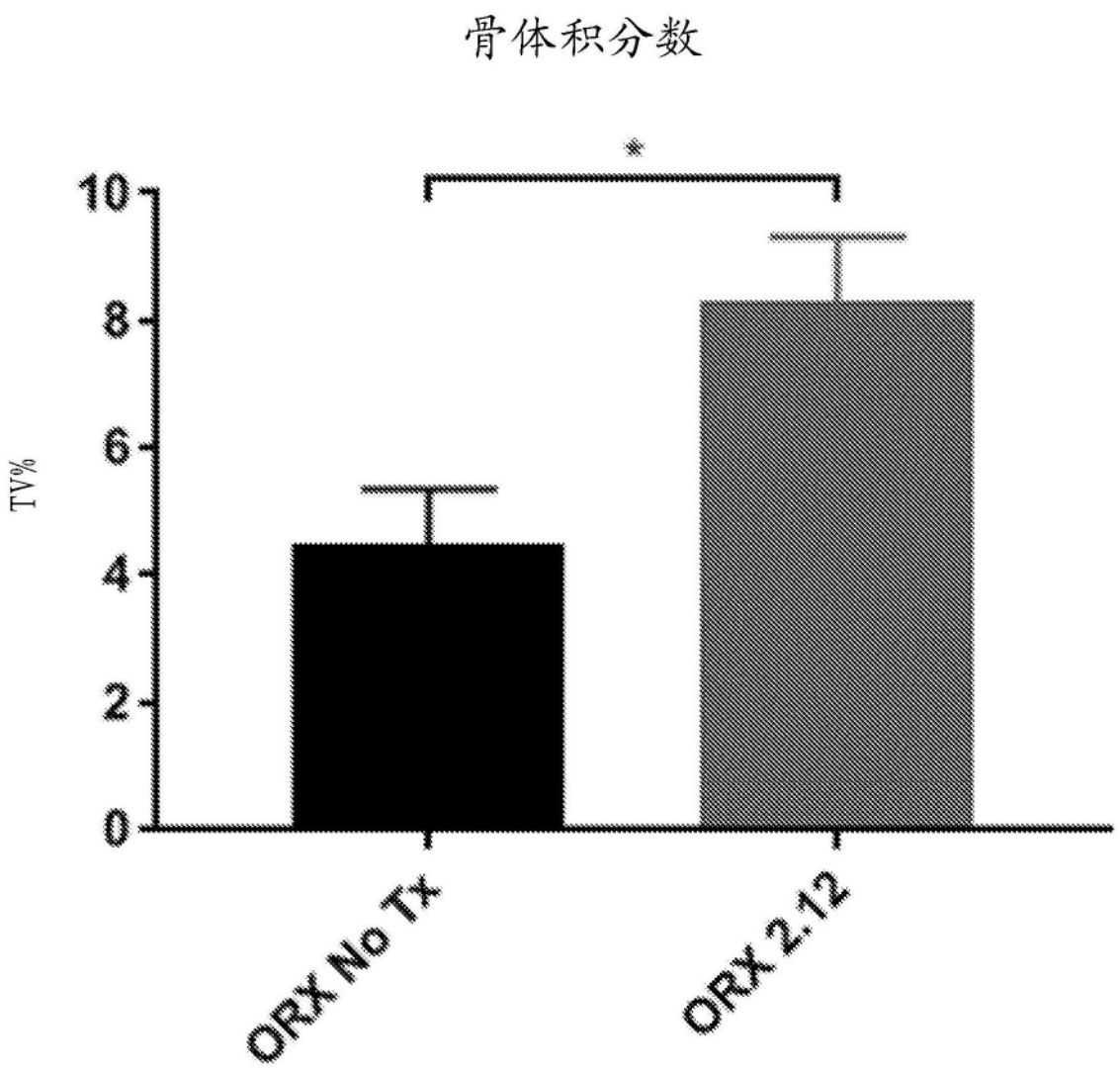


图6C

