



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112957462 A

(43) 申请公布日 2021.06.15

(21) 申请号 202011542063.1

(22) 申请日 2013.10.23

(30) 优先权数据

61/718,128 2012.10.24 US

(62) 分案原申请数据

201380067832.9 2013.10.23

(71) 申请人 细胞基因公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 维多利亚·松 拉杰什·乔普拉

奥利维尔·赫尔米内

伊凡·克鲁兹莫拉

迈克尔·杜赛特

蒂亚戈·特罗瓦蒂马切尔

奥雷利·弗里克

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 李肖芳 韦昌金

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/6883 (2018.01)

权利要求书1页 说明书50页

序列表48页 附图35页

(54) 发明名称

用于治疗贫血的方法

(57) 摘要

本申请提供用于治疗贫血的方法,其中所述方法包括将生长分化因子11(GDF11;亦称为骨形态生成蛋白11(BMP11))的拮抗剂给予需要所述治疗的对象。

1. 一种用于治疗患者的贫血的方法,其中所述方法包括给予GDF11拮抗剂。
2. 一种用于治疗患者的无效红细胞发生的方法,其中所述方法包括给予GDF11拮抗剂。
3. 一种用于治疗患者的 $\beta$ 地中海贫血的方法,其中所述方法包括给予GDF11拮抗剂。
4. 一种用于增加患者的正染性成红细胞(Ery-C)的方法,其中所述方法包括给予GDF11拮抗剂。
5. 权利要求1、2、3或4的方法,其中所述患者的骨髓、脾、肝、血清或血浆中的GDF11水平升高。
6. 权利要求1、2、3或4的方法,其中如果所述GDF11拮抗剂是ActRIIA多肽,则ActRIIA多肽优先与GDF11结合。
7. 权利要求1、2、3或4的方法,其中如果所述GDF11拮抗剂是ActRIIB多肽,则ActRIIB多肽优先与GDF11结合。
8. 权利要求1、2、3或4的方法,其中所述GDF11拮抗剂降低GDF11的表达、降低GDF11活性或降低GDF11蛋白水平。
9. 权利要求1、2、3或4的方法,其中所述GDF11拮抗剂是抗GDF11抗体。
10. 权利要求1、2、3或4的方法,其中所述GDF11拮抗剂是结合GDF11的截短受体。
11. 权利要求1、2、3或4的方法,其中所述GDF11拮抗剂包含ActRIIA的突变胞外域,其中与野生型的ActRIIA相比,所述ActRIIA的突变胞外域对GDF11的亲合力相对于激活素A提高。
12. 权利要求1、3或4的方法,其中所述方法还包括监测GDF11水平。
13. 权利要求1、3或4的方法,其中所述方法还包括
  - a. 测定GDF11水平;和
  - b. 调节GDF11拮抗剂的剂量,其中如果GDF11增加超过正常,则增加GDF11拮抗剂的剂量,且其中如果GDF11降低低于正常,则减少GDF11拮抗剂的剂量。
14. 权利要求12或13的方法,其中以GDF11mRNA水平、GDF11蛋白水平或GDF11蛋白活性水平测定所述GDF11水平。
15. 权利要求1、3或4的方法,其中所述给药导致患者的晚嗜碱性和多染性成红细胞的细胞计数减少。
16. 权利要求1、3或4的方法,其中所述GDF11拮抗剂降低GDF11表达、GDF11活性和/或GDF11蛋白水平。

## 用于治疗贫血的方法

[0001] 本申请为2013年10月23日提交的、发明名称为“用于治疗贫血的方法”、申请号为201380067832.9的中国发明专利申请的分案申请。

[0002] 本申请要求2012年10月24日提交的美国临时专利申请号61/718,128的优先权,其公开内容通过引用以其整体结合到本文中。

[0003] 1. 引言

[0004] 本文提供用于治疗贫血的方法,其中所述方法包括将生长分化因子11 (GDF11; 亦称为骨形态生成蛋白11 (BMP11)) 的拮抗剂给予需要所述治疗的对象。

[0005] 2. 发明背景

[0006] 贫血是一种红细胞数减少或小于正常量或血液中的血红蛋白功能降低的疾病。贫血是最常见的血液病症。

[0007] 贫血可能由无效红细胞发生 (ineffective erythropoiesis) 引起。如果发生有效红细胞发生但成熟的红细胞不能以适当的速率发育,则存在无效红细胞发生。在达到红细胞成熟期之前,祖细胞进行细胞凋亡。贫血还包括血红蛋白的氧结合能力降低。

[0008] 地中海贫血是一种无效红细胞发生的形式。在地中海贫血中,无效红细胞发生的特征在于成熟中的有核类红细胞 (erythroid cell) 凋亡。具体地说, $\beta$ 地中海贫血 (beta-thalassemia) 是一种特征在于血红蛋白 (或Hgb) 合成缺陷导致红细胞成熟和产生受损的疾病。所述减少主要被认为是由于在红细胞分化的晚嗜碱性 (late basophilic) /多染性成红细胞 (polychromatic erythroblast) 期红细胞分化和凋亡异常加速所致,导致了成熟红细胞产生的总体降低。 $\beta$ 地中海贫血的特征在于细胞过多的骨髓腔隙,在腔隙中异常成红细胞蓄积,并进行凋亡,导致了全身性贫血。

[0009] 转化生长因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 家族 (该家族包括TGF- $\beta$ 、激活素、骨形态发生蛋白 (BMP) 和生长分化因子 (GDF)) 包括已知在发育和组织稳态两者中调节多个细胞过程的分泌的蛋白质。在各种模型系统中,TGF- $\beta$ 1、激活素A、BMP-2和BMP-4全都与红细胞发生的调节有关。TGF- $\beta$ 1既抑制又促进红细胞分化,这取决于特定情况;激活素A显示是促红细胞分化剂,而BMP-4在鼠模型中参与应激红细胞发生和从急性贫血中恢复。BMP-2作用于早幼类红细胞以增加获自经动员的外周血或骨髓CD34+细胞的样品的集落形成。这些生长因子中的一些的异常高的水平与各种血液病有关。例如,高水平的GDF-15通常不是正常红细胞发生的特征,但在无效红细胞发生的情况下,GDF-15表达升高。

[0010] TGF- $\beta$ 超家族包括30多种蛋白质,并仅通过少数受体和信号转导途径发出信号,表明了其作用的固有混杂性和冗余性。此外,在任何指定的组织中,可发现几种不同的配体,而且据推测,通过受体的重叠亚型发生信号转导,使将特定配体与其功能相关联的能力复杂化。GDF11是GDF亚家族的成员,与GDF8 (亦称为肌肉生长抑制素) 有约90%氨基酸同源性。两者可结合激活素IIA型和B型受体,并激活Smad 2/3信号转导途径。GDF11在发育中起重大作用,参与肌肉、软骨、骨、肾和神经系统的形成,同时在成人组织中,在胰腺、肠、肾、骨骼肌、脑和牙髓中检出GDF11。还可在循环中发现少量的GDF-11。然而,迄今仍没有描述GDF-11在红细胞发生中的作用的证据。

[0011] 激活素的II型受体还可结合GDF11。已鉴定出两种相关的II型受体ActRIIa和ActRIIb(Mathews和Vale,1991,Cell 65:973-982;Attisano等,1992,Cell 68:97-108)。除GDF11以外,ActRIIa和ActRIIb可与几种其它的TGF- $\beta$ 家族蛋白质在生物化学上相互作用,包括BMP7、Nodal、GDF8和激活素(Yamashita等,1995,J.Cell Biol.130:217-226;Lee和McPherron,2001,Proc.Natl.Acad.Sci.98:9306-9311;Yeo和Whitman,2001,Mol.Cell 7:949-957;Oh等,2002,Genes Dev.16:2749-54)。ALK4是激活素,特别是激活素A的主要I型受体,而ALK-7也可用作激活素,特别是激活素B的受体。

[0012] 由激活素-受体IIA型(ActRIIA)的胞外域(ECD)和人IgG1 Fc结构域组成的人源化融合蛋白以高亲和力与激活素-A和其它TGF $\beta$ 超家族配体结合,通过内源ActRIIA-受体阻断信号转导。激活素-A亦称为红细胞分化因子(EDF),其影响后期的RBC成熟(Murata,1988)。描述了用于提高红细胞水平的ActRII抑制剂(例如专利申请公布号20110038831、20100204092、20100068215、20100028332、20100028331和20090163417)。

[0013] 3.发明概述

[0014] 在某些实施方案中,本文提供用于治疗患者的贫血、无效红细胞发生、 $\beta$ 地中海贫血或增加患者的正染性成红细胞(Ery-C)的方法,其中所述方法包括给予GDF11拮抗剂。在某些实施方案中,相对于健康个体和/或相对于贫血发病前患者的GDF11水平,在骨髓、脾、肝、血清或血浆中患者的GDF11水平升高。

[0015] 在某些实施方案中,如果GDF11拮抗剂是ActRIIA多肽,则ActRIIA多肽优先与GDF11结合。如果GDF11拮抗剂是ActRIIB多肽,则ActRIIB多肽优先与GDF11结合。

[0016] 在某些实施方案中,GDF11拮抗剂降低GDF11的表达、降低GDF11活性或降低GDF11蛋白水平。在某些实施方案中,GDF11拮抗剂是抗GDF11抗体。在某些实施方案中,GDF11拮抗剂是结合GDF11的截短受体。在某些实施方案中,GDF11拮抗剂包含ActRIIA的突变胞外域,其中与野生型的ActRIIA相比,ActRIIA的突变胞外域相对于激活素A对GDF11的亲合力提高。

[0017] 在某些实施方案中,本文提供的方法还包括监测GDF11水平。在某些实施方案中,所述方法还包括

[0018] a.测定GDF11水平;和

[0019] 调节GDF11拮抗剂的剂量,其中,如果GDF11增加超过正常,则增加GDF11拮抗剂的剂量,且其中,如果GDF11降低低于正常,则减少GDF11拮抗剂的剂量。在某些实施方案中,以GDF11 mRNA水平、GDF11蛋白水平或GDF11蛋白活性水平测定GDF11水平。

[0020] 在某些实施方案中,给予GDF11拮抗剂导致患者中晚嗜碱性和多染性成红细胞的细胞计数减少。在某些实施方案中,GDF11拮抗剂降低GDF11表达、GDF11活性和/或GDF11蛋白水平。

[0021] 4.附图简述

[0022] 图1说明SEQ ID NO 7的鼠对应物(mActRIIA-Fc)改进 $\beta$ 地中海贫血小鼠的血液学参数。Hbb<sup>th1/th1</sup>小鼠(Skow LC等,Cell 34:1043-52,1983)用PBS或mActRIIA-Fc(10mg/Kg体重一周两次)治疗60天。在第5、10、30和60天评价血液学参数。(A)红细胞计数、(B)血细胞比容和(C)血红蛋白的评价与(D)网状细胞增多减少有关。循环红细胞(RBC)参数的分析还显示在用mActRIIA-Fc治疗的小鼠中,(E)平均红细胞容积(MCV)、(F)平均红细胞血红蛋白

(MCH) 和 (G) MCH浓度 (MCHC) 增加。(H) 总抗氧化状态。(I) 形态学分析显示红细胞大小不均、异形红细胞和靶细胞减少。还对地中海贫血小鼠的 (J) 全身铁水平、(K) 运铁蛋白合成、(L) 运铁蛋白和 (M) 铁蛋白水平饱和度进行了评价。(N) 还评价了炎性细胞计数。通过 (O) 脾重和总细胞数评价的地中海贫血小鼠中mActRIIA-Fc对脾大的作用。(P) 在用mActRIIA-Fc治疗的小鼠中,骨髓成红细胞数和增殖(伊红/苏木精染色)也减少。(Q) 经TER119染色,通过流式细胞术定量测定了骨髓和脾成红细胞。 $*p < 0.05$ ,对于各独立实验 $N=3-5$ 。

[0023] 图2说明mActRIIA-Fc降低地中海贫血小鼠的无效红细胞发生。(A-C) 收获骨髓和脾,经CD71/TER119染色和FSC/SSC分配,通过流式细胞术评价了成红细胞分化。(D) 总胆红素水平和直接胆红素水平的分析。(E) 使用二氯二氢荧光素,通过流式细胞术评价了主要原成红细胞分化中的活性氧类别(ROS)产生。(F) 用mActRIIA-Fc或PBS处理48小时的主要地中海贫血原成红细胞中血红蛋白溶解度的分析。 $*p < 0.05$ , $**p < 0.01$ , $***p < 0.005$ ,对于各独立实验 $N=3-5$ 。

[0024] 图3说明mActRIIA-Fc对来自地中海贫血小鼠的成红细胞的凋亡的作用。来自用mActRIIA-Fc或PBS治疗的小鼠的骨髓(A)和脾(B)成红细胞中Fas-L的表达。(C) 在mActRIIA-Fc治疗的小鼠中成红细胞的Tunel染色增强。

[0025] 图4表明地中海贫血小鼠脾中ActRIIA配体的表达。(A) 在mActRIIA-Fc治疗的动物中,ActRII、激活素A、激活素B和GDF11的mRNA表达水平提高。(B) GDF11蛋白水平的蛋白质印迹分析,在mActRIIA-Fc治疗的动物该水平降低。(C) 针对GDF11的骨髓免疫组织化学染色显示野生型和用mActRIIA-Fc治疗的小鼠之间无变化。

[0026] 图5说明主要地中海贫血原成红细胞中mActRIIA-Fc对GDF11表达的作用。(A) 对用PBS或mActRIIA-Fc治疗30天的地中海贫血小鼠的激活素/GDF信号转导途径的免疫组织化学分析,显示地中海贫血小鼠中高水平的GDF11、ActRII和p-Smad2。(B) 与其它贫血模型相比,对地中海贫血小鼠的激活素A、激活素B和GDF11的免疫组织化学分析。(C) 使用针对激活素A、激活素B、GDF11前肽和GDF8/GDF11切割肽的特异性抗体对用PBS或mActRIIA-Fc处理48小时的主要地中海贫血原成红细胞的FACS分析。柱状图中表示GDF11染色的定量测定。(D) 用PBS或mActRIIA-Fc治疗的地中海贫血小鼠脾中GDF11前体(proform)表达的免疫组织化学分析。 $*p < 0.05$ , $N=4$ 。

[0027] 图6说明抑制GDF11降低地中海贫血小鼠中的无效红细胞发生。(A) 收获骨髓和脾,经CD71/TER119染色和FSC/SSC分配,通过流式细胞术评价主要原成红细胞分化。(B) 使用二氯二氢荧光素,通过流式细胞术评价主要原成红细胞分化中的ROS产生。 $*p < 0.05$ , $N=4$ 。

[0028] 图7说明检测血清中的GDF11的夹心ELISA测定法。(A) 测定示意图。(B) 将板用 $5\mu\text{g}/\text{mL}$  mActRIIA-Fc和递增剂量的重组GDF11( $0\text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $0.1\text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $0.5\text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $2.5\text{ng}/\mu\text{l}$ )包被或将对照血清(1/4-1/500稀释度)加入用mActRIIA-Fc包被的板中,板经洗涤,用抗GDF8/11抗体检测结合的蛋白质,接着使用辣根过氧化物酶偶联的抗兔IgG检测。GDF11蛋白以剂量依赖性方式结合板。

[0029] 图8说明在 $\beta$ 地中海贫血患者的血清中检出递增水平的GDF11。血清获自出现地中海贫血的患者和健康对照。

[0030] 图9说明检测血清中的激活素A的夹心ELISA测定法。(A) 测定示意图。(B) 将板用 $5\mu\text{g}/\text{mL}$  ActRIIA-Fc (SEQ ID NO.7) 和递增剂量的重组激活素A( $0\text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $0.1\text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $0.5\text{ng}/\mu\text{l}$ 、

2.5ng/ $\mu$ l) 包被或将对照血清(1/4-1/500稀释度)加入ActRIIA-Fc板中,板经洗涤,并用抗激活素A抗体检测结合的蛋白质,接着使用辣根过氧化物酶偶联的抗兔IgG检测。激活素A蛋白以剂量依赖性方式结合板。(C)  $\beta$ 地中海贫血患者血清中激活素A水平的检测。血清获自出现地中海贫血的患者和健康对照。地中海贫血患者中激活素A的血清水平没有变化。

[0031] 图10说明检测血清中的激活素B的夹心ELISA测定法。(A) 测定示意图。(B) 将板用5  $\mu$ g/mL ActRIIA-Fc和递增剂量的重组激活素B(0ng/ $\mu$ l、0.1ng/ $\mu$ l、0.5ng/ $\mu$ l、2.5ng/ $\mu$ l) 包被或将对照血清(1/4-1/500稀释度)加入ActRIIA-Fc板中,板经洗涤,并用抗激活素B抗体检测结合的蛋白质,接着使用辣根过氧化物酶偶联的抗兔IgG检测。激活素B蛋白质以剂量依赖性方式结合板。(C)  $\beta$ 地中海贫血患者血清中激活素B水平的检测。血清获自出现地中海贫血的患者和健康对照。地中海贫血患者中激活素B的血清水平没有变化。