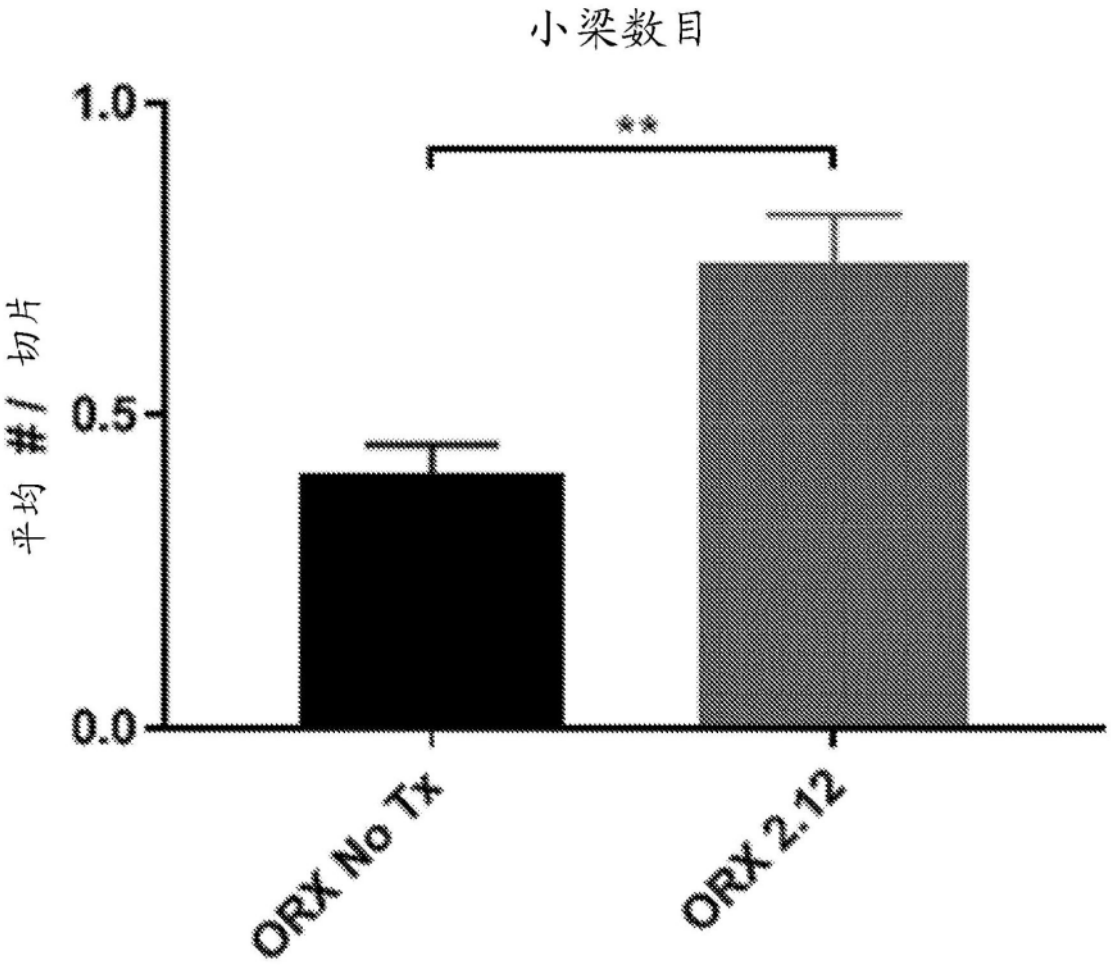


图6D

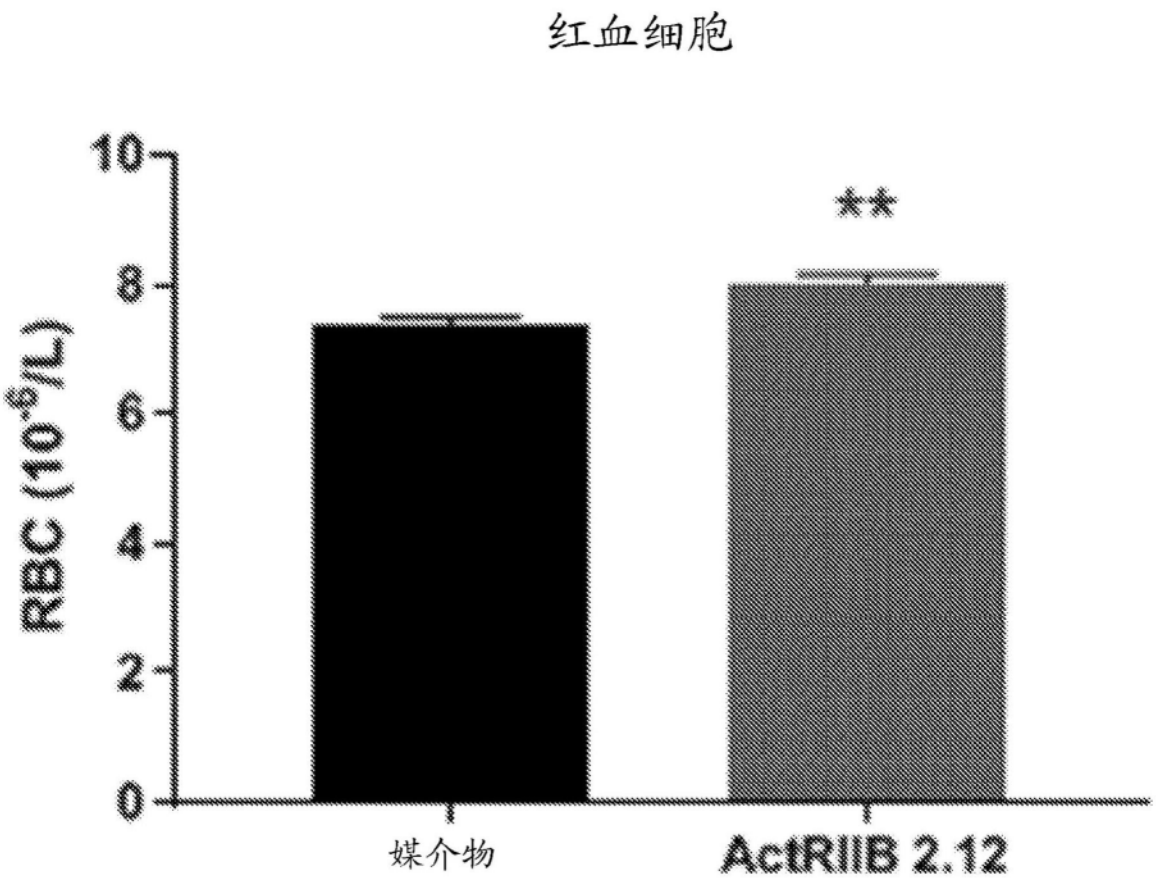