[0032] 图11说明将mActRIIA-Fc给予C57BL/6野生型小鼠不改变其血液学参数。(A) 红细胞计数,(B) 血细胞比容,(C) 血红蛋白的评价显示与mActRIIA-Fc无关。(D) 网状细胞增多略有减少。mActRIIA-Fc不改变红细胞(RBC)参数,例如(E) 平均红细胞容积(MCV),(F) 平均红细胞血红蛋白(MCH)或(G) MCH浓度(MCHC)。\* $p < 0.05$ ,对于各独立实验 $N = 3-5$ 。

[0033] 图12说明将mActRIIA-Fc给予C57BL/6野生型小鼠对小鼠的脾和骨髓细胞数无作用。

[0034] 图13说明mActRIIA-Fc通过抑制GDF11刺激红细胞分化。(A-C) 通过在含有EPO、+/-50 $\mu$ g/mL mActRIIA-Fc的培养基中培养,来进行CD34+/CD36+细胞的红细胞分化;对(A) 祖红细胞,(B) 细胞增殖和(C) 红细胞前体进行了分析。(D-F) 当在含有EPO、+/-50 $\mu$ g/mL mActRIIA-Fc的培养基中与骨髓(BM)细胞共培养时CD34+/CD36+细胞的红细胞分化;对(D) 祖红细胞,(E) 细胞增殖和(F) 红细胞前体进行了分析。(G-H) 通过在含有EPO、+/-200ng/mL GDF11、+/-100 $\mu$ g/mL mActRIIA-Fc的培养基中培养来进行CD36+细胞的红细胞分化;对(G) 细胞增殖和(H) 红细胞前体GPA+的百分比进行了分析。

[0035] 5. 发明详述

[0036] 5.1 概述

[0037] 一方面,本文提供用于治疗贫血的方法,其中所述方法包括将生长分化因子11(GDF11;亦称为骨形态生成蛋白11(BMP-11))的拮抗剂给予需要治疗的患者。在某些实施方案中,所述方法包括给予有需要的个体(例如患有贫血的个体)治疗有效量的GDF11拮抗剂。在某些具体的实施方案中,GDF11拮抗剂不是ActRII受体或ActRII受体的衍生物,例如不是ActRIIA-Fc融合蛋白或ActRIIB-Fc融合蛋白。GDF11拮抗剂可在任何水平上对GDF11起作用,即可降低或消除GDF11表达、降低GDF11稳定性(例如通过增加GDF11降解)或拮抗GDF11活性(例如通过防止GDF11与其受体结合)。GDF11拮抗剂更详细的描述可见下面的第(Error!Reference source notfound.)节。

[0038] 在某些实施方案中,本文提供用于提高贫血患者的红细胞水平的方法(对于待用本文所述方法治疗的贫血类型参见例如第5.2节)。可如下描述本文提供的方法的生理结果。具体地说,以下参数的提高表明患者贫血的治疗。在某些实施方案中,红细胞水平提高至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%。在某些实施方案中,血红蛋白水平提高至少1%、2%、

3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%。在某些实施方案中,血细胞比容水平提高至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%。在某些实施方案中,集落形成单位水平提高至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%。在某些实施方案中,平均细胞容积提高至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%。在某些实施方案中,平均细胞血红蛋白提高至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%。在某些实施方案中,平均红细胞血红蛋白浓度提高至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%。

[0039] 还可如下描述本文提供的方法的生理结果。具体地说,下列参数的降低表明患者的无效红细胞发生的治疗。在某些实施方案中,血液中网织红细胞的比率降低至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%。在某些实施方案中,血液中网织红细胞的比率降低至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%。在某些实施方案中,脾重或脾细胞总数降低至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%。在某些实施方案中,每股骨的骨髓细胞数降低至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%。在某些实施方案中,骨髓成红细胞数降低至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%。

#### [0040] 5.2待治疗的贫血

[0041] 在某些实施方案中,待用本文提供的方法治疗的患者被诊断为贫血。在某些更具体的实施方案中,贫血由无效红细胞发生引起。在某些实施方案中,本文提供用于治疗遗传性骨髓衰竭综合征(例如但不限于无巨核细胞性血小板减少症、戴-布贫血(Diamond-Blackfan Anemia)、先天性角化不良、范科尼贫血、皮尔逊综合征(Pearson Syndrome)、重度先天性中性白细胞减少症、重度先天性中性白细胞减少症、血小板减少伴桡骨缺失

(Thrombocytopenia Absent Radii))的方法,特别是影响红细胞的遗传性骨髓衰竭综合征。更具体地讲,本文提供方法用于治疗特异性影响红细胞的遗传性骨髓衰竭综合征。在某些实施方案中,本文提供用于治疗贫血的方法,其中对象对给予红细胞生成素无反应。在某些实施方案中,本文提供用于治疗贫血的方法,其中对象对给予铁、维生素B-12和/或叶酸无反应。在某些实施方案中,本文提供用于治疗贫血的方法,所述贫血由对通过细胞凋亡的死亡十分敏感的祖红细胞和红细胞前体引起。

[0042] 在某些甚至更具体的实施方案中,待用本文提供的方法治疗的患者被诊断为 $\beta$ 地中海贫血。 $\beta$ 地中海贫血是特征在于血红蛋白合成缺陷的疾病,所述血红蛋白合成缺陷导致红细胞成熟和产生受损。该疾病主要被认为是在红细胞分化的晚嗜碱性/多染性成红细胞期由于红细胞分化和凋亡异常加速,导致了成熟红细胞产生的总体降低所致。该疾病的特征在于细胞过多的骨髓腔隙,在所述骨髓腔隙中成红细胞蓄积并进行细胞凋亡,导致全身性贫血。

[0043] 在某些实施方案中,待用本文提供的方法治疗的患者的脾和/或骨髓和/或血清和/或血浆和/或肝中的GDF11表达和/或活性的水平提高。在某些实施方案中,对患者的GDF11水平相对于贫血之前同一人中的GDF11表达和/或活性的水平(如果可获得样品或数据)或相对于没有贫血的人的GDF11表达和/或活性的水平进行比较。在某些实施方案中,测量并比较脾、骨髓、血清、血浆和/或肝中的GDF11表达和/或活性水平。在某些实施方案中,待用本文提供的方法治疗的患者GDF11 mRNA水平升高至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%或至少500%。在某些实施方案中,待用本文提供的方法治疗的患者GDF11蛋白水平升高至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、250%或至少500%。

[0044] 在某些实施方案中,待用本文提供的方法治疗的患者对用红细胞生成素没有反应。在某些实施方案中,本文提供的方法共同给予EPO,其中EPO可在给予GDF11拮抗剂之前、与之同时或之后给予。

[0045] 在某些实施方案中,待用本文提供的方法治疗的患者血红蛋白水平小于13g/dl、小于12.5g/dl、小于12g/dl、小于11.5g/dl、小于11g/dl、小于10.5g/dl、小于10g/dl、小于9.5g/dl或小于9g/dl。

[0046] 在某些实施方案中,待用本文提供的方法治疗的贫血是化学疗法诱发的贫血。

[0047] 5.3GDF11的拮抗剂

[0048] 下面描述了可用于本文提供的方法的GDF11拮抗剂。在某些实施方案中,可用于本文提供的方法的GDF11拮抗剂靶向GDF11的表达。在其它实施方案中,可用于本文提供的方法的GDF11拮抗剂靶向GDF11的活性。在其它实施方案中,可用于本文提供的方法的GDF11拮抗剂靶向GDF11的蛋白质稳定性(例如增加降解)。例如,可采用下述第5.4节所述测定法,证实可用于本文提供的方法的GDF11拮抗剂的适合性。

[0049] 因此,用于本文提供的方法的GDF11拮抗剂例如减量调节/降低、抵消、阻断、抑制

和/或改进GDF11表达和/或GDF11介导的生物作用。在一个实施方案中,GDF11拮抗剂能够抑制GDF11的活性、信号转导、受体结合、表达、加工或分泌。因此,相对于不存在拮抗剂的GDF11活性,所述GDF11拮抗剂降低GDF11的活性。在某些实施方案中,GDF11蛋白的活性降低至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或至少100%。在一个实施方案中,GDF11拮抗剂还可影响GDF11蛋白的稳定性。在另一个实施方案中,GDF11拮抗剂可影响GDF11前体蛋白转化成成熟的GDF11形式。在另一个实施方案中,GDF11拮抗剂可干扰GDF11与同族受体(例如ActRII受体)结合和/或通过GDF11同族受体抑制胞内信号转导。

[0050] GDF11拮抗剂包括GDF11“截留剂(trap)”(例如抑制性GDF11受体多肽(例如ActRII多肽))、抗GDF11抗体、GDF11前肽、GDF11类似物(例如显性阴性多肽、肽模拟物(peptidomimetics))、其它GDF11结合蛋白(例如滤泡素抑制素、滤泡素抑制素相关基因、含有滤泡素抑制素结构域的蛋白质)、合成小分子抑制剂、抑制GDF11表达的多核苷酸(例如反义物、干扰RNA(RNAi)及三联分子和核酶)等。在其它实施方案中,GDF11拮抗剂还包括抗GDF11受体(例如ActRIIB和ActRIIA)的抗体。在某些具体的实施方案中,GDF11拮抗剂与GDF11受体(例如ActRIIB和ActRIIA)结合并防止GDF11与其受体结合(例如通过位阻)但不(或较小程度)影响其它配体(例如激活素A)的结合。

[0051] 在某些实施方案中,用于本文提供的方法的GDF11拮抗剂不是ActRIIA多肽和/或ActRIIB多肽。在某些实施方案中,用于本文提供的方法的GDF11拮抗剂不是ActRIIA的抑制剂和/或ActRIIB多肽的抑制剂。在某些实施方案中,用于本文提供的方法的GDF11拮抗剂不含ActRIIA的配体结合部分和/或ActRIIB的配体结合部分。

[0052] 在某些实施方案中,GDF11拮抗剂与GDF11多肽序列、片段或其变体结合。在一个实施方案中,GDF11拮抗剂与非哺乳动物(例如鸡、鱼)的GDF11蛋白结合。在另一个实施方案中,GDF11拮抗剂与哺乳动物(例如人、小鼠、大鼠、狗、猫、猪、沙鼠、仓鼠、牛、马、山羊、绵羊、兔、骆驼、食蟹猴、黑猩猩、绒猴、猕猴)的GDF11蛋白结合。已描述了多种GDF11分子,且同源物是本领域众所周知的。在又一个实施方案中,GDF11拮抗剂与具有SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:52的多肽序列的人GDF11蛋白结合。

[0053] 与其它TGF- $\beta$ 家族成员一样,GDF11作为前蛋白质原合成,其包括信号序列、氨基端前肽和由二硫键连接的片段组成的羧基端。前肽白水解性地从分子的其余部分切割,留下生物活性羧基端二聚体作为成熟的受体结合形式。前肽起成熟GDF11二聚体的抑制剂、结合和抑制其活性的作用。全长未加工的前体蛋白,即GDF11前蛋白质原可具有SEQ ID NO:48的氨基酸序列,GDF前肽可具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列,GDF11的成熟形式具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列。

#### [0054] 5.3.1抗GDF11抗体

[0055] 在某些实施方案中,针对GDF11的抗体可用于本文提供的方法。在某些实施方案中,针对GDF11的抗体与GDF11免疫特异性地结合。具体地说,在某些实施方案中,所述抗GDF11抗体以比任何其它蛋白质高的结合亲和力与GDF11结合。在具体的实施方案中,抗GDF11抗体以比GDF8高的亲和力与GDF11结合。在一个具体实施方案中,抗GDF11抗体不与GDF8交叉反应。在具体的实施方案中,抗GDF11抗体以比激活素A高的亲和力与GDF11结合。

在一个具体实施方案中,抗GDF11抗体不与激活素A交叉反应。

[0056] 可通过使用GDF11作为免疫原,通过标准方案制备抗蛋白质/抗肽抗血清或单克隆抗体(参见例如Antibodies:A Laboratory Manual,Harlow和Lane主编(Cold Spring Harbor Press:1988))。可用GDF11的免疫原性形式(一种能够诱导抗体应答的抗原片段或融合蛋白)使哺乳动物(例如小鼠、仓鼠或兔)免疫。用于赋予蛋白质或肽免疫原性的技术包括与载体缀合或本领域众所周知的其它技术。可在佐剂的存在下给予GDF11的免疫原性部分。可通过检测血浆或血清中的抗体滴度,来监测免疫过程。标准ELISA或其它免疫测定法可与作为抗原的免疫原一起使用以评价抗体的水平。

[0057] 在动物用GDF11的抗原制备物免疫后,可获得抗血清,并且如有需要,可从血清分离多克隆抗体。为了产生单克隆抗体,可从经免疫的动物中收获产抗体细胞(淋巴细胞),并通过标准体细胞融合方法与永生化细胞(例如骨髓瘤细胞)融合以产生杂交瘤细胞。该技术是本领域众所周知的,包括例如杂交瘤技术(最初由Kohler和Milstein开发(1975)Nature, 256:495-497)、人B细胞杂交瘤技术(Kozbar等(1983)Immunology Today,4:72)和EBV-杂交瘤技术以产生人单克隆抗体(Cole等(1985)Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,Inc.第77-96页)。可针对与GDF11有特异性反应的抗体的产生来筛选杂交瘤细胞,并从包含这类杂交瘤细胞的培养物中分离单克隆抗体。

[0058] 本文所用术语“抗体”意在包括其还与主题多肽有特异性反应的片段。可采用常规技术使抗体片段化,并可按上述对于完整抗体的相同方式针对实用性筛选片段。例如,可将抗体用胃蛋白酶处理以产生F(ab)<sub>2</sub>片段。可对所得F(ab)<sub>2</sub>片段进行处理以还原二硫桥,得到Fab片段。抗体还意在包括双特异性、单链、嵌合、人源化和完整的人分子,其具有由抗体的至少一个CDR区所赋予的对ActRII受体或激活素多肽的亲合力。术语“抗体”还包括Fab、Fab'和F(ab')片段。

[0059] 在某些实施方案中,抗体是重组抗体,该术语包括部分通过分子生物学技术产生的任何抗体,包括CDR移植抗体或嵌合抗体、从文库选择的抗体结构域装配的人抗体或其它抗体、单链抗体和单结构域抗体(例如人V<sub>H</sub>蛋白或骆驼VHH蛋白)。在某些实施方案中,抗体可以是单克隆抗体。各单克隆抗体通常识别单一表位,并且是获自均质或基本均质的抗体群的抗体。术语“单克隆”不限于任何特定的生产方法。例如,用于产生与GDF11特异性结合的单克隆抗体的方法可包括给予小鼠一定量的包含有效刺激可检测的免疫应答的抗原多肽的免疫原性组合物,从小鼠中获得产抗体细胞(例如来自脾的细胞),使产抗体细胞与骨髓瘤细胞融合以得到产抗体的杂交瘤,并测试产抗体的杂交瘤以鉴定产生与抗原特异性结合的单克隆抗体的杂交瘤。杂交瘤一旦获得,便可在细胞培养物中增殖,任选在其中杂交瘤来源的细胞产生与抗原特异性结合的单克隆抗体的培养条件下。单克隆抗体可从细胞培养物中纯化。

[0060] 如本领域一般所理解的,提及抗体时使用的形容词“与.....有特异性反应的”意指在目标抗原(例如GDF11多肽)和其它非目标抗原之间有足够选择性的抗体,所述抗体可用于至少检出特定类型的生物样品中目标抗原的存在。在使用抗体的某些方法中,例如治疗应用,在结合国可能需要较高程度的特异性。单克隆抗体一般具有有效区别所需抗原和交叉反应性多肽的较大趋向(与多克隆抗体相比)。影响抗体:抗原相互作用的特异性一个特征是抗体对抗原的亲合力。虽然所需特异性可在不同亲和力的范围内达到,但是抗体

一般可具有约 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 或 $10^{-10}$ 或更小的亲和力(解离常数)。

[0061] 另外,用于筛选抗体以鉴定所需抗体的技术可影响所获得的抗体的性质。例如,如果抗体用于结合溶液中的抗原,则可能需要测试溶液结合。可获得各种不同技术用于测试抗体和抗原间的相互作用以鉴定特别需要的抗体。所述技术包括ELISA、表面等离子共振结合测定法(例如BIACORE结合测定法,Biacore AB,Uppsala,Sweden)、夹心测定法(例如IGEN International,Inc.,Gaithersburg,Md.的顺磁珠系统)、蛋白质印迹法、免疫沉淀测定法和免疫组织化学。

[0062] 在一个实施方案中,抗GDF11抗体以高亲和力结合GDF11。因此,在一个实施方案中,抗GDF11抗体的IC<sub>50</sub>小于或等于约40nM、30nM、25nM、20nM或10nM。在另一个实施方案中,在用于与GDF11结合的体外测定法(例如BIACORE测定法或ELISA测定法)中,特异性结合GDF11的抗GDF11抗体的IC<sub>50</sub>值小于或等于约5nM、4nM、3nM或1nM。在一个实施方案中,用于所述方法的抗GDF11抗体对GDF11具有强的结合亲和力(K<sub>d</sub>)。因此抗GDF11抗体的K<sub>d</sub>小于约 $4.2 \times 10^{-9}$ M或 $4.0 \times 10^{-9}$ M、小于约 $4.6 \times 10^{-10}$ M、 $4.0 \times 10^{-10}$ M或 $2 \times 10^{-10}$ M或小于约 $8 \times 10^{-11}$ M、 $7 \times 10^{-11}$ M、 $5 \times 10^{-12}$ M或 $1.4 \times 10^{-12}$ M。或者,用于本文所述方法的抗GDF抗体对GDF11的K<sub>d</sub>不大于约 $4.2 \times 10^{-9}$ M或 $4.0 \times 10^{-9}$ M、不大于约 $4.6 \times 10^{-10}$ M、 $4.0 \times 10^{-10}$ M或 $2 \times 10^{-10}$ M或不大于约 $8 \times 10^{-11}$ M、 $7 \times 10^{-11}$ M、 $5 \times 10^{-12}$ M或 $1.4 \times 10^{-12}$ M。可通过本领域众所周知的方法(使用例如BIACORE™系统),测定抗GDF11抗体的K<sub>d</sub>。

[0063] 在另一个实施方案中,相对于肌肉生长抑制素/GDF8,抗GDF11抗体优先结合GDF11。因此,在一个实施方案中,与GDF-8相比,用于本文所述方法的抗GDF11抗体以至少1.5倍或更高倍、至少2倍或更高倍、至少2.5倍或更高倍、至少3倍或更高倍、至少3.5倍或更高倍或至少4倍或更高倍对GDF11的优先选择结合GDF11。在另一个实施方案中,相对于肌肉生长抑制素/GDF8,抗GDF11抗体优先抑制GDF11活性。GDF8/11抗体的实例公开于例如若干已公布的专利和申请中,例如美国专利号8,066,995;7,320,789(鼠单克隆抗体JA-16,ATCC保藏号PTA-4236);美国专利号7,655,763(例如人单克隆抗体Myo29(Stamulumab)(ATCC保藏号PTA-4741)、Myo22(ATCC保藏号PTA-4740)、Myo28(ATCC保藏号PTA-4739));美国专利号7,261,893和美国专利申请号20110293630(序号13/115,170)。可用于本文提供的方法的单克隆抗体的实例包括来自LifeSpan Biosciences Inc.,Seattle,WA的抗体,其目录号为LS-C121127、LS-C138772、LS-C105098(可获得);可获自Santa Cruz Biotechnology,Inc.,Santa Cruz,CA的抗体,其目录号为(X-19):sc-81952和可获自Sigma-Aldrich Co.LLC的抗体,其产品编号为:WH0010220M3。技术人员可采用常规技术使用这些抗体的抗原结合序列(例如CDR),并产生本文公开的用于治疗贫血的人源化抗体。

[0064] 5.3.2包含ACTRII多肽的GDF11拮抗剂

[0065] 在某些实施方案中,GDF11拮抗剂包含ActRII受体(例如ActRIIA或ActRIIB,例如人ActRIIA或ActRIIB)的胞外域的一部分。更具体地讲,这类GDF11拮抗剂可以是包含ActRII(例如ActRIIA或ActRIIB)的GDF11结合结构域的多肽。虽不受理论的束缚,但是包含这类GDF11结合结构域的多肽将GDF11隔离,从而防止GDF11信号转导。包含这些GDF11结合结构域的多肽可包含ActRII受体的胞外域的全部或一部分(即ActRIIA的胞外域的全部或一部分或ActRIIB的胞外域的全部或一部分)。在具体的实施方案中,ActRII受体的胞外域是可溶的。

[0066] 在某些实施方案中,ActRII受体的GDF11结合胞外域相对于野生型受体发生突变,使得ActRII受体的GDF11结合胞外域以比对任何其它TGF $\beta$ 高的亲和力与GDF11结合。具体地说,ActRII受体的GDF11结合胞外域相对于野生型受体发生突变,使得ActRII受体的GDF11结合胞外域以比对激活素A高的亲和力与GDF11结合。所述较高的亲和力可为比对次最高的亲和力配体的亲和力高至少10%、25%、50%、75%、100%、250%、500%或1000%。

[0067] 在某些实施方案中,将包含GDF11结合结构域的多肽与抗体的Fc部分连接(即产生包含含ActRII受体的多肽的激活素结合结构域和抗体的Fc部分的缀合物)。虽不受理论的束缚,但是抗体部分赋予缀合物高的稳定性和/或降低患者对于GDF11拮抗剂的免疫应答。在某些实施方案中,GDF11结合结构域通过接头(例如肽接头)与抗体的Fc部分连接。

[0068] 这类ActRII多肽GDF11拮抗剂的实例公开于若干已公布的专利/申请中。例如,公开于美国专利号7,709,605、美国专利号8,252,900、美国专利号7,960,343、美国专利号7,988,973的ActRIIA多肽抑制剂。结合几种TGF- $\beta$ 配体的ActRIIB多肽抑制剂的实例是本领域已知的,并公开于例如美国专利号8,138,143、美国专利号8,058,229和美国专利号7,947,646。特异性结合GDF8和GDF11的ActRIIB多肽抑制剂的实例公开于美国专利号7,842,663。特异性结合GDF11的ActRIIB拮抗剂的实例公开于美国专利号8,216,997。临床用ActRII截留剂包括AMG-745、ACE-031和ACE-011。

[0069] (a) ACTRIIA

[0070] 本文所用术语“ActRIIA”是指来自任何物种的激活素受体IIa型(ActRIIA)蛋白的家族和通过诱变或其它修饰而来源于这类ActRIIA蛋白的变体。本文提及ActRIIA要理解为是提及任一种目前已鉴定的形式。ActRIIA家族的成员一般是跨膜蛋白质,由具有富含半胱氨酸的区域的配体结合胞外域、跨膜结构域和具有预测的丝氨酸/苏氨酸激酶活性的胞质结构域组成。

[0071] 术语“ActRIIA多肽”包括包含ActRIIA家族成员的任何天然存在的多肽及其保持有益活性的任何变体(包括突变体、片段、融合物和肽模拟物形式)的多肽。例如,ActRIIA多肽包括来源于任何已知ActRIIA的序列的多肽,所述序列具有与ActRIIA多肽的序列有至少约80%同一性和任选至少85%、90%、95%、97%、98%、99%或更大同一性。ActRIIA多肽的实例包括人ActRIIA前体多肽(SEQ ID NO:1)和可溶性人ActRIIA多肽(例如SEQ ID NO:2、3、7和12)。有关其氨基酸序列以SEQ ID NO:1描述的ActRIIA前体多肽,人ActRIIA前体多肽的信号肽位于氨基酸位置1-20;胞外域位于氨基酸位置21-135;人ActRIIA前体多肽(SEQ ID NO:1)的N-联糖基化位点位于SEQ ID NO:1的氨基酸位置43和56。编码SEQ ID NO:1的人ActRIIB前体多肽的核酸序列以SEQ ID NO:4(Genbank条目NM\_001616的核苷酸164-1705)公开。编码SEQ ID NO:2的可溶性人ActRIIA多肽的核酸序列以SEQ ID NO:5公开。有关该序列的描述参见表1。

[0072] 在具体的实施方案中,用于本文所述组合物和方法的ActRIIA多肽是可溶性ActRIIA多肽。本文所用术语“可溶性ActRIIA多肽”一般是指包含ActRIIA蛋白的胞外域的多肽,包括ActRIIA蛋白的任何天然存在的胞外域及其任何变体(包括突变体、片段和肽模拟物形式)。用于本文提供的方法的可溶性ActRIIA多肽以比对激活素A高的亲和力与GDF11结合。在某些实施方案中,用于本文提供的方法的可溶性ActRIIA多肽以比对TGF- $\beta$ 超家族的任何其它成员高的亲和力与GDF11结合。可通过将天然或改变的ActRIIA蛋白与第二

GDF11选择性结合剂偶联赋予天然或改变的ActRIIA蛋白对GDF11的附加的特异性。

[0073] 在具体的实施方案中,用于本文提供的方法的ActRIIA多肽不是具有SEQ ID NO: 2、3、6、7、12和13的氨基酸序列但是与这些氨基酸序列的任一个有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的多肽。

[0074] 对于ActRIIA多肽的合成,可使用下列前导序列:蜜蜂蜂毒肽(mellitin)前导序列(SEQ ID NO:8)、组织纤溶酶原激活物(TPA)前导序列(SEQ ID NO:9)或天然ActRIIA前导序列(SEQ ID NO:10)。

[0075] 在某些实施方案中,用于本文所述组合物和方法的GDF11拮抗剂包含含有与抗体的Fc部分连接的ActRIIA的GDF11结合结构域的缀合物/融合蛋白。在某些实施方案中,激活素结合结构域通过接头(例如肽接头)与抗体的Fc部分连接。任选Fc结构域在残基(例如Asp-265、赖氨酸322和Asn-434)上具有一个或多个突变。在某些情况下,相对于野生型Fc结构域,具有这些突变(例如Asp-265突变)的一个或多个的突变型Fc结构域与Fc $\gamma$ 受体结合的能力降低。在其它情况下,相对于野生型Fc结构域,具有这些突变(例如Asn-434突变)的一个或多个的突变型Fc结构域与MHC I类相关Fc-受体(FcRN)结合的能力提高。

[0076] 在某些实施方案中,用于本文所述组合物和方法的ActRIIA的GDF11结合结构域包含截短形式的ActRIIA胞外域。截短可位于ActRIIA多肽的羧基端和/或氨基端。在某些实施方案中,相对于成熟ActRIIB多肽胞外域,截短长度可为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸。在某些实施方案中,截短可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个成熟ActRIIA多肽胞外域的N端氨基酸。在某些实施方案中,截短可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个成熟ActRIIA多肽胞外域的C端氨基酸。例如,截短形式的ActRIIA包括具有氨基酸20-119、20-128、20-129、20-130、20-131、20-132、20-133、20-134、20-131、21-131、22-131、23-131、24-131和25-131的多肽,其中氨基酸位置是指SEQ ID NO:1中的氨基酸位置。

[0077] 在某些实施方案中,用于本文所述组合物和方法的ActRIIA的GDF11结合结构域包含具有一个或多个氨基酸取代、添加和/或缺失的ActRIIA的胞外域。在某些实施方案中,用于本文所述组合物和方法的ActRIIA的抑制剂包含还携带氨基酸取代的截短形式的ActRIIA胞外域。

[0078] 在一个具体实施方案中,待用于本文所述组合物和方法的GDF11抑制剂是人ActRIIA受体的胞外域和IgG1的Fc部分之间的融合蛋白。在另一个具体实施方案中,待用于本文所述组合物和方法的GDF11抑制剂是截短的人ActRIIA受体胞外域和IgG1的Fc部分之间的融合蛋白。在另一个具体实施方案中,待用于本文所述组合物和方法的GDF11抑制剂是截短的人ActRIIA受体胞外域和IgG1的Fc部分之间的融合蛋白,其中截短的人ActRIIA受体胞外域具有一个或多个氨基酸取代。

[0079] 可通过例如筛选从编码ActRIIA多肽的核酸的相应片段重组产生的多肽,来获得ActRIIA多肽的功能活性片段。另外,可采用本领域已知的技术,例如常规Merrifield固相f-Moc或t-Boc化学,来化学合成所述片段。所述片段可(重组或通过化学合成)产生,并测试以鉴定起ActRIIA蛋白或由激活素介导的信号转导的拮抗剂(抑制剂)作用的那些肽基片段。

[0080] 另外,可通过例如筛选自编码ActRIIA多肽的相应的诱变核酸重组产生的修饰多肽的文库,来获得ActRIIA多肽的功能活性变体。可产生所述变体,并测试以鉴定可起GDF11信号转导或与ActRIIA结合的拮抗剂(抑制剂)作用的变体。在某些实施方案中,ActRIIA多肽的功能变体(即具有GDF11结合活性)包含与选自SEQ ID NO:2或3的氨基酸序列有至少75%同一性的氨基酸序列。在某些情况下,功能变体具有与选自SEQ ID NO:2或3的氨基酸序列有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0081] 存在许多方法,籍此可从简并寡核苷酸序列产生潜在同源物的文库。简并基因序列的化学合成可在自动DNA合成仪中进行,然后将合成基因连接至用于表达的合适载体中。简并寡核苷酸的合成是本领域众所周知的(参见例如Narang,S A(1983) *Tetrahedron* 39:3;Itakura等(1981) *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, 编辑AG Walton, Amsterdam: Elsevier第273-289页;Itakura等(1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323;Itakura等(1984) *Science* 198:1056;Ike等(1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477)。该技术已用于其它蛋白质的定向进化(参见例如Scott等(1990) *Science* 249:386-390;Roberts等(1992) *PNAS USA* 89:2429-2433;Devlin等(1990) *Science* 249:404-406;Cwirla等(1990) *PNAS USA* 87:6378-6382;以及美国专利号5,223,409、5,198,346和5,096,815)。

[0082] 或者,可利用其它诱变形式来产生组合文库。例如,可采用以下诱变产生ActRIIA多肽变体,并且通过筛选从文库中分离出ActRIIA多肽变体:例如丙氨酸扫描诱变等(Ruf等(1994) *Biochemistry* 33:1565-1572;Wang等(1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099;Balint等(1993) *Gene* 137:109-118;Grodberg等(1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601;Nagashima等(1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892;Lowman等(1991) *Biochemistry* 30:10832-10838;以及Cunningham等(1989) *Science* 244:1081-1085);通过接头扫描诱变(Gustin等(1993) *Virology* 193:653-660;Brown等(1992) *Mol. Cell Biol.* 12:2644-2652;McKnight等(1982) *Science* 232:316);通过饱和诱变(Meyers等(1986) *Science* 232:613);通过PCR诱变(Leung等(1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19)或通过随机诱变,包括化学诱变等(Miller等(1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, N.Y.;以及Greener等(1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34)。接头扫描诱变,特别是在组合情况下,是用于鉴定截短(生物活性)形式的ActRIIA多肽的有吸引力的方法。

[0083] 对于筛选通过点突变和截短制备的组合文库的基因产物,以及在这方面,对于筛选具有某种性质的基因产物的cDNA文库,各种技术是本领域已知的。所述技术一般可适于通过ActRIIA多肽的组合诱变而产生的基因文库的快速筛选。用于筛选大基因文库的最广泛使用的技术通常包括将基因文库克隆至可复制的表达载体中,将合适的细胞用所得载体文库转化,并在所需活性的检测有利于相对容易地分离载体(其编码所检测产物的基因)的条件下表达所述组合基因。优选的测定法包括GDF11结合测定法和激活素介导的细胞信号转导测定法。

[0084] 在某些方面,ActRIIA多肽的功能变体或修饰形式包括具有ActRIIA多肽的至少一部分和一个或多个融合结构域的融合蛋白。这类融合结构域的众所周知的实例包括但不限于多聚组氨酸、Glu-Glu、谷胱甘肽S转移酶(GST)、硫氧还蛋白、蛋白质A、蛋白质G、免疫球蛋白重链恒定区(Fc)、麦芽糖结合蛋白(MBP)或人血清白蛋白。可以选择融合结构域以提供所需性质。例如,一些融合结构域特别可用于通过亲和色谱法分离融合蛋白。为了亲和纯化的

目的,使用用于亲和色谱法的相关基质,例如谷胱甘肽-、淀粉酶-和镍-或钴-缀合的树脂。许多的这类基质可以“试剂盒”形式获得,例如可与(HIS<sub>6</sub>)融合配偶体一起使用的Pharmacia GST纯化系统和QIAexpress.TM.系统(Qiagen)。作为另一个实例,可选择融合结构域以促进ActRIIA多肽的检测。这类检测结构域的实例包括各种荧光蛋白(例如GFP)以及“表位标签”,所述表位标签通常是短肽序列,可获得针对该短肽序列的特异性抗体。可容易获得特异性单克隆抗体所针对的众所周知的表位标签包括FLAG、流感病毒血凝素(HA)和c-myc标签。在一些情况下,融合结构域具有例如用于因子Xa或凝血酶的蛋白酶切割位点,其允许相关蛋白酶部分消化融合蛋白,从而由其释放重组蛋白。可通过后续色谱分离,从融合结构域分离释放的蛋白质。在某些实施方案中,ActRIIA多肽与体内稳定ActRIIA多肽的结构域(“稳定剂”结构域)融合。所谓“稳定”意指延长血清半寿期的任何情况,不论是因为破坏减少、肾清除降低还是其它药代动力学作用。已知与免疫球蛋白的Fc部分融合赋予各种蛋白质所需要的药代动力学性质。同样,与人血清白蛋白融合可提供所需性质。可以选择的其它类型的融合结构域包括多聚化(例如二聚化、四聚化)结构域和(按需要赋予其它生物功能,例如进一步刺激骨生长或肌肉生长)的功能结构域。

[0085] 要了解,融合蛋白的不同元件可按与所需功能性一致的任何方式排列。例如,ActRIIA多肽可置于异源结构域的C端,或者,异源结构域可置于ActRIIA多肽的C端。ActRIIA多肽结构域和异源结构域在融合蛋白中不一定相邻,结构域的C端或N端或结构域之间可包括其它结构域或氨基酸序列。