图7A

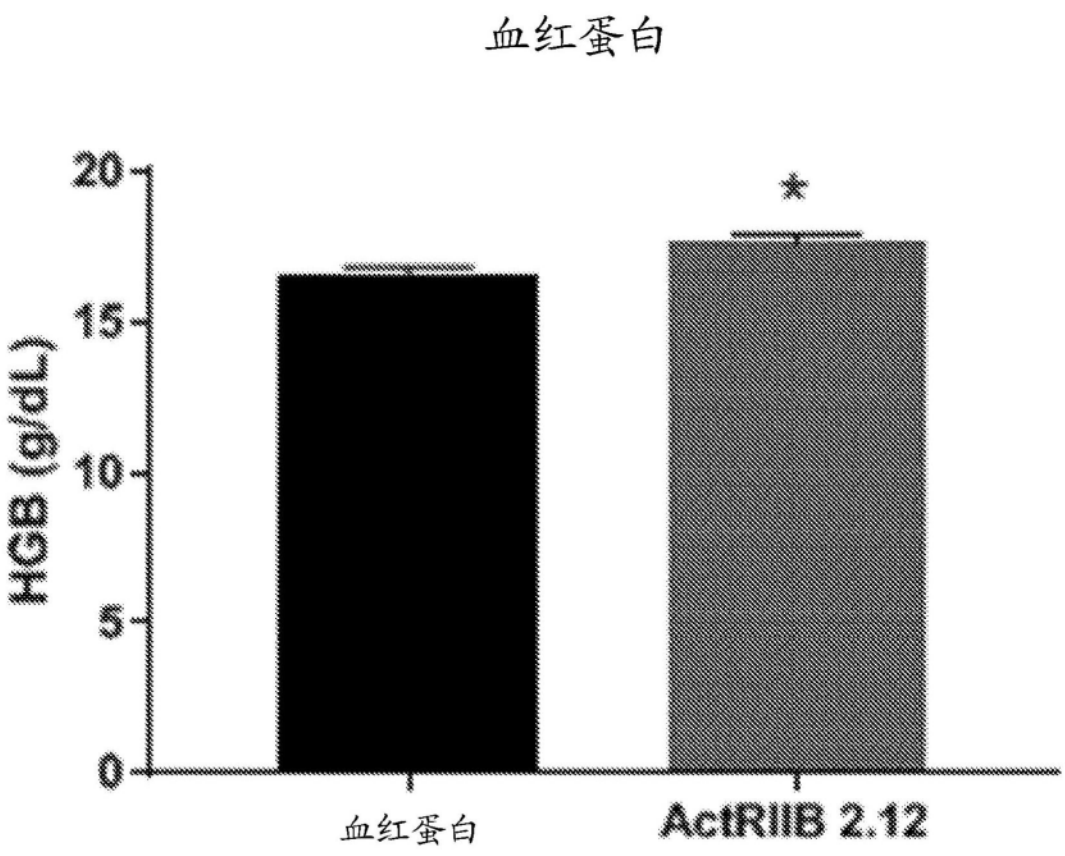