[0086] 在某些实施方案中,用于本文所述方法和组合物的ActRIIA多肽含有能够稳定ActRIIA多肽的一个或多个修饰。例如,这类修饰延长ActRIIA多肽的体外半寿期、延长ActRIIA多肽的循环半寿期或降低ActRIIA多肽的蛋白水解性降解。这类稳定性修饰包括但不限于融合蛋白(包括例如包含ActRIIA多肽和稳定剂结构域的融合蛋白)、糖基化位点的修饰(包括例如将糖基化位点加至ActRIIA多肽中)和糖部分的修饰(包括例如从ActRIIA多肽中脱去糖部分)。在融合蛋白的情况下,ActRIIA多肽与稳定剂结构域例如IgG分子(例如Fc结构域)融合。在融合蛋白的情况下,本文所用术语“稳定剂结构域”不仅仅是指融合结构域(例如Fc),而且还包括非蛋白质性修饰(例如糖部分)或非蛋白质性聚合物(例如聚乙二醇)。

[0087] 在某些实施方案中,分离自或以别的方式基本不含其它蛋白质的分离和/或纯化形式的ActRIIA多肽可用于本文所述方法和组合物。ActRIIA多肽一般可通过自重组核酸表达来产生。

[0088] 在某些方面,分离核酸和/或重组核酸可用来产生任何ActRIIA多肽(例如可溶性ActRIIA多肽),包括用于本文公开的方法和组合物的片段、功能变体和融合蛋白。

[0089] 一些哺乳动物表达载体含有促进载体在细菌中增殖的原核序列和在真核细胞中表达的一个或多个真核转录单位两者。pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo和pHyg来源的载体是适于真核细胞转染的哺乳动物表达载体的实例。这些载体中的一些被细菌质粒(例如pBR322)的序列修饰,以促进在原核和真核细胞两者中的复制和耐药性选择。或者,病毒例如牛乳头状瘤病毒(BPV-1)或埃-巴病毒(pHEBo、pREP来源的和p205)的衍生物可用于真核细胞中蛋白质的瞬时表达。其它病毒(包括反转录病毒)表达系统的实例可参见下面的基因疗法递送系统中的

描述。用于质粒制备和宿主生物转化的各种方法是本领域众所周知的。有关用于原核和真核细胞两者的其它稳定的表达系统以及通用重组方法,参见Molecular Cloning A Laboratory Manual,第3版,由Sambrook,Fritsch和Maniatis编辑(Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001)。在某些情况下,可能需要通过杆状病毒表达系统来表达重组多肽。这类杆状病毒表达系统的实例包括pVL来源的载体(例如pVL1392、pVL1393和pVL941)、pAcUW来源的载体(例如pAcUW1)和pBlueBac来源的载体(例如含有 $\beta$ -gal的pBlueBac III)。

[0090] 可以设计用于在CHO细胞中产生主题ActRIIA多肽的载体,例如Pcmv-Script载体(Stratagene,La Jolla,Calif.)、pcDNA4载体(Invitrogen,Carlsbad,Calif.)和pCI-neo载体(Promega,Madison,Wis.)。显然,可使用主题基因构建体以使主题ActRIIA多肽在培养中增殖的细胞中表达,例如以产生用于纯化的蛋白质,包括融合蛋白或变异蛋白质。

[0091] 因此,本文提供产生ActRIIA多肽的方法。例如,可在合适的条件下培养用编码ActRIIA多肽的表达载体转染的宿主细胞,以使ActRIIA多肽进行表达。ActRIIA多肽可分泌,并自含有ActRIIA多肽的细胞和培养基的混合物中分离。或者,ActRIIA多肽可保持在胞质中或保持在膜级分;已收获、裂解的细胞;以及分离的蛋白质中。细胞培养物包括宿主细胞、培养基和其它副产物。用于细胞培养的合适的培养基是本领域众所周知的。可采用本领域已知的用于纯化蛋白质的技术,包括离子交换色谱法、凝胶过滤色谱法、超滤法、电泳、用对ActRIIA多肽的特定表位有特异性的抗体的免疫亲和纯化和用与ActRIIA多肽融合的结构域结合的作用剂的亲和纯化(例如蛋白质A柱可用来纯化ActRIIA-Fc融合物),将主题ActRIIA多肽从细胞培养基、宿主细胞或两者中分离。在一个实施方案中,ActRIIA多肽是含有促进其纯化的结构域的融合蛋白。在一个实施方案中,通过一系列柱色谱法步骤,包括例如任何顺序的以下三种或更多种来实现纯化:蛋白质A色谱法、Q琼脂糖色谱法、苯基琼脂糖凝胶(phenylsepharose)色谱法、大小排阻色谱法和阳离子交换色谱法。可用病毒过滤和缓冲液交换完成纯化。如本文所示,ActRIIA-hFc蛋白被纯化至 $>98\%$ (通过大小排阻色谱法测定)和 $>95\%$ (通过SDS PAGE测定)的纯度。这种纯度水平足以实现对小鼠骨的所需作用及在小鼠、大鼠和非人类灵长类动物中可接受的安全特征。

[0092] 在另一个实施方案中,通过使用 $Ni^{2+}$ 金属树脂的亲和色谱法纯化,编码纯化前导序列(例如重组ActRIIA多肽所需部分N端的聚(His)/肠激酶切割位点序列)的融合基因可允许纯化已表达的融合蛋白。然后,接着可用肠激酶处理脱去纯化前导序列以提供纯化的ActRIIA多肽(例如参见Hochuli等(1987)J.Chromatography 411:177;以及Janknecht等,PNAS USA 88:8972)。

[0093] 用于制备融合基因的技术也是众所周知的。基本上,按照常规技术如下进行编码不同多肽序列的各个DNA片段的连接:使用连接用平端或交错端、提供合适末端的限制性内切酶消化、适当时补平黏端、碱性磷酸酶处理以避免不合乎需要的连接、并酶促连接。在另一个实施方案中,可通过常规技术(包括自动化DNA合成仪),来合成融合基因。或者,基因片段的PCR扩增可以使用锚定引物进行,所述锚定引物在两个相邻的基因片段之间产生互补突出端,其随后可连接以形成嵌合基因序列(参见例如Current Protocols in Molecular Biology,编辑Ausubel等,John Wiley&Sohns:1992)。

[0094] 可使用SEQ ID NO:9的组织纤溶酶原前导序列,在来自pAID4载体(SV40 ori/增强子、CMV启动子)的稳定转染的CHO-DUKX B11细胞中表达ActRIIA-Fc融合蛋白。Fc部分是人

IgG1 Fc序列,如SEQ ID NO:7所示。在某些实施方案中,在表达时,所含蛋白质每分子的ActRIIA-Fc融合蛋白平均具有约1.5和2.5摩尔唾液酸。

[0095] 在某些实施方案中,ActRIIA-Fc融合物长的血清半寿期在人类患者中可为25-32天。此外,与所报告的在人293细胞中表达的ActRIIA-hFc融合蛋白相比,CHO细胞表达的产物可具有对激活素B配体的较高亲和力(de1 Re等,J Biol Chem.2004 Dec 17;279(51):53126-35)。此外,虽不受理论的束缚,但是与具有天然前导序列表达的ActRIIA-Fc不一样,使用提供比其它前导序列更大产量的TPA前导序列,可提供高纯的N端序列。使用天然前导序列可导致ActRIIA-Fc的两个主要类别,各具有不同的N端序列。

[0096] (b) ACTRIIB

[0097] 本文所用术语“ActRIIB”是指来自任何物种的激活素受体IIb型(ActRIIB)蛋白家族和通过诱变或其它修饰来源于这类ActRIIB蛋白的变体。本文提及ActRIIB要理解为是提及任一种目前已鉴定的形式。ActRIIB家族的成员一般是跨膜蛋白质,由具有富含半胱氨酸的区域的配体结合胞外域、跨膜结构域和具有预测的丝氨酸/苏氨酸激酶活性的胞质结构域组成。

[0098] 术语“ActRIIB多肽”包括包含ActRIIB家族成员的任何天然存在的多肽及其保持有益活性的任何变体(包括突变体、片段、融合物和肽模拟物形式)的多肽。例如,ActRIIB多肽包括来源于任何已知ActRIIB的序列的多肽,所述序列具有与ActRIIB多肽的序列有至少约80%和任选至少85%、90%、95%、97%、98%、99%或更大同一性的序列。ActRIIB多肽的实例包括人ActRIIB前体多肽(SEQ ID NO:16或28)和可溶性人ActRIIB多肽。本文所述所有ActRIIB相关多肽的氨基酸的编号基于SEQ ID NO:16或28的氨基酸编号。有关其氨基酸序列以SEQ ID NO:16和28描述的ActRIIB前体多肽,人ActRIIB前体多肽的信号肽位于氨基酸位置1-18;胞外域位于氨基酸位置19-134,且人ActRIIB前体多肽的N-联糖基化位点位于氨基酸位置42和65。编码SEQ ID NO:16的人ActRIIB前体多肽的核酸序列以SEQ ID NO:19公开。有关该序列的描述参见表1。

[0099] 在具体的实施方案中,用于本文所述组合物和方法的ActRIIB多肽是可溶性ActRIIB多肽。本文所用术语“可溶性ActRIIB多肽”一般是指包含ActRIIB蛋白的胞外域的多肽,包括ActRIIB蛋白的任何天然存在的胞外域及其任何变体(包括突变体、片段和肽模拟物形式)。用于本文提供的方法的可溶性ActRIIB多肽以比激活素A高的亲和力与GDF11结合。在某些实施方案中,用于本文提供的方法的可溶性ActRIIB多肽以比TGF- $\beta$ 超家族的任何其它成员高的亲和力与GDF11结合。可通过将天然或改变的ActRIIB蛋白与第二GDF11选择性结合剂偶联赋予天然或改变的ActRIIB蛋白针对GDF11的附加的特异性。

[0100] 在具体的实施方案中,用于本文提供的方法的ActRIIB多肽不是具有SEQ ID NO:17、18、23-26、27、29、30、31、32、33、36、37、42和43的氨基酸序列但是与这些氨基酸序列的任一个有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的多肽。用于修饰ActRIIB多肽的方法描述于例如美国申请公布号2009/0005308和2010/0068215和国际专利申请公布号W0 2006/012627和W0 2010/019261(这些参考文献的公开内容以其整体结合到本文中)。

[0101] 在某些实施方案中,用于本文提供的方法的ActRIIB多肽在ActRIIB前体氨基酸序列的64位处具有精氨酸。

[0102] 已表明,ActRIIB胞外域C端的脯氨酸结(proline knot)的缺失降低受体对激活素的亲和力(参见例如Attisano等,Cell,1992,68(1):97-108)。相对于含有SEQ ID NO:28的氨基酸20-134的ActRIIB-Fc融合蛋白(即SEQ ID NO:31)，“ActRIIB(20-134)-Fc”(其包括脯氨酸结区和完全近膜域),含有SEQ ID NO:28的氨基酸20-119的ActRIIB-Fc融合蛋白(即SEQ ID NO:32)，“ActRIIB(20-119)-Fc”与GDF-11和激活素的结合减弱。然而,相对于ActRIIB的未截短的胞外域,含有SEQ ID NO:28的氨基酸20-129的ActRIIB-Fc融合蛋白,“ActRIIB(20-129)-Fc”保持相似但略降低的活性,即使脯氨酸结区被破坏。因此,预期包含止于SEQ ID NO:28(或SEQ ID NO:16)的氨基酸134、133、132、131、130和129的胞外域的ActRIIB多肽全部是有活性的,但是止于氨基酸134或133的构建体可能是有最高活性的。类似地,预期残基129-134任一个的突变不会大大改变配体结合亲和力,正如SEQ ID NO:28的P129和P130突变基本上不降低配体结合所表明的一样。因此,用于本文所述方法和组合物的ActRIIB多肽可早在SEQ ID NO:28(或SEQ ID NO:16)的氨基酸109(即最后的半胱氨酸)结束,然而,预期结束于SEQ ID NO:28(或SEQ ID NO:16)的氨基酸位置109和119处或之间的形式的配体结合能力降低。

[0103] 在某些实施方案中,SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:28的氨基酸29表示ActRIIB前体序列中的初始半胱氨酸。预期始于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的N端的氨基酸29或在这些氨基酸位置之前的ActRIIB多肽,可保持配体结合活性。SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的24位丙氨酸至天冬酰胺突变引入N-联糖基化序列而不明显影响配体结合。这证实了信号切割肽和半胱氨酸交联区之间的区域(对应于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸20-29)的突变是完全容许的。具体地说,始于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸位置20、21、22、23和24的ActRIIB多肽可保持活性,还预期始于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸位置25、26、27、28和29的ActRIIB多肽保持活性。始于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸位置22、23、24或25的ActRIIB多肽可具有最大活性。

[0104] 在某些实施方案中,待用于本文所述方法和组合物的ActRIIB前体蛋白(即SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28)的活性部分(即ActRIIB多肽)一般可包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸29-109,这类ActRIIB多肽可始于例如对应于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸19-29的任一个的残基和终于对应于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸109-134的任一个的位置。本文所包括的ActRIIB多肽的具体实例包括始于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的19-29、20-29或21-29的氨基酸位置和终于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的119-134、119-133或129-134、129-133的氨基酸位置的多肽。本文所包括的ActRIIB多肽的其它具体实例包括始于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的20-24(或21-24或22-25)的氨基酸位置和终于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的109-134(或109-133)、119-134(或119-133)或129-134(或129-133)的氨基酸位置的多肽。还考虑了落入这些范围的变异ActRIIB多肽,特别是与SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的相应部分有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性或序列同源性的多肽。

[0105] 例如,截短形式的ActRIIB包括具有氨基酸20-119、20-128、20-129、20-130、20-131、20-132、20-133、20-134、20-131、21-131、22-131、23-131、24-131和25-131的多肽,其中氨基酸位置是指SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28中的氨基酸位置。

[0106] 其它示例性的截短形式的ActRIIB包括(i)始于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的

氨基酸21-29的任一个(任选始于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的22-25)的氨基酸和终于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸109-134的任一个的多肽;(ii)始于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸20-29的任一个(任选始于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的22-25)和终于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸109-133的任一个的多肽;(iii)始于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸20-24的任一个(任选始于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的22-25)和终于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸109-133的任一个的多肽;(iv)始于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸21-24的任一个和终于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸109-134的任一个的多肽;(v)始于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸20-24的任一个和终于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸118-133的任一个的多肽;(vi)始于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸21-24的任一个和终于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸118-134的任一个的多肽;(vii)始于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸20-24的任一个和终于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸128-133的任一个的多肽;(viii)始于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸20-24的任一个和终于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸128-133的任一个的多肽;(ix)始于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸21-29的任一个和终于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸118-134的任一个的多肽;(x)始于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸20-29的任一个和终于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸118-133的任一个的多肽;(xi)始于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸21-29的任一个和终于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸128-134的任一个的多肽;和(xii)始于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸20-29的任一个和终于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸128-133的任一个的多肽。在一个具体实施方案中,ActRIIB多肽包含、基本上包括或包括始于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸位置25和终于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸位置131的氨基酸序列。在另一个具体实施方案中,ActRIIB多肽包括或基本上包括SEQ ID NO:17、18、23、26、27、29、30、31、32、33、36、37、42或43的氨基酸序列。

[0107] 对于ActRIIB多肽的合成,可使用下列前导序列:蜜蜂蜂毒肽前导序列(SEQ ID NO:8)、组织纤溶酶原激活物(TPA)前导序列(SEQ ID NO:9)或天然ActRIIB前导序列(SEQ ID NO:10)。

[0108] 在某些实施方案中,用于本文所述组合物和方法的GDF11拮抗剂包含含与抗体的Fc部分连接的ActRIIB的GDF11结合结构域的缀合物/融合蛋白。在某些实施方案中,激活素结合结构域通过接头(例如肽接头)与抗体的Fc部分连接。任选Fc结构域在残基例如Asp-265、赖氨酸322和Asn-434处具有一个或多个突变。在某些情况下,相对于野生型Fc结构域,具有这些突变的一个或多个(例如Asp-265突变)的突变型Fc结构域与Fc $\gamma$ 受体结合的能力降低。在其它情况下,相对于野生型Fc结构域,具有这些突变的一个或多个(例如Asn-434突变)的突变型Fc结构域与MHC I类相关Fc-受体(FcRN)结合的能力提高。

[0109] 在某些实施方案中,用于本文所述组合物和方法的ActRIIB的GDF11结合结构域包含截短形式的ActRIIB胞外域。截短可位于ActRIIB多肽的羧基端和/或氨基端。在某些实施方案中,相对于成熟ActRIIB多肽胞外域,截短长度可为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个氨基酸。在某些实施方案中,截短可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个成熟ActRIIB多

肽胞外域的N端氨基酸。在某些实施方案中,截短可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个成熟ActRIIB多肽胞外域的C端氨基酸。

[0110] 在某些实施方案中,用于本文所述组合物和方法的ActRIIB的GDF11结合结构域包含具有一个或多个氨基酸取代、添加和/或缺失的ActRIIB的胞外域。在某些实施方案中,用于本文所述组合物和方法的ActRIIB的抑制剂包含还携带氨基酸取代的截短形式的ActRIIB胞外域。