图7B

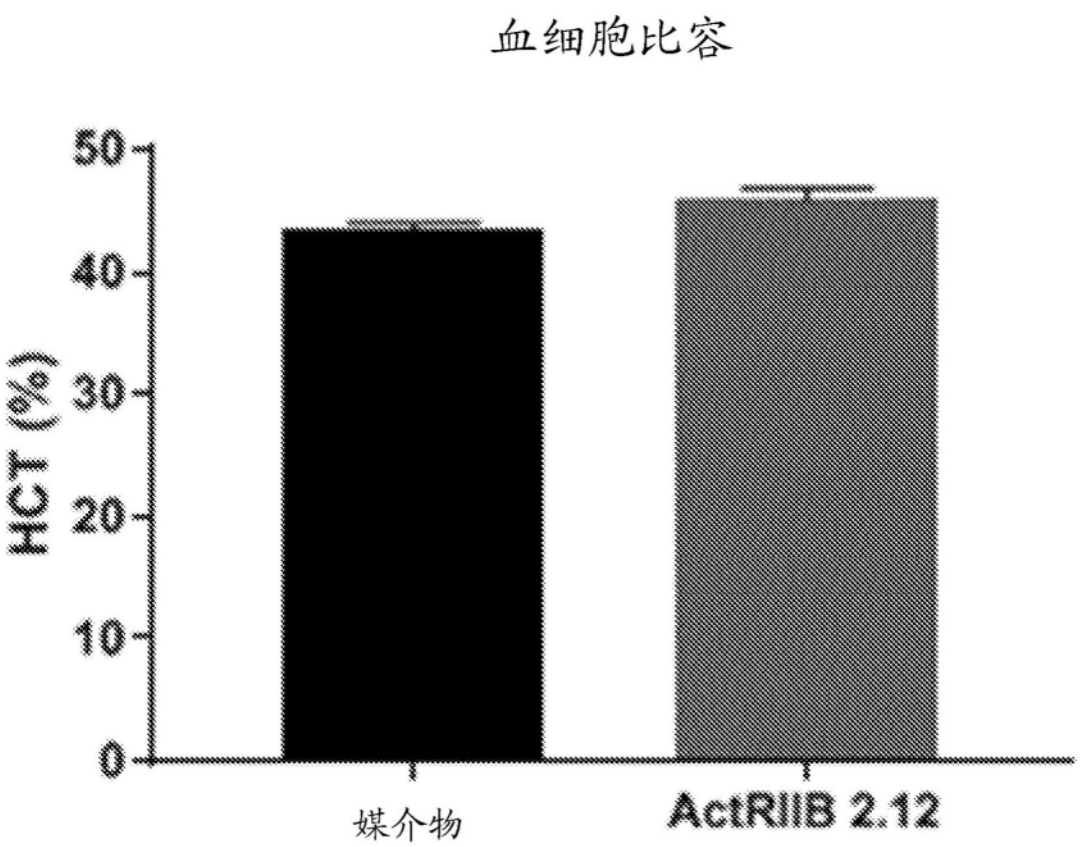


图7C

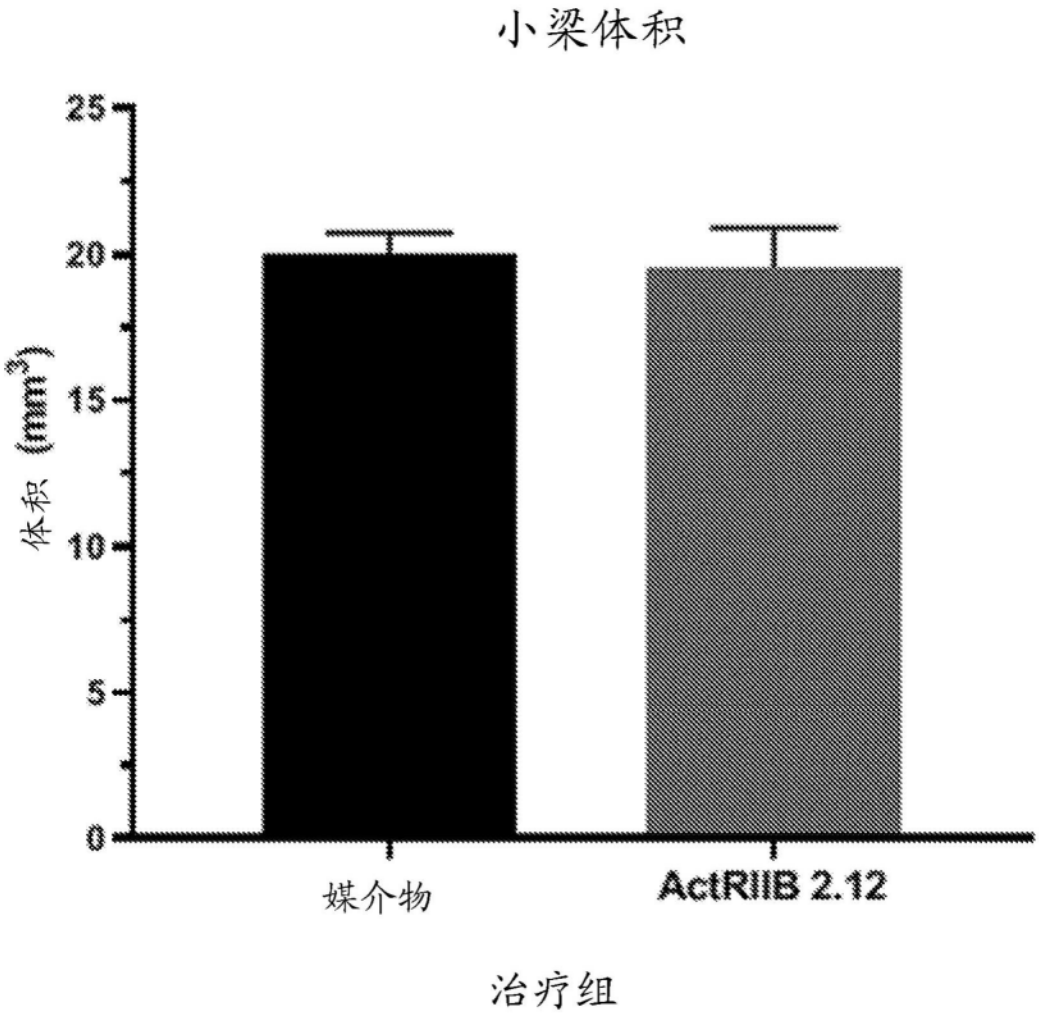


图8A