[0111] 在一个具体实施方案中,用于本文所述组合物和方法的GDF11抑制剂是人ActRIIB受体的胞外域和IgG1的Fc部分之间的融合蛋白。在另一个具体实施方案中,待用于本文所述组合物和方法的GDF11抑制剂是截短的人ActRIIB受体胞外域和IgG1的Fc部分之间的融合蛋白。在另一个具体实施方案中,待用于本文所述组合物和方法的GDF11抑制剂是截短的人ActRIIB受体胞外域和IgG1的Fc部分之间的融合蛋白,其中截短的人ActRIIB受体胞外域具有一个或多个氨基酸取代。

[0112] 可通过例如筛选由编码ActRIIB多肽的核酸的相应片段重组产生的多肽,来获得ActRIIB多肽的功能活性片段。另外,可采用本领域已知的技术,例如常规Merrifield固相f-Moc或t-Boc化学,化学合成该片段。可(重组或通过化学合成)产生片段,并进行测试以鉴定可起ActRIIB蛋白或由激活素介导的信号转导的拮抗剂(抑制剂)的作用的肽基片段。

[0113] 另外,可通过例如筛选由编码ActRIIB多肽的相应的诱变核酸重组产生的修饰多肽的文库,来获得ActRIIB多肽的功能活性变体。可产生所述变体,并测试以鉴定可起GDF11信号转导或与ActRIIB结合的拮抗剂(抑制剂)的作用的变体。在某些实施方案中,ActRIIB多肽的功能变体(即具有GDF11结合活性)包含与ActRIIB的胞外域有至少75%同一性的氨基酸序列。在某些情况下,功能变体具有与选自ActRIIB的胞外域的SEQ ID NO:的氨基酸序列有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0114] 存在许多方法,籍此可从简并寡核苷酸序列产生潜在同源物的文库。简并基因序列的化学合成可在自动DNA合成仪中进行,然后将合成基因连接至用于表达的合适载体中。简并寡核苷酸的合成是本领域众所周知的(参见例如Narang, S A (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura等(1981) *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, 编辑AG Walton, Amsterdam: Elsevier第273-289页; Itakura等(1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura等(1984) *Science* 198:1056; Ike等(1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477)。该技术已用于其它蛋白质的定向进化(参见例如Scott等(1990) *Science* 249:386-390; Roberts等(1992) *PNAS USA* 89:2429-2433; Devlin等(1990) *Science* 249:404-406; Cwirla等(1990) *PNAS USA* 87:6378-6382; 以及美国专利号5,223,409、5,198,346和5,096,815)。

[0115] 或者,可利用其它诱变形式产生组合文库。例如,可有用以下诱变产生ActRIIB多肽变体,并且通过筛选从文库分离出ActRIIB多肽变体:例如丙氨酸扫描诱变等(Ruf等(1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang等(1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balint等(1993) *Gene* 137:109-118; Grodberg等(1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashima等(1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892; Lowman等(1991) *Biochemistry* 30:10832-10838; 以及Cunningham等(1989) *Science* 244:1081-1085); 通过接头扫描诱变(Gustin等(1993) *Virology* 193:653-660; Brown等(1992) *Mol. Cell Biol.* 12:2644-2652; McKnight等(1982) *Science* 232:316); 通过饱和诱变(Meyers等(1986) *Science* 232:613); 通过PCR诱变

(Leung等(1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19); 或通过随机诱变, 包括化学诱变等 (Miller等(1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; 以及Greener等(1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34)。接头扫描诱变, 特别是在组合情况下, 是用于鉴定截短(生物活性)形式的ActRIIB多肽的有吸引力的方法。

[0116] 对于筛选通过点突变和截短制备的组合文库的基因产物, 以及在这方面, 对于筛选具有某种性质的基因产物的cDNA文库, 各种技术是本领域已知的。所述技术一般可适于通过ActRIIB多肽的组合诱变而产生的基因文库的快速筛选。用于筛选大基因文库的最广泛使用的技术通常包括将基因文库克隆至可复制的表达载体中, 将合适的细胞用所得载体文库转化, 并在所需活性的检测有利于相对容易地分离载体的条件下表达所述组合基因(其编码所检测产物的基因)。优选的测定法包括GDF11结合测定法和激活素介导的细胞信号转导测定法。

[0117] 在某些方面, ActRIIB多肽的功能变体或修饰形式包括具有ActRIIB多肽的至少一部分和一个或多个融合结构域的融合蛋白。这类融合结构域的众所周知的实例包括但不限于多聚组氨酸、Glu-Glu、谷胱甘肽S转移酶(GST)、硫氧还蛋白、蛋白质A、蛋白质G、免疫球蛋白重链恒定区(Fc)、麦芽糖结合蛋白(MBP)或人血清白蛋白。可以选择融合结构域以提供所需性质。例如, 一些融合结构域特别可用于通过亲和色谱法分离融合蛋白。为了亲和纯化的目的, 使用用于亲和色谱法的相关基质, 例如谷胱甘肽-、淀粉酶-和镍-或钴-缀合的树脂。许多的这类基质可以“试剂盒”形式获得, 例如可与(HIS<sub>6</sub>)融合配偶体一起使用的Pharmacia GST纯化系统和QIAexpress.TM.系统(Qiagen)。作为另一个实例, 还可选择融合结构域以促进ActRIIB多肽的检测。这类检测结构域的实例包括各种荧光蛋白(例如GFP)以及“表位标签”, 所述表位标签通常是短肽序列, 可获得针对该短肽序列的特异性抗体。可获得单克隆抗体所针对的众所周知的表位标签包括FLAG、流感病毒血凝素(HA)和c-myc标签。在一些情况下, 融合结构域具有例如用于因子Xa或凝血酶的蛋白酶切割位点, 其允许相关蛋白酶部分消化融合蛋白, 从而由其释放重组蛋白。可通过后续色谱分离, 从融合结构域分离释放的蛋白质。在某些实施方案中, ActRIIB多肽与体内稳定ActRIIB多肽的结构域(“稳定剂”结构域)融合。所谓“稳定”意指延长血清半寿期的任何情况, 不论是因为破坏减少、肾清除降低还是其它药代动力学作用。已知与免疫球蛋白的Fc部分融合赋予各种蛋白质所需要的药代动力学性质。同样, 与人血清白蛋白融合可提供所需性质。可以选择的其它类型的融合结构域包括多聚化(例如二聚化、四聚化)结构域和(按照赋予其它生物功能, 例如进一步刺激骨生长或肌肉生长)的功能结构域。

[0118] 要了解, 融合蛋白的不同元件可按与所需功能性一致的任何方式排列。例如, ActRIIB多肽可置于异源结构域的C端, 或者, 异源结构域可置于ActRIIB多肽的C端。ActRIIB多肽结构域和异源结构域在融合蛋白中不一定相邻, 结构域的C端或N端或结构域之间可包括其它结构域或氨基酸序列。

[0119] 在某些实施方案中, 用于本文所述方法和组合物的ActRIIB多肽含有能够稳定ActRIIB多肽的一个或多个修饰。例如, 这类修饰延长ActRIIB多肽的体外半寿期、延长ActRIIB多肽的循环半寿期或降低ActRIIB多肽的蛋白水解性降解。这类稳定化修饰包括但不限于融合蛋白(包括例如包含ActRIIB多肽和稳定剂结构域的融合蛋白)、糖基化位点的修饰(包括例如糖基化位点加至ActRIIB多肽中)和糖部分的修饰(包括例如从ActRIIB多肽

脱去糖部分)。在融合蛋白的情况下,ActRIIB多肽与稳定剂结构域例如IgG分子(例如Fc结构域)融合。在融合蛋白的情况下,本文所用术语“稳定剂结构域”不仅仅是指融合结构域(例如Fc),而且还包括非蛋白质性修饰(例如糖部分)或非蛋白质性聚合物(例如聚乙二醇)。

[0120] 在某些实施方案中,分离自或以别的方式基本不含其它蛋白质的分离和/或纯化形式的ActRIIB多肽,可用于本文所述方法和组合物。ActRIIB多肽一般可通过自重组核酸表达来产生。

[0121] 在某些方面,分离核酸和/或重组核酸可用来产生任何ActRIIB多肽(例如可溶性ActRIIB多肽),包括用于本文所述方法和组合物的片段、功能变体和融合蛋白。可如上文针对ActRIIA多肽中所述,表达ActRII多肽。

[0122] 在某些实施方案中,长的ActRIIB-Fc融合物的血清半寿期在人类患者中可为25-32天。此外,与对于在人293细胞中表达的ActRIIB-hFc融合蛋白所报告的相比,CHO细胞表达的产物可具有针对激活素B配体的较高亲和力。此外,虽不受理论的束缚,但是与用天然前导序列表达的ActRIIB-Fc不一样,使用提供比其它前导序列更大的产量的TPA前导序列,可提供高纯的N端序列。使用天然前导序列可导致ActRIIB-Fc的两个主要类别,各具有不同的N端序列。

[0123] 本文公开的任何ActRIIB多肽可作为同二聚体产生。本文公开的任何ActRIIB多肽可配制为具有包含来自IgG重链的恒定区的异源部分(例如Fc结构域)的融合蛋白。相对于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28,本文公开的任何ActRIIB多肽在对应于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的79位的位置上可包含酸性氨基酸,任选与一个或多个另外的氨基酸取代、缺失或插入组合。

[0124] 在具体的实施方案中,用于本文提供的方法的ActRIIB抑制剂包含具有一个或多个氨基酸取代/突变的ActRIIB的胞外域。这类氨基酸取代/突变可以是例如由SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸位置79的亮氨酸氢交换成为酸性氨基酸,例如天冬氨酸或谷氨酸。例如,可改变胞外域多肽中SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的L79位以提供变化的激活素-肌肉生长抑制素(GDF-11)结合性质。与激活素结合相比,L79A和L79P突变降低GDF-11结合至更大程度。L79E和L79D突变保持GDF-11结合,同时表明大大降低激活素结合。在某些实施方案中,待用于本文提供的方法的ActRIIB多肽具有L79E或L79D突变和其它突变,使得所得分子保持与GDF11的结合亲和力或与GDF11的结合亲和力提高。在某些实施方案中,待用于本文提供的方法的ActRIIB多肽没有L79E或L79D突变,但以其它方式修饰,同时保持与GDF11的结合亲和力或与GDF11的结合亲和力提高。

[0125] 已表明,ActRIIB的配体结合袋由SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的残基Y31、N33、N35、L38-T41、E47、E50、Q53-K55、L57、H58、Y60、S62、K74、W78-N83、Y85、R87、A92和E94-F101限定。在这些位置上,预期可容许保守突变,但是K74A突变是完全容许的,R40A、K55A、F82A和L79位的突变也如此。在爪蟾(Xenopus)中,R40为K,表明该位置上的碱性氨基酸将是容许的。Q53在牛ActRIIB中为R,在爪蟾ActRIIB中为K,因此该位置包括R、K、Q、N和H在内的氨基酸将是容许的。因此,用于本文所述方法和组合物的ActRIIB多肽的通式是这样的通式,其包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸29-109,但任选始于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的20-24或22-25的范围的氨基酸位置和终于SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的129-

134的范围的氨基酸位置,且在配体结合袋中包含小于1、2、5或15个保守氨基酸变化,以及在配体结合袋中在SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸位置40、53、55、74、79和/或82处包含零、一个或多个非保守变化。这类ActRIIB多肽可与SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的氨基酸29-109序列保持大于80%、90%、95%或99%序列同一性或序列同源性。结合袋以外的位点(其可变性尤其可以是完全容许的),包括ActRIIB胞外域的氨基端和羧基端及42-46和65-73位。SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:28的65位天冬酰胺至丙氨酸的变化(N65A)实际上在A64背景下改进配体结合,因此预期在R64背景下对配体结合没有有害作用。这种变化在A64背景下可能消除N65处的糖基化,因此表明在该区域的重大变化可能是容许的。虽然难以容许R64A变化,但R64K是完全容许的,因此在64位可容许另一个碱性残基,例如H。

[0126] 因此,在某些实施方案中,为了产生用于本文提供的方法的ActRIIB多肽,在ActRIIB的配体结合袋中的一个或多个氨基酸处引入氨基酸取代、缺失或添加,针对其与GDF11的结合亲和力对所得分子进行测试。在某些更具体的实施方案中,针对其与GDF11相对于与TGFβ超家族的其它成员的结合亲和力对所得分子进行测试。在某些更具体的实施方案中,针对其与GDF11相对于与激活素A的结合亲和力对所得分子进行测试。

[0127] 在具体的实施方案中,用于本文提供的方法的ActRIIB多肽在配体结合结构域中在带正电荷的氨基酸残基Asp (D80) 处具有突变。在一个具体实施方案中,将D80残基变成选自以下的氨基酸残基:不带电荷氨基酸残基、负性氨基酸残基和疏水氨基酸残基。

### [0128] 5.3.3 GDF11前肽

[0129] 在某些实施方案中,GDF11前肽是用于本文所述方法的GDF11拮抗剂。结合并抑制GDF活性、信号转导、受体结合、表达、加工或分泌的任何GDF11前肽、其片段或类似物可用于本文所述方法。例如,GDF11前肽拮抗剂可通过防止GDF11切割为其成熟形式、通过与成熟GDF11形成复合物或通过其它相关机制,来抑制GDF11活性。在一个实施方案中,GDF11前肽拮抗剂是SEQ ID NO.50的天然存在的GDF11前肽。GDF11前肽拮抗剂还可以是其仍保持或提高GDF11结合能力和GDF11抑制活性的天然存在的GDF11前肽(SEQ ID NO.50)的任何片段、变体、类似物、同源物、突变蛋白或模拟物。因此,在另一个实施方案中,GDF11前肽拮抗剂是药代动力学性质改进(例如循环半寿期延长或免于蛋白水解性降解的保护提高)的修饰的GDF11多肽。这类稳定化修饰可包括与其它多肽序列(例如IgG的Fc区或白蛋白)融合、与非蛋白质性聚合物连接、糖基化位点的修饰(例如添加)、糖部分的修饰(例如脱去)等。这类修饰的GDF11前肽的实例是本领域已知的,公开于例如美国专利号7,737,116和美国专利号8,236,751。在一个实施方案中,GDF11前肽拮抗剂结合成熟的人形式的GDF11,其可作为单体、二聚体或潜伏复合体平衡地存在于例如人血清中。在另一个实施方案中,GDF11拮抗剂结合同二聚体的活性形式的GDF11。

[0130] 在一个实施方案中,GDF11前肽拮抗剂产生并分离自生物来源。在另一个实施方案中,GDF11前肽拮抗剂通过本领域众所周知的方法重组产生或合成制备。在再一个实施方案中,以多核苷酸序列引入和/或给予GDF11前肽拮抗剂,所述多核苷酸序列体内可翻译为GDF11前肽。

### [0131] 5.3.4 GDF11结合蛋白

[0132] 在一些实施方案中,其它GDF11结合蛋白是用于本文所述方法的GDF11拮抗剂。例如,滤泡素抑制素以高亲和力结合GDF11,并在体内拮抗GDF11活性。因此,在一个实施方案

中,用于所述方法的滤泡素抑制素GDF11拮抗剂是产生于并分离自生物来源的天然蛋白质、重组产生的多肽或合成制备的滤泡素抑制素多肽。抑制性滤泡素抑制素多肽可以是体外、优选体内与GDF11结合并抑制GDF11活性的任何片段、其变体或突变体。在某些实施方案中,滤泡素抑制素多肽不显示GDF11结合以外的滤泡素抑制素生物活性。具体地说,在某些实施方案中,滤泡素抑制素多肽不显示与激活素结合。

[0133] 基因还显示与滤泡素抑制素共有相当的结构和功能同源性,因此,还与一些TGF- $\beta$ 家族成员(例如GDF8、骨形态发生蛋白)结合并抑制其活性。因此,在其它实施方案中,GDF11拮抗剂是滤泡素抑制素相关基因(FLRG),亦称为滤泡素抑制素样3(FSTL3)和滤泡素抑制素相关蛋白(FSRP)。FLRG多肽拮抗剂的实例公开于例如美国专利号8,236,751。

[0134] 在又一个实施方案中,GDF11拮抗剂是具有一个或多个滤泡素抑制素结构域的多肽,因此,与GDF11结合并抑制GDF11的活性。包含滤泡素抑制素结构域的蛋白质具有特征在于富含半胱氨酸的重复序列的氨基酸结构域,所述重复序列通常跨越65-90个氨基酸并含有10个保守半胱氨酸残基。在一个实施方案中,GDF11拮抗剂是GDF11结合蛋白GDF相关血清蛋白-1(GASP-1)或-2(GASP-2)。GASP-1或GASP-2多肽拮抗剂公开于例如美国专利号7,572,763。

[0135] 任何GDF11结合蛋白、其变体或片段的实例可用于本文所述方法,只要所述多肽与GDF11结合并抑制GDF11生物活性。可在生物表达系统中、通过化学方法、重组DNA方法或通过本领域已知的任何其它方法产生GDF11结合蛋白拮抗剂。在另一个实施方案中,可以多核苷酸序列引入和/或给予GDF11结合蛋白拮抗剂。