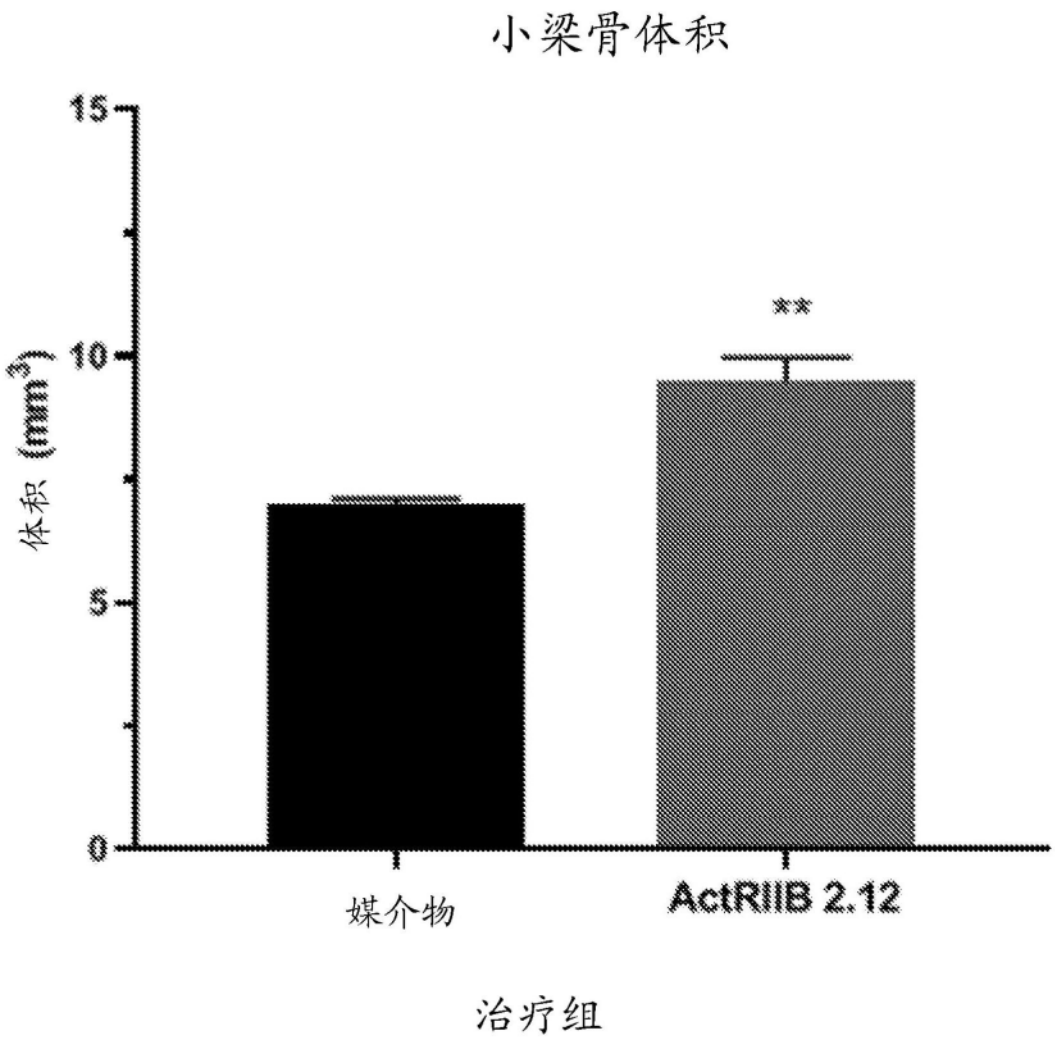


图8B

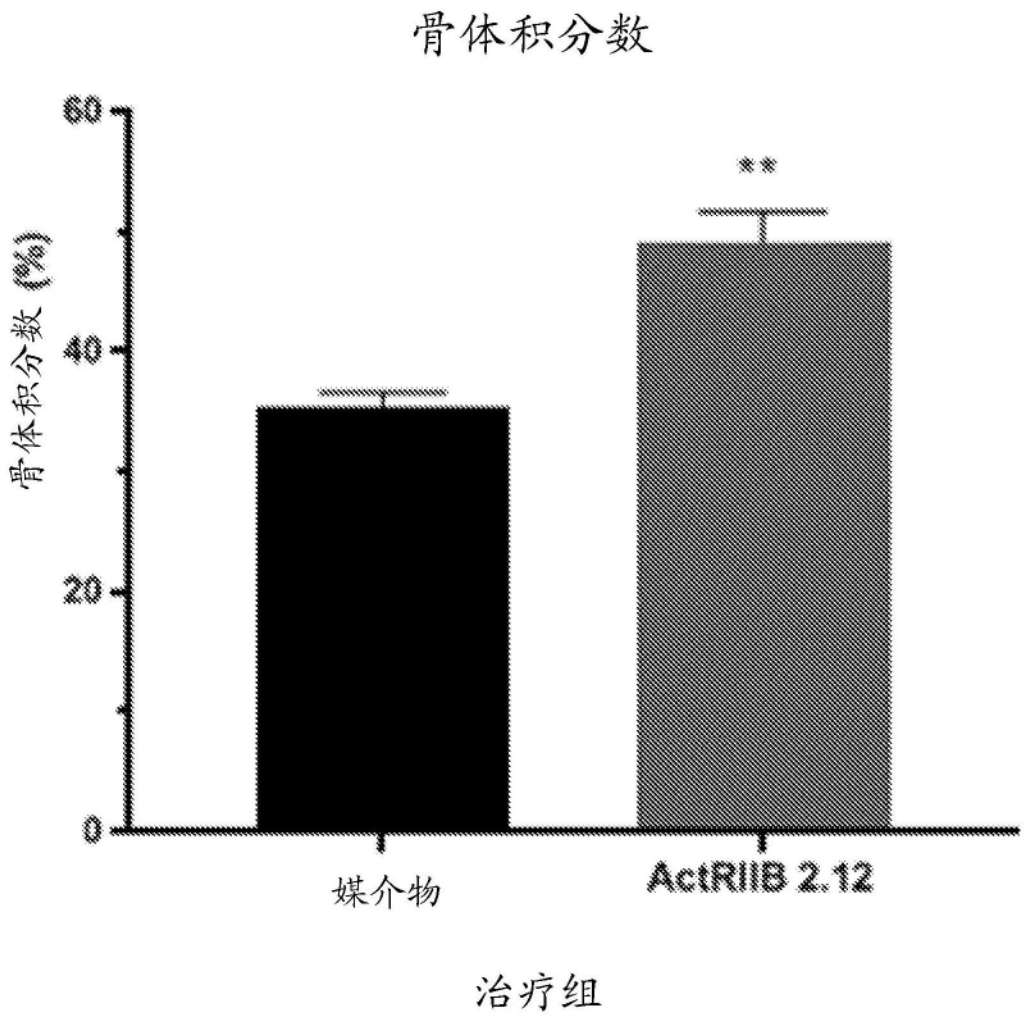


图8C

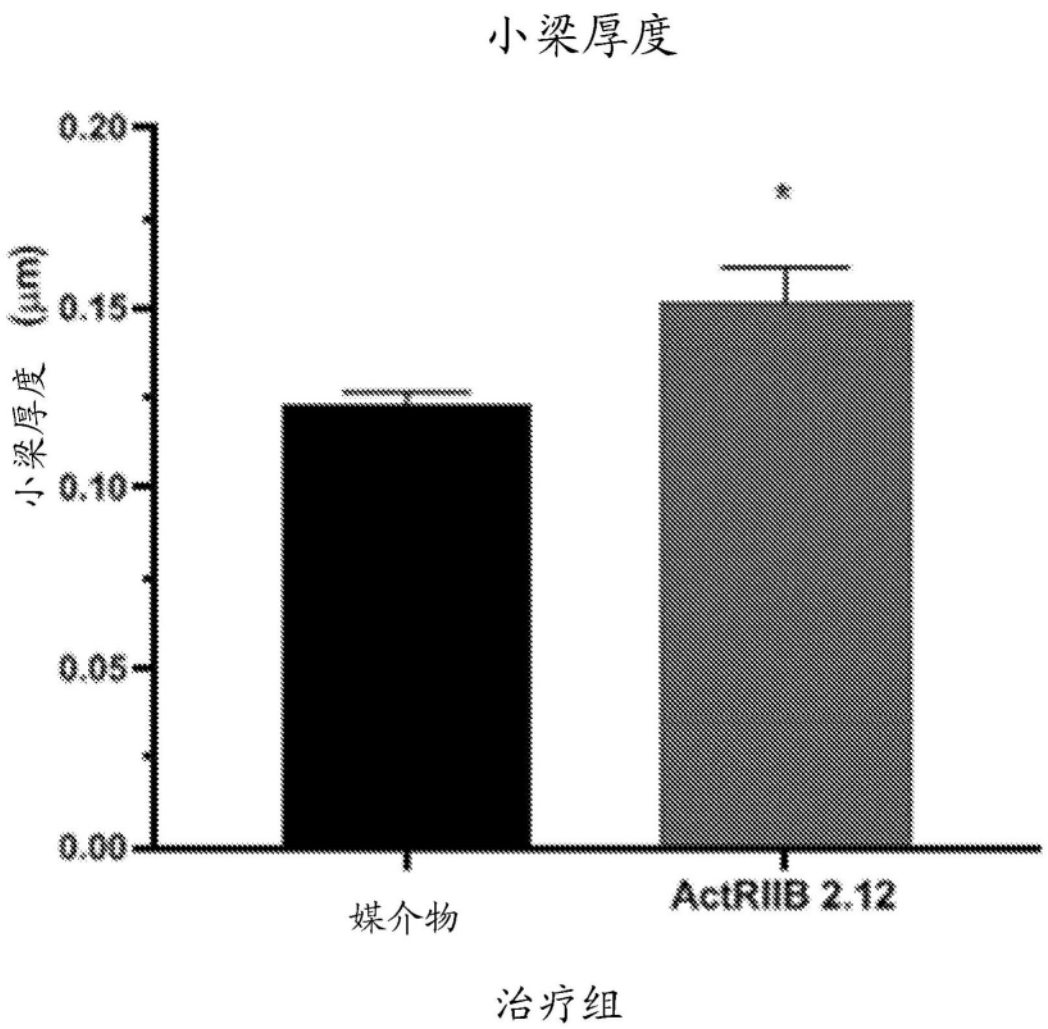