[0136] 5.3.5 GDF11类似物

[0137] GDF11拮抗剂还包括与GDF11结合并抑制其活性的GDF11类似物。在一个实施方案中,拮抗性GDF11类似物是显性负性GDF11多肽,其包括与GDF11结合(二聚化)并抑制其切割、加工和/或修饰,从而抑制其活性的GDF11的变体。在另一个实施方案中,GDF11拮抗剂类似物是非肽类。例如,非肽GDF11类似物可以是模拟GDF11前肽的结合和功能(GDF11前肽肽模拟物)或模拟GDF11结合蛋白的结合和功能(GDF11结合蛋白肽模拟物)的化合物。虽不受理论的束缚,但是肽模拟物分子模拟肽的二级结构的元素。因此在一个实施方案中,GDF11类似物结合并抑制SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:50的GDF11。

[0138] 5.3.6 GDF11多核苷酸拮抗剂

[0139] 抑制GDF11表达(例如转录或翻译)的多核苷酸也可用于本文所述方法。在一些实施方案中,GDF11拮抗剂是编码GDF11反义分子的多核苷酸分子、干扰RNA(RNAi)、核糖核酸编码酶(ribonucleic encoding enzyme)(核酶)或三联分子。GDF11多核苷酸拮抗剂与GDF11靶核苷酸序列(例如DNA、RNA、mRNA)互补(例如以特异性结合),并且可以是DNA或RNA,且可为编码序列或抑制序列(例如反义物、RNAi)。在一个实施方案中,GDF11拮抗剂多核苷酸是反义GDF11分子。反义分子的长度通常为至少约1-25个核苷酸,并被设计成与GDF11靶序列特异性杂交。可通过本领域众所周知的方法鉴定可用于反义分子的特异性GDF11反义核苷酸序列。

[0140] 在某些实施方案中,使用可获自Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA的使用下列基因沉默子序列的siRNA基因沉默子:目录号:sc-44724、sc-44725、sc-44724-PR、sc-44725-PR;shRNA:sc-44724-SH、sc-44725-SH、sc-44724-V和sc-44725-V。

[0141] 5.4测定法

[0142] 可用如下所示的各种测试法对GDF-11的拮抗剂进行测试。这些测定法可用来测试和鉴定GDF11拮抗剂。另外,这些测定法可用来跟踪贫血患者的治疗或对用GDF11拮抗剂治疗的患者的反应性。例如,可从患者的细胞中产生体外细胞培养系统以确定具体患者对用GDF11拮抗剂治疗的反应性。

[0143] 5.4.1红细胞水平

[0144] RBC计数是每体积血液红细胞的实际数的计数,并可纳入作为标准全部血球数的一部分。通常,男性的RBC计数介于4.7-6.1百万个细胞/毫升之间,女性的RBC计数介于4.2-5.4百万个细胞/毫升之间。然而,地中海贫血患者的RBC计数可低于正常实测值。因此,待用本文提供的方法治疗的贫血患者(例如地中海贫血患者)中的RBC计数的测定,允许测定所述治疗的功效。

[0145] 5.4.2红细胞集落形成单位(CFU-E)

[0146] 可在例如集落形成测定法中,通过细胞的数目和形态并且通过某些细胞表面标志物的存在与否,来分析并鉴定CFU-E。可使用例如抗体染色接着流式细胞术分析(FAC)以评价标志物的表达,来测量红细胞集落形成单位的水平,所述标志物例如分化状态标志物,例如Epo受体、c-Kit(干细胞因子受体)、运铁蛋白受体(CD71+)、CD36和Ter119(血型糖蛋白-A相关抗原)(CFU-E细胞是Ter119(血型糖蛋白-A相关抗原)阴性(参见例如Terszowsky等,2005)。在CFU-E阶段的细胞表达红细胞生成素受体(EpoR),并可在培养基中在仅红细胞生成素存在下在2-3天内被体外诱导以进行终末分化。可将CFU-E细胞铺板于甲基纤维素上,用二氨基联苯胺试剂针对血红蛋白染色,然后可对CFU-E集落计数。自铺板时间起第二天,各CFU-E集落可产生8和64个血红蛋白化细胞,其大多数处于其红细胞分化的终末期。

[0147] 集落形成单位测定法是本领域已知的(例如MesenCult™培养基,Stem Cell Technologies Inc.,Vancouver British Columbia;另参见Wu等(Wu H,Liu X,Jaenisch R,Lodish HF(1995).“Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor(定型红细胞BFU-E和CFU-E祖细胞的产生不需要红细胞生成素或红细胞生成素受体)”。Cell 83(1):59-67;Marley SB,Lewis JL,Goldman JM,Gordon MY(1996))。

[0148] 5.4.3红细胞爆发集落形成单位(BFU-E)

[0149] 与CFU-e类似,可在例如集落形成测定法中,通过细胞的数目和形态并通过某些细胞表面标志物的存在与否,分析并鉴定BFU-e。具体地说,可通过若干细胞表面标志物(例如CD33、CD34和HLA-DR)的表达和缺乏血型糖蛋白-A的表达,来鉴定BFU-e。例如,可采用描述于Wu等人的BFU-e测定法(Wu H,Liu X,Jaenisch R,Lodish HF(1995),“Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor(定型红细胞BFU-E和CFU-E祖细胞的产生不需要红细胞生成素或红细胞生成素受体)”。Cell 83(1):59-67。

[0150] 5.4.4血细胞比容

[0151] 血细胞比容测量给定体积的全血中红细胞的百分比,并可纳入作为标准全部血球数的一部分。血细胞比容对于男性通常为约45%,对女性为约40%。然而,地中海贫血患者通常具有低于正常实测值的血细胞比容。因此,测定待根据本文提供的方法治疗的地中海

贫血患者的血细胞比容,允许测定所述治疗的功效。

#### [0152] 5.4.5祖红细胞的细胞凋亡

[0153] 例如,可通过采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记(TUNEL)染色,来测定祖红细胞的细胞凋亡。TUNEL染色可使用原位细胞凋亡检测试剂盒(Takara Bio, Otsu, Japan)进行。

#### [0154] 5.4.6红细胞共培养系统

[0155] 为了测试在更类似于体内环境的体外环境中作用剂对红细胞分化的作用,可使用骨髓细胞和人CD36+细胞的共培养系统。使极富含祖红细胞的人CD36+细胞在补充红细胞生成素(EPO)的培养基(2U/mL)中与长期骨髓培养物共培养。6天后,可通过例如流式细胞术(例如FACS)分析,评价培养物的细胞输出(例如细胞类型)。在不同水平的红细胞分化(例如原成红细胞、嗜碱性粒细胞、晚嗜碱性/多染性、正染性/网织红细胞、糖蛋白A+细胞)下的类红细胞的数目表明待测试的作用剂调节红细胞分化的能力。在GDF11存在或不存在时进行测定。然后可针对其逆转GDF11的作用的能力,来测试GDF11的拮抗剂。

#### [0156] 5.4.7转录反应测定法

[0157] 在某些实施方案中,转录反应测定法可用来测试GDF11拮抗剂。在GDF11信号转导时,某些基因的转录被增量调节或减量调节。可以测量所用的细胞培养系统和对GDF11转录反应(例如通过RT-PCT)。GDF11拮抗剂对转录反应的作用是其作为拮抗剂的有效性的度量。例如,在C2C12细胞中,runx2/cbfa1因响应GDF11时增量调节(参见例如Bessa等,2009 Protein Expression and Purification 63:89-94)。在某些实施方案中,将已知对GDF11信号转导起反应的启动子区克隆在报道基因上游。这样,该测定法可被简化,使得只需要测定报道基因的活性。

#### [0158] 5.5药物组合物

[0159] 在某些实施方案中,可将GDF11的拮抗剂与用于本文提供的方法的药学上可接受的载体一起配制。例如,可以单独或作为药物制剂(治疗组合物)的组分给予GDF11拮抗剂。可以用于人或兽用药物的任何合适的方式配制用于给药的主题化合物。

[0160] 在某些实施方案中,本文所述治疗方法包括全身或作为植入剂或装置局部给予组合物。当给药时,治疗组合物可以是无热原的生理学上可接受的形式。可与GDF11拮抗剂一起同时或序贯给予也可任选包括上述组合物中的GDF11拮抗剂以外的治疗上有用的药剂。

[0161] 可以胃肠外给予GDF11拮抗剂。适于胃肠外给药的药物组合物可包含一种或多种GDF11拮抗剂以及一种或多种药学上可接受的无菌等渗的水性或非水溶液剂、分散剂、混悬剂或乳剂或临用前可复溶成无菌注射用溶液剂或分散剂的无菌粉剂,其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、赋予制剂与既定接受者的血液等渗的溶剂或助悬剂或增稠剂。可用于本文所述药物组合物的合适的水性和非水载体的实例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油(例如橄榄油)和注射用有机酯,例如油酸乙酯。可通过例如使用包衣材料(例如卵磷脂)、在分散剂的情况下通过保持所需粒度和通过使用表面活性剂,来保持适当的流动性。

[0162] 此外,组合物可以用于递送至靶组织部位(例如骨)的形式包封或注射。在某些实施方案中,本文提供的组合物可包括能够将一种或多种GDF11拮抗剂递送至靶组织部位(例如骨)、提供用于发育组织的结构和最好能够在体内再吸收的基质。例如,基质可提供缓慢

释放的GDF11拮抗剂。这类基质可用目前用于其它植入的医疗应用的材料形成。

[0163] 基质材料的选择基于生物相容性、生物降解性、机械性质、外观外表和界面性质。主题组合物的具体应用可限定合适的制剂。组合物的可能的基质可以是生物可降解的和化学成分确定的硫酸钙、磷酸三钙、羟磷灰石、聚乳酸和聚酞。其它可能的材料是生物可降解的和生物学成分十分确定的,例如骨或真皮胶原。其它基质由蛋白质或胞外基质组分组成。其它可能的基质是非生物可降解的和化学成分确定的,例如烧结羟磷灰石、生物玻璃、铝酸盐或其它陶瓷。基质可由任何上述类型的材料(例如聚乳酸和羟磷灰石或胶原和磷酸三钙)的组合组成。可在组成(例如磷酸钙铝酸钙(calcium-aluminate-phosphate))中改变生物陶瓷,并加工以改变孔径、粒度、颗粒形状和生物降解性。

[0164] 在某些实施方案中,用于本文所述方法的组合物可口服给予,例如呈胶囊剂、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂(使用调味基料,通常为蔗糖和阿拉伯树胶或西黄蓍胶)、散剂、颗粒剂的形式,或作为水性液体或非水液体中的溶液剂或混悬剂,或作为水包油或油包水液体乳剂,或作为酞剂或糖浆剂,或作为糖锭剂(使用惰性基料,例如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯树胶)和/或作为漱口剂等,其各含有预定量的药剂作为活性成分。所述药剂也可作为大丸剂、药糖剂或糊剂给予。

[0165] 在用于口服给药的固体剂型(胶囊剂、片剂、丸剂、糖衣丸、散剂、颗粒剂等)中,可将用于本文提供的方法的一种或多种治疗化合物与一种或多种药学上可接受的载体(例如柠檬酸钠或磷酸二钙)和/或下列的任一种混合:(1)填充剂或增量剂,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇和/或硅酸;(2)粘合剂,例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯树胶;(3)湿润剂,例如甘油;(4)崩解剂,例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠;(5)溶液阻滞剂,例如石蜡;(6)吸收促进剂,例如季铵化合物;(7)润湿剂,例如鲸蜡醇和甘油单硬脂酸酯;(8)吸收剂,例如高岭土和膨润土;(9)润滑剂,例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠及其混合物;和(10)着色剂。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下,药物组合物还可包含缓冲剂。在使用诸如乳糖或乳糖以及高分子量聚乙二醇等这类赋形剂的软充填和硬充填的明胶胶囊剂中,相似类型的固体组合物也可用作填充剂。

[0166] 用于口服给药的液体剂型包括药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂和酞剂。除活性成分以外,液体剂型可含有常用于本领域的惰性稀释剂,例如水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸乙酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(具体为棉籽油、落花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和山梨醇酞的脂肪酸酯及其混合物。除惰性稀释剂以外,口服组合物还可包括辅助剂,例如润湿剂、乳化剂和助悬剂、乳化剂和助悬剂、芳香剂和防腐剂。

[0167] 除活性化合物以外,混悬剂可含有助悬剂,例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇和山梨醇酞酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝(aluminum metahydroxide)、膨润土、琼脂和西黄蓍胶及其混合物。

[0168] 本文所述组合物还可含有辅助剂,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。通过加入各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸等,可确保防止微生物的作用。组合物中还可能需要包括等渗剂,例如糖、氯化钠等。另外,可通过加入延长吸收的作用剂,例如单硬脂酸铝和明胶,引起注射用药物形式的吸收延长。

[0169] 要了解的是,可通过主治医师考虑改进GDF11拮抗剂的作用的各种因素,来确定剂量方案。各种因素包括但不限于血液的生理学参数(例如红细胞水平、血细胞比容、网织红细胞水平、血红蛋白水平等)和脾和/或骨髓中的GDF11水平。在某些实施方案中,待用本文提供的方法治疗的贫血患者被诊断为在脾、骨髓、肝、血清和/或血浆中的GDF11水平升高(参见第5.2节)。在某些实施方案中,监测脾、骨髓、肝、血清和/或血浆中的GDF11水平,以调节用GDF11拮抗剂治疗的剂量。例如,如果患者的GDF11水平最初升高,然后在开始用GDF11拮抗剂治疗后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10天;1、2、3、4、5、6、7、8、9、10周;1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个月;再次测量脾、骨髓、肝、血清和/或血浆中的GDF11水平,并且与初始水平进行比较。如果GDF11水平降低,且接近或低于正常GDF11水平,用GDF11拮抗剂的剂量可降低。

[0170] 在某些实施方案中,GDF11拮抗剂特异性靶向患者的脾和/或骨髓和/或肝,和/或将GDF11拮抗剂给予患者的脾和/或骨髓和/或肝。

[0171] 在某些实施方案中,本文提供用于体内产生GDF11拮抗剂的基因疗法。这类疗法可通过将GDF11的拮抗剂多核苷酸序列导入患有上述病症的细胞或组织中,来实现其治疗作用。可使用重组表达载体(例如嵌合病毒或胶体分散系统),来实现多核苷酸序列的递送。具体的说明性治疗递送系统包括靶向脂质体、病毒载体包括腺病毒、疱疹病毒、牛痘,或优选RNA病毒例如反转录病毒。优选反转录病毒载体是鼠或鸟反转录病毒的衍生物。其中可插入单个外源基因的反转录病毒载体的实例包括但不限于:莫洛尼鼠白血病毒(MoMuLV)、Harvey鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV)和劳斯肉瘤病毒(RSV)。多种其它的反转录病毒载体可掺入多个基因。所有的这些载体可转移或掺入选择标记的基因,使得可鉴定并产生转导细胞。可通过连接例如糖、糖脂或蛋白质,制备靶特异性的反转录病毒载体。优选的靶向通过抗体来实现。本领域技术人员应认识到,特定的多核苷酸序列可插入反转录病毒基因组中或与病毒包膜连接以供含有编码GDF11拮抗剂的多核苷酸的反转录病毒载体的靶特异性递送。在一个实施方案中,载体靶向骨髓和/或脾。

[0172] 用于多核苷酸另一个靶向递送系统是胶体分散系统。胶体分散系统包括大分子复合物、纳米囊、微球、珠粒和基于脂质的系统,包括水包油乳剂、微团、混合微团和脂质体。在一个具体实施方案中,胶体系统是脂质体。脂质体是人工膜囊泡,在体外和体内可用作递送载体。RNA、DNA和完整病毒粒可包封在水性内腔中,并可以生物活性形式递送到细胞中(参见例如Fraleay等,Trends Biochem.Sci.,6:77,1981)。使用脂质体载体用于高效基因转移的方法是本领域已知的,参见例如Mannino等,Biotechniques,6:682,1988。脂质体的组成通常是磷脂的组合,通常与类固醇类(尤其胆固醇)组合。还可使用其它磷脂或其它脂质。脂质体的物理性质取决于pH、离子强度和二价阳离子的存在。

[0173] 可用于脂质体产生的脂质的实例包括磷脂酰化合物,例如磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、鞘脂、脑苷脂和神经节苷脂。说明性磷脂包括卵磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱和二硬脂酰磷脂酰胆碱。脂质体的靶向还可能基于例如器官特异性、细胞特异性和细胞器特异性,并且是本领域已知的。

[0174] 在某些实施方案中,GDF11拮抗剂在药物组合物中是基本纯的。具体地说,药物组合物中至多20%、10%、5%、2.5%、1%、0.1%或至多0.05%的化合物是GDF11拮抗剂和药学上可接受的载体以外的化合物。

## 6. 实施例

[0175] 本文提供的实施例表明,GDF11蛋白水平在地中海贫血中升高,且抑制GDF11可治疗 $\beta$ 地中海贫血小鼠模型的贫血。

### [0176] 6.1 ACTRIIA诱杀剂治疗 $\beta$ 地中海贫血

[0177]  $\beta$ 地中海贫血与无效红细胞发生、红细胞分化和凋亡加快有关,导致贫血和铁超负荷。完全不了解在无效红细胞发生的作用的基础上的分子机制。虽然TGF- $\beta$ 超家族的成员涉及祖红细胞的增殖和分化两者,但是多个TGF- $\beta$ 家族成员在 $\beta$ 地中海贫血中观察到的无效红细胞发生中的作用未知。

[0178] 为了评价TGF- $\beta$ 家族成员在 $\beta$ 地中海贫血的无效红细胞发生中的作用,在人 $\beta$ 地中海贫血小鼠模型中使用结合多种TGF- $\beta$ 超家族配体的重组融合蛋白。ActRIIA-Fc融合蛋白(即SEQ ID NO:7的鼠对应物)包括与人免疫球蛋白1(IgG1)Fc结构域连接的激活素受体IIA(ActRIIA)的胞外域,且该蛋白质起TGF- $\beta$ 家族成员(像激活素A、激活素B、生长分化因子-11(GDF11)和骨形态生成蛋白-10(BMP-10))的配体截留剂的作用。Hbbth1/th1是人 $\beta$ 地中海贫血小鼠模型,该小鼠具有天然存在的 $\beta$ -主基因的缺失(Skow等,1983)。Hbbth1/th1小鼠具有异常低的血红蛋白(Hgb)、血细胞比容(Hct)和平均细胞容积(MCV)以及骨髓(BM)细胞过多和异常高水平的胆红素(一种表示广泛红细胞破坏的血红蛋白分解的副产物)。

### [0179] 6.2材料与方法

#### [0180] 6.2.1小鼠

[0181] 饲养C57BL/6,并将其关养在INSERM U699的无病原体设施中。所有方案经INSERM动物管理委员会批准。Hbbth1/th1模型来源于天然存在的 $\beta$ -主基因缺失(Skow LC等;Cell 1983)。Hbbth1/th1小鼠构成 $\beta$ 地中海贫血媒介(intermedia)的模型。这些小鼠具有几个复现人 $\beta$ 地中海贫血的临床参数,例如失效骨髓红细胞发生、前体凋亡、实质铁分配、hepcidin表达降低和在肝和脾中铁水平升高时,骨髓铁水平降低。

#### [0182] 6.2.2全部血球数

[0183] 在EDTA包被管中收集血样,按照生产商说明书,在MS9-5血液分析仪(Melet Schloesing Laboratories)上测量全部血球数。所选参数为红细胞(RBC)、血细胞比容(Ht)、平均红细胞容积(MCV)、血红蛋白(Hb)。用retic-count试剂(BD Biosciences Retic-Count™ Kit),测定网织红细胞数。

#### [0184] 6.2.3定量实时RT-PCR

[0185] 使用RNeasy Plus Mini试剂盒(Qiagen),从祖红细胞中提取RNA。在42°C下在30分钟内使用iScript反转录Supermix(Bio-rad),将1微克的总RNA用于反转录。然后在85°C下使酶失活5分钟。对于qPCR,使cDNA样品在CFX96 PCR System(Bio-rad)中扩增。使用SsoFast EvaGreen Supermix(Bio-rad)定量测定PCR产物。

#### [0186] 6.2.4体外成红细胞培养

[0187] 将来自各组织的细胞重新悬浮于不含血清的“红细胞扩增培养基”中,该培养基是补充2U/mL人重组Epo(Roche)、100ng/mL SCF(PeproTech)、10<sup>-6</sup>M地塞米松(D2915;Sigma)、40和青霉素/链霉素(Pen/Strep;Invitrogen)的StemPro34+养分补充剂(Life Technologies Gibco-BRL)。在培养5天后,将未贴壁细胞转移到在2-3天内补充或未补充10  $\mu$ g/ml mActRIIA-Fc的分化培养基(补充1U/ml Epo和1mg/ml铁-运铁蛋白(Sigma)的

StemPro-34)中。通过锥虫蓝(Gibco/BRL)排斥,每天测定活细胞和死细胞数,并通过部分培养基更换,每天调节细胞浓度至 $2 \times 10^6$ 个总细胞/mL。

#### [0188] 6.2.5 甲基纤维素测定法

[0189] 将成年小鼠BM或脾的单细胞悬液与methocult M3434培养基(Stem Cell Technologies)混合,铺板于35mm培养皿中,并在37°C、5%CO<sub>2</sub>潮湿气氛下培养。在第10天对BFU-E集落评分(在一些实验中,从第7天起往前到第10天对小鼠BFU-E评分,在第7天和在第10天的集落数之间无差异)。

#### [0190] 6.2.6 统计分析

[0191] 用GraphPad Prism(5.0版;GraphPad Software)进行统计分析。数据表示为N次测定的均值±SEM,除非另有说明。应用斯氏t检验或Mann-Whitney检验以比较两组,而多组比较应用双因素ANOVA检验接着事后分析(Bonferroni检验)进行。P值小于0.05(\*)、小于0.01(\*\*)或小于0.001(\*\*\*)时视为差异显著。

#### [0192] 6.2.7 通过流式细胞术的免疫荧光分析

[0193] 对于小鼠的骨髓(BM)和脾细胞悬液,用抗FcγR mAb 2.4G2进行了IgG受体阻断。然后将细胞( $1 \times 10^6$ )用抗TER-119抗体和抗小鼠TfR1抗体染色。应用FlowJo软件(Tree Star),通过流式细胞术(FACScalibur;Becton Dickinson)对染色细胞作进一步分析。

#### [0194] 6.2.8 组织收集和组织学

[0195] 收集骨髓和脾,固定于10%福尔马林中,石蜡包埋,以3-6μm切片用于苏木精和伊红(H&E)染色。

#### [0196] 6.2.9 铁、铁蛋白、胆红素和运铁蛋白定量测定。

[0197] 将血抽到肝素化管中并离心(5分钟,4°C,1,100g)。将血浆重新离心(5分钟,4°C,1,100g)以除去污染红细胞。按照生产商说明书,用Olympus AU400 automat定量测定生物化学参数。

### [0198] 6.3 结果

#### [0199] 6.3.1 mActRIIA-Fc改进地中海贫血小鼠的血液学参数。

[0200] β地中海贫血是特征在于导致红细胞成熟和产生受损的血红蛋白合成缺陷的疾病。红细胞减少主要被认为是由于在导致成熟红细胞产生总体降低的红细胞分化的晚嗜碱性/多染性成红细胞期红细胞分化和凋亡异常加速所致。该疾病的特征在于细胞过多的骨髓腔隙,在所述骨髓腔隙中成红细胞异常蓄积并进行细胞凋亡,导致全身性贫血。

[0201] 为了研究TGF-β配体在β地中海贫血的疾病机制中的作用,Hbbth1/th1小鼠用mActRIIA-Fc(SEQ ID NO:7的鼠对应物)或PBS皮下治疗0、5、10、30或60天(10mg/Kg体重)一周两次(\*p<0.05,对于各独立实验N=3-5)。与PBS治疗的动物相比,用mActRIIA-Fc治疗显著增加红细胞计数(图1A)和血细胞比容(图1B)和血红蛋白(图1C)水平,同时网织红细胞计数减少(图1D)(从治疗后10天直到第60天)。循环红细胞(RBC)参数分析还表明,平均红细胞容积(MCV)(图1E)、平均红细胞血红蛋白(MCH)(图1F)和MCH浓度(MCHC)(图1G)在用mActRIIA-Fc治疗的所有小鼠中全都增加,这表明了mActRIIA-Fc改善地中海贫血的小红细胞性贫血,并恢复血红蛋白含量/RBC。另外,在用mActRIIA-Fc治疗后,骨髓和脾细胞性(cellularity)和晚嗜碱性/多染性成红细胞显著减少。通过May-Grünwald(MGG)染色对红细胞的形态学分析进行了评价,结果显示红细胞大小不均、异形红细胞和靶细胞减少(图

1I)。为了测定mActRIIA-Fc对与 $\beta$ 地中海贫血有关的贫血的作用,对地中海贫血小鼠的全身铁水平(图1J)、运铁蛋白合成(图1K)、运铁蛋白饱和度(图1L)和铁蛋白水平(图1M)进行了评价。运铁蛋白饱和度降低,同时诱导运铁蛋白合成或全身铁水平降低(图1L)。还评价了血小板、单核细胞、淋巴细胞和嗜中性粒细胞水平(图1N)。

[0202] 通过脾重并测量脾细胞总数,对mActRIIA-Fc对地中海贫血小鼠的脾大的作用进行了评价。与PBS治疗的地中海贫血小鼠相比,用mActRIIA-Fc治疗的动物中的脾细胞数和脾重降低(图10)。类似地,在mActRIIA-Fc治疗的小鼠中,骨髓成红细胞数和扩增(通过伊红/苏木精染色测定)(图1P)也降低。收获骨髓和脾,经TER119染色通过流式细胞术定量测定成红细胞。用mActRIIA-Fc治疗显著减少地中海贫血小鼠的红细胞数(图1Q),这就表明该治疗纠正小鼠的无效红细胞发生。

[0203] 6.3.2 mActRIIA-Fc降低地中海贫血小鼠的无效红细胞发生。

[0204] 为了进一步研究TGF- $\beta$ 超家族配体在 $\beta$ 地中海贫血中的无效红细胞发生中的作用,收获脾(图2A,图2C)和骨髓(图2B,图2C),经CD71/TER119染色和前向散射/侧向散射(FSC/SSC)分配,通过流式细胞术对成红细胞分化进行了评价。在红细胞生成分化的进展期,原成红细胞(Pro-E)、嗜碱性粒细胞成红细胞(Ery-A)、晚嗜碱性(Ery-B)和多染性成红细胞和正染性成红细胞(Ery-C)中细胞百分比的时程分析显示,用所提供的mActRIIA-Fc治疗的小鼠显著减少脾中的未成熟TER119/CD71细胞(晚嗜碱性和多染性成红细胞,Ery-B),同时提高正染性成红细胞(Ery-C)的百分比(图2A)。这些结果与mActRIIA-Fc诱导的无效红细胞发生一致。虽然在用mActRIIA-Fc治疗的小鼠的骨髓中TER-199+成红细胞和Ery-B数减少(图2B),但是成熟成红细胞的量没有增加,这就表明了小鼠用mActRIIA-Fc治疗不能纠正地中海贫血小鼠骨髓中的无效红细胞发生。

[0205] 地中海贫血的慢性贫血诱导应激红细胞发生代偿反应。然而,这些反应由于无效红细胞发生因此是无益的。无效红细胞发生的特征在于RBC产生的需要,这不能被由于因成熟中的细胞凋亡引起的成熟前细胞死亡所致未成熟成红细胞增殖和分化加速抵销。因此,不平衡的未成熟/成熟成红细胞比率是地中海贫血的无效红细胞发生的特征。为了进一步研究mActRIIA-Fc对红细胞分化和无效红细胞发生的影响,来自mActRIIA-Fc治疗的小鼠及其相应对照的细胞悬液用抗TfR1和TER119的抗体标记。如前所述,通过流式细胞术以TER119高门控(high gate),对红细胞前体分化进行分析(Liu等,Blood 2006)。因此,mActRIIA-Fc治疗的小鼠在脾中呈现未成熟/成熟成红细胞比率降低,这表明了失效应激红细胞发生被纠正。在骨髓中,未成熟/成熟成红细胞比率在对照和mActRIIA-Fc治疗的小鼠之间没有不同,这进一步表明地通过mActRIIA-Fc治疗不纠正中海贫血小鼠骨髓中的无效红细胞发生。这些结果表明,ActRIIa配体促进成红细胞分化,但也促进 $\beta$ 地中海贫血中的失效应激红细胞发生。

[0206] 胆红素是血红蛋白降解的产物,由溶血引起的血浆胆红素升高是 $\beta$ 地中海贫血中无效红细胞发生的特征18。在时程分析中,用mActRIIA-Fc治疗的地中海贫血小鼠自治疗5天起总胆红素和直接胆红素血清水平降低,表明了给予mActRIIA-Fc影响由无效红细胞发生引起的溶血(图2D)。与胆红素值一致,在治疗60天后与对照相比,在用mActRIIA-Fc治疗的动物中血清乳酸脱氢酶(LDH)水平也降低(图2D),进一步证实了在用mActRIIA-Fc治疗的小鼠中组织溶血减少。

[0207] 后期红细胞发生主要造成载氧体血红蛋白(Hb)(一种由两个 $\alpha$ -珠蛋白和两个 $\beta$ -珠蛋白亚基组成的四聚体蛋白质)的产生。 $\beta$ 地中海贫血是一种常见的遗传性血红蛋白病,其特征在于 $\beta$ -珠蛋白基因产生受损或缺乏,继而非配对的 $\alpha$ -亚基蓄积。成熟中的类红细胞中过量的未结合的游离 $\alpha$ -珠蛋白沉淀,并导致诱导红细胞前体成熟前死亡的活性氧类别(ROS)的产生和细胞氧化应激损害。还进一步研究了mActRIIA-Fc对珠蛋白沉淀物的形成的影响。使用二氯二氢荧光素,通过流式细胞术评价主要原成红细胞分化中的ROS产生(图2E)。用mActRIIA-Fc或PBS处理48小时的主要地中海贫血原成红细胞的血红蛋白溶解度的分析(图2F)。

[0208] 为了深入了解与用mActRIIA-Fc治疗有关的细胞机制,在mActRIIA-Fc存在或不存在时,培养脾来源的原成红细胞,并从Hbbth1/th1小鼠中回收。使用充分确立的原成红细胞分化的体外模型(将脾前体在补充小鼠干细胞因子、Epo和地塞米松的无血清干细胞扩增培养基中培养5天)。然后使这些富含原成红细胞的培养物在1U/ml Epo和1mg/ml Fe-Tf存在下分化3天。与体内观察结果类似,用mActRIIA-Fc处理提高地中海贫血成红细胞中血红蛋白的总量。然而,当与对照处理细胞相比时,所提供的这些细胞降低膜缔合的沉淀血红蛋白的量(图2F)。因此,在用mActRIIA-Fc治疗的细胞中,在这些细胞中检测的活性氧类别(ROS)的量降低(图2E)。因此,用mActRIIA-Fc处理导致细胞毒性珠蛋白沉淀物减少及其有助于无效红细胞发生的相关ROS产生降低。总之,这些数据表明,靶向ActRIIa信号转导调节成红细胞分化,且通过mActRIIA-Fc诱捕ActRIIa配体通过有利于成熟成红细胞形成并降低膜缔合的血红蛋白沉淀而纠正无效红细胞发生。

[0209] 6.3.3 mActRIIA-Fc调节地中海贫血小鼠的细胞凋亡。

[0210] 采用流式细胞术,通过分析红细胞中促凋亡蛋白的表达,研究了 $\beta$ 地中海贫血相关的无效红细胞发生中TGF- $\beta$ 家族成员对凋亡过程的参与。虽然骨髓成红细胞中促凋亡蛋白的表达没有显著改变(图3A),但是脾成红细胞的分析显示,Ery-B细胞群中Fas-L增加(图3B)。对用PBS和mActRIIA-Fc治疗小鼠的脾细胞进行的多参数流式细胞术比较分析表明,Fas-L表达在未成熟晚嗜碱性和多染性成红细胞(Ery-B)中增加,并且在正染性成红细胞(Ery-C)中降低(图3B)。相比之下,BM成红细胞中Fas-L表达不被调节(图3A)。总起来,这些结果显示,ActRIIa信号转导在成熟中的成红细胞中的调节Fas/Fas-L途径。总的来说,这些数据表明,ActRIIa信号转导诱导造成无效红细胞发生的成熟中的成红细胞的成熟前细胞死亡。出乎意料的是,Ery-A和Ery-C细胞亚群中Fas-L表达降低,显示ActRIIa信号转导的影响对成熟中的成红细胞更明显(图3B)。在用mActRIIA-Fc治疗的动物中,tunel阳性细胞数也增加(图3C)。地中海贫血的无效红细胞发生的特征在于成熟中的成红细胞的大量细胞凋亡。研究mActRIIA-Fc治疗对细胞凋亡的影响表明,与其相应的对照相比,用所提供的mActRIIA-Fc治疗小鼠减少tunnel阳性细胞数(图3C),这表明了通过Smad-2,3活化的ActRIIa信号转导可通过调节成熟中的成红细胞的细胞凋亡水平,来控制无效红细胞发生。

[0211] 6.3.4 激活素/GDF11配体在地中海贫血小鼠脾中过量表达。

[0212] 通过qPCR,对野生型和地中海贫血小鼠脾中的ActRII、激活素A、激活素B和GDF11的RNA(mRNA)表达水平进行了评价。ActRII、激活素A、激活素B和GDF11的mRNA水平全都提高,表明了mActRIIA-Fc可在其无效红细胞发生的改善中通过其配体之一起作用(图4A)。从用mActRIIA-Fc治疗的地中海贫血小鼠脾中获得的蛋白质的蛋白质印迹分析显示,与PBS治