图8D

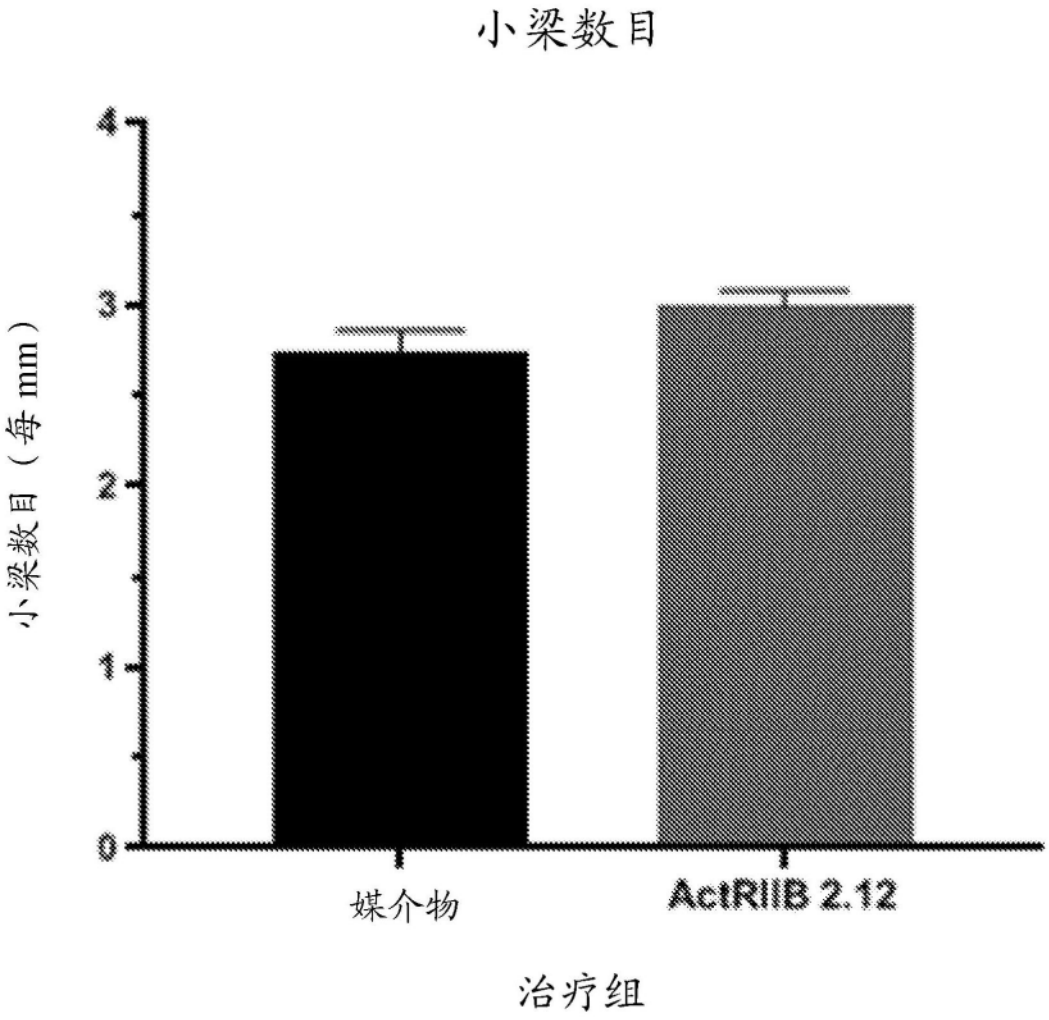


图8E