疗的小鼠相比,GDF11蛋白水平显著降低(图4B),进一步提示GDF11作为造成无效红细胞发生的ActRIIA配体。进一步的免疫组织化学分析显示,GDF11蛋白水平(且在小的程度上的激活素A或激活素B)在地中海贫血小鼠的脾活检样品中大大提高,而在用mActRIIA-Fc治疗的动物中消除(图3A)。通过免疫印迹法进一步证实了这些结果(图4B)。与脾切片形成对比,BM中ActRIIa配体的分析显示地中海贫血小鼠中无GDF11蓄积(图4B)。因此,在地中海贫血小鼠的脾切片的GDF11过量表达可能与无效红细胞发生有关。

[0213] 6.3.5 mActRIIA-Fc降低地中海贫血主要原成红细胞中观察到的高GDF11水平。

[0214] 为了确定哪一个TGF- $\beta$ 家族成员可能涉及 $\beta$ 地中海贫血用mActRIIA-Fc的治疗,进行了激活素/GDF信号转导途径中蛋白质的免疫组织化学分析。地中海贫血小鼠用PBS或mActRIIA-Fc治疗30天,收获脾,固定,并针对激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、ActRII和p-Smad2染色(图5A)。免疫组织化学染色显示在地中海贫血小鼠中GDF11、ActRII和p-Smad2的水平升高。为了研究激活素/GDF信号转导途径中的蛋白质是否在贫血的其它小鼠模型中过量表达,将地中海贫血小鼠中激活素A、激活素B和GDF11的表达与常氧、缺氧和 $\alpha$ phRBC小鼠进行了比较(图5B)。用PBS或mActRIIA-Fc处理48小时然后与针对激活素A、激活素B、GDF11前肽和GDF8/GDF11切割肽的特异性抗体一起温育的主要地中海贫血原成红细胞的FACS分析表明mActRIIA-Fc处理使GDF11表达归一化。GDF11染色的定量测定表明,小鼠用mActRIIA-Fc治疗显著降低GDF11水平(图5C)。通过小鼠脾的免疫组织化学分析,证实了在地中海贫血小鼠用mActRIIA-Fc治疗时GDF11表达的这种降低(图5D)。\* $p < 0.05$ ,  $N = 4$ 。因此,地中海贫血组织中mActRIIA-Fc降低GDF11过量表达的事实是mActRIIA-Fc通过靶向GDF11来纠正无效红细胞发生的另一个证据。

[0215] 6.3.6 GDF11的中和恢复成红细胞分化。

[0216] 为了确定GDF11表达增加是否是造成无效红细胞发生的原因,在针对激活素A和B和GDF11的阻断抗体存在下培养地中海贫血原成红细胞。抗GDF11抗体(但不是激活素A和B抗体)促进红细胞发生,进一步证实了GDF11通过诱导无效红细胞发生来负调节红细胞发生,通过在CD71/TER119染色后通过流式细胞术定量测定(图6A)。使用二氯二氢荧光素,通过流式细胞术评价主要原成红细胞分化中的ROS产生(图6B)。\* $p < 0.05$ ,  $N = 4$ 。因此,在地中海贫血成红细胞中,抗GDF11阻断抗体恢复细胞分化,并降低血红蛋白聚集。

[0217] 6.3.7 ActRIIA配体检测测定法

[0218] 开发了这样测定法,其检测、鉴定并量化存在于血清中的ActRIIA配体,准确地讲其在与无效红细胞发生相关的疾病(例如地中海贫血、骨髓增生异常综合征、慢性恶性贫血和镰状细胞贫血)中的异常表达。该测定法包括基于ActRIIA-Fc包被接着检测存在于血清中的ActRIIA配体的夹心ELISA。可在实验上(对于例如动物)或在临床上(对于例如人类患者)使用ActRIIA ELISA测定法以鉴定、检测和/或量化血清中的配体或受体水平,以助于治疗决策和/或测定经设计调节TGF- $\beta$ 配体或受体水平的治疗的疗效。

[0219] 6.3.8 GDF11水平在地中海贫血患者血清中升高。

[0220] 开发了上述夹心ELISA测定法以测量血清中的GDF11水平。将ELISA板用5 $\mu$ g/mL mActRIIA-Fc包被(图7A)。将递增剂量的重组GDF11加入板(0.1ng/ $\mu$ L、0.5ng/ $\mu$ L、2.5ng/ $\mu$ L)中。将板用PBS 0.1% Tween洗涤,并使用抗GDF8/11抗体,接着使用辣根过氧化物酶偶联的抗兔IgG检测,检测结合的蛋白质。GDF11以剂量依赖性方式结合用mActRIIA-Fc

包被的板,表明了可有效地使用该测定法检测和定量测定GDF11水平(图7B)。使用mActRIIA-Fc的ELISA检出少至100pg/mL的重组GDF11。

[0221] 使用含mActRIIA-Fc的夹心ELISA,针对GDF11表达测试地中海贫血患者的血清。如图8所示,与健康对照的水平相比,地中海贫血患者中GDF11水平升高3倍。

[0222] 为了确定其它ActRIIA配体的水平在地中海贫血患者中也升高,还测量了这些患者血清中的激活素A和激活素B表达水平。还开发了ELISA测定法以检测激活素A和激活素B。将ELISA板用5微克/mL ActRIIA-Fc包被。将递增剂量的重组激活素A和激活素B加入板(0.1ng/微升、0.5ng/微升、2.5ng/微升)中。将板用PBS 0.1% Tween洗涤,用抗激活素A(图9A)和抗激活素B(图10A)抗体(R&D systems)接着使用辣根过氧化物酶偶联的抗兔IgG检测,检测结合的蛋白质。激活素A(图9B)和激活素B(图10B)两者以剂量依赖性方式结合ActRIIA-Fc包被的板,表明了该测定法可有效用于检测和定量测定两种蛋白质。像GDF11一样,也可以低至100pg/mL的水平检出激活素A和激活素B。

[0223] 采用ActRIIA-Fc ELISA以测定地中海贫血患者血清中激活素A和激活素B的表达水平。与GDF11形成对照,激活素A(图9C)和激活素B(图10C)蛋白质水平两者在地中海贫血患者中均不升高,表明了ActRIIA配体GDF11唯一参与了地中海贫血疾病过程。

[0224] 6.3.9 mActRIIA-Fc不改变野生型小鼠的血液学参数。

[0225] 野生型C57BL/6小鼠用mActRIIA-Fc(10mg/Kg BW一周两次)或PBS治疗30天。红细胞计数(图11A)、血细胞比容(图11B)、血红蛋白(图11C)的评价表明参数水平不因小鼠用mActRIIA-Fc治疗而改变。仅观察到网状细胞增多略有减少(图11D)。mActRIIA-Fc也不改变红细胞(RBC)参数,例如MCV(图11E)、MCH(图11F)和MCHC(图12G)。\* $p < 0.05$ ,对于各独立实验 $N = 3-5$ 。

[0226] 还在野生型C57BL/6小鼠中,评价了mActRIIA-Fc对脾和骨髓的作用。mActRIIA-Fc增加野生型鼠的脾重,但是对脾细胞数没有显著作用。mActRIIA-Fc对骨髓细胞数也无作用(图12)。

[0227] 6.3.10 mActRIIA-Fc通过抑制GDF11刺激红细胞生成分化

[0228] 为了研究mActRIIA-Fc提高红细胞参数的细胞机制,进行了一系列体外实验,其中未发现支持mActRIIA-Fc对人CD34+细胞的直接作用的证据,如在集落形成测定法(图13A)和液体培养的红细胞分化(图13B和13C)中的评价。由于临床和药理学研究结果两者指出mActRIIA-Fc在刺激RBC参数中的明确作用,因此假设可通过骨髓(BM)微环境中的佐细胞介导mActRIIA-Fc的作用。将极富祖红细胞的人CD36+细胞与长期BM培养物一起共培养,然后在补充EPO(2U/mL)的培养基中培养6天后,评价其红细胞分化。在第6天,培养物产出的特征主要在于EryA(~嗜碱性成红细胞),但添加mActRIIA-Fc(50 $\mu$ M)时,大部分的CD36+细胞成熟成为EryB/C细胞(多染性/正染性成红细胞),表明了由BM佐细胞产生的因子介导mActRIIA-Fc的红细胞生成作用,并且与EPO形成对照,mActRIIA-Fc可在较后期或成红细胞成熟中起作用(图13D-13F)。为了鉴定可介导mActRIIA-Fc的作用的细胞因子,将CD36+细胞用几种ActRIIA配体处理。GDF11处理显著降低在分化过程中糖蛋白A阳性(GPA+)细胞的增殖,并且mActRIIA-Fc有效地逆转该作用,同时对未处理细胞没有影响(图13G和13H)。这些数据显示,抑制GDF11介导mActRIIA-Fc的红细胞生成刺激作用。

[0229] 6.4结论

[0230] 总而言之,数据证实,激活素/BMP信号转导控制成红细胞分化,且靶向BMP II型/激活素II型受体可降低无效红细胞发生,并改善β地中海贫血的贫血。具体地说,数据显示,GDF11涉及β地中海贫血相关贫血,并且显示抑制或降低地中海贫血患者的GDF11水平是无效红细胞发生相关贫血的有效疗法。

[0231]

7. 序列描述  
表 1: 序列信息

SEQ ID NO:	描述	序列
1	人 ActRIIA 前体多肽	MGAAAKLAFVFLISCSSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDINDICYDRITDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEMEVTPKPPYNNILLYSLVPLMLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLPVPTQDPGPPPPSLLGLKPLQLLEVKARGFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEVEVYSLPGMKHENILQFIGAEKRGTSVDVLDLITAFHEKGSLSDFLKANVSWNELCHIAETMARGLAYLHEDIPGLKDGHKPAISHRDIKSNVLLKNNLTACIADFLALKFEAGKSAAGDTHGQVGTTRRYMAPEVLEGAINFQDAFLRIDMYAMGLVWELASRCTAADGPVDEYMLPFEIEIGQHPSEDMQEVVHHKKRPVLRDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMORLNTNIITTEDIVTVVTMVTNVDFPPKESL
2	人 ActRIIA 可溶性(胞外)加工的多肽序列	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDINDICYDRITDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEMEVTPKPPYNNILLYSLVPLMLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLPVPTQDPGPPPPSLLGLKPLQLLEVKARGFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEVEVYSLPGMKHENILQFIGAEKRGTSVDVLDLITAFHEKGSLSDFLKANVSWNELCHIAETMARGLAYLHEDIPGLKDGHKPAISHRDIKSNVLLKNNLTACIADFLALKFEAGKSAAGDTHGQVGTTRRYMAPEVLEGAINFQDAFLRIDMYAMGLVWELASRCTAADGPVDEYMLPFEIEIGQHPSEDMQEVVHHKKRPVLRDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMORLNTNIITTEDIVTVVTMVTNVDFPPKESL
3	人 ActRIIA 可溶性(胞外)加工的多肽序列,其C端15个氨基酸缺失	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDINDICYDRITDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEMEVTPKPPYNNILLYSLVPLMLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLPVPTQDPGPPPPSLLGLKPLQLLEVKARGFGCVWKAQLLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEVEVYSLPGMKHENILQFIGAEKRGTSVDVLDLITAFHEKGSLSDFLKANVSWNELCHIAETMARGLAYLHEDIPGLKDGHKPAISHRDIKSNVLLKNNLTACIADFLALKFEAGKSAAGDTHGQVGTTRRYMAPEVLEGAINFQDAFLRIDMYAMGLVWELASRCTAADGPVDEYMLPFEIEIGQHPSEDMQEVVHHKKRPVLRDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMORLNTNIITTEDIVTVVTMVTNVDFPPKESL
4	编码人 ActRIIA 前体蛋白的核酸序列	ATGGGAGCTGCTGCAAAGTTGGCGTTTGCCGCTTTCTTATCTCCTGTTCTTCAGGTGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGGAGTGTCTTTCTTTAATGCTAATGGGAAAAGACAGAACCAATCAAACTGGTGTGAAACCGTGTATGGTGACAAAAGATAACGGCGGCAATGTTTGTCTACCTGGAAGAATAATCTGGTTCCATTGAAATAGTGAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTTGTGTAGAAAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTTGTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTCTTATTTCCAGAGATGGAAGTACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGC

[0232]

SEQ ID NO:	描述	序列
		<p>CACCCATTACAACATCCTGCTCTAATTCCTTGGTGCCACTTATGTTAATT                      GCGGGATTGTCATTTGTGCAATTTGGGTGTACAGGCATCAACAAGATGGC                      CTACCCCTCCTGTACTTGTCCAACTCAAGACCCAGGACCCACCCACCTT                      CTCCATTACTAGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAAAGTGAAGCAAGG                      GGAAGATTTGGTTGTGCTGGAAAGCCAGTTGCTTACGAATATGTGGC                      TGTCAAAATATTTCCAATACAGGACAACAGTCAATGGCAAAATGAATACG                      AAGTCTACAGTTTGCCTGGAATGAGCATGAGAACATATTACAGTTCAAT                      GGTGCAGAAAACGAGGCCACCAAGTGTGATGTGGATCTTTGGCTGATCAC                      AGCATTTTCATGAAAAAGGGTTCACTATCAGACTTTCTTAAGGCTAATGTGG                      TCTCTTGGAAATGAAGTGTGTCATATTGCAGAAACCAATGGCTAGAGGATG                      GCATATTTACATGAGGATATACCTGGCTAAAGATGGCCACAAACCTGC                      CATATCTACAGGGACATCAAAAGTAAATGTGCTGTGAAAAACAACC                      TGACAGCTTGCAATGCTGACTTTGGGTTGGCCTTAAATTTGAGGCTGGC                      AAGTCTCAGGGATACCCATGGACAGTTGGTACCCGGAGGTACATGGC                      TCCAGAGGTTATGAGGGTGTATAAATTCGAAAGGGATGCAATTTTGA                      GGATAGATATGATGCCATGGGATAGTCTTATGGAACTGGCTTCTCGC                      TGTACTGCTGCAGATGGACCTGTAGATGAATACATGTTGCCAATTTGAGGA                      GGAAATTTGGCCAGCATCCATCTCTTGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGTGC                      ATAAAAAAAAGAGGGCTGTTTTAAGAGATTATTGGCAGAAAACATGCTGGA                      ATGGCAATGCTCTGTGAAAACCAATGAAGAATGTTGGGATCACGACGCAGA                      AGCCAGGTTATCAGCTGGATGTGAGGTGAAAAGAATTACCCAGATGCAGA                      GACTAACAAATATTATACCACAGAGGACATGTAAACAGTGGTCAACAATG                      GTGACAAATGTTGACTTTCCCTCCCAAGAAATCTAGTCTATGA</p>
5	<p>编码人 ActRIIA 可溶性(胞外)多肽的核酸序列</p>	<p>ATACTTGGTAGATCAGAAAATCAGGAGTGTCTTTCTTTAATGCTAATG                      GGAAAAAGACAGAACCAATCAAACTGGTGTGAACCGTGTATGGTGACA                      AAGATAAACGGCGCATTTTGTCTACCTGGAAAGAATATTTCTGGTTCC                      ATTGAAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGA                      CAGGACTGATTTGTGTAGAAAAAAAAGACAGCCCTGAAAGTATATTTTGT                      GCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTTCTTATTTTCCAGAGATG                      GAAGTCACACAGCCCACTTCAAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCC</p>

[0233]

SEQ ID NO:	描述	序列
6	包含与Fc结构域融合的可溶性胞外域的融合蛋白	<p>                     THTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD(A)VSHE                      DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY                      KCK(A)VSNKALPVPPIEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT                      CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGPFPLYSKLTVDKSR                      WQQGNVFCSSVMHEALHN(A)HYTQKLSLSPGK*                 </p>
7	与人Fc结构域融合的人ActRIIA的胞外域	<p>                     ILGRSETQECLEFFNANWEKDRNTQGTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGS                      IEIVKQGCWLDINDICYDRDTCVEKDKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEM                      EVTQTSNPVTPKPTGGGTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI                      SRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV                      SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTKISKAKGQPREPQVYTLPP                      SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS                      FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK                      MKFLVNVALVFMVYIYIYA                 </p>
8	蜜蜂蜂毒肽的前导序列(HBML)	MDAMKRGLCVLLLCGAVFVSP
9	组织纤溶酶原激活物(TPA)的前导序列	MGAAAKLAFVFLISCSSGA
10	天然ActRIIA前导序列	ILGRSETQE
11	ActRIIA-hFc和ActRIIA-mFc N端序列	ILGRSETQECLEFFNANWEKDRNTQGTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGS IEIVKQGCWLDINDICYDRDTCVEKDKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEM TGGGTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY YKCKVSNKALPVPPIEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
12	ActRIIA胞外域C端15个氨基酸缺失的ActRIIA-Fc蛋白质	

[0234]

SEQ ID NO:	描述	序列
13	具有 TPA 前导序列的未加工的 ActRIIA-hFc	<p>VKGFYPSDIAVESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ                      QGNVFCSSVMHEALHNHYTKLSLSLSPGK                      MDAMKRLCCVLLCGAVFVSPGAALGRSETQECLFFNANWEKDRINQT                      GVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDINCYDRIDCVEKK                      DSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPP                      CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY                      VDGVVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL                      PVPIEKTKAKAQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA                      VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM                      HEALHNHYTKLSLSLSPGK</p>
14	编码具有 TPA 前导序列的未加工的核 ActRIIA-hFc 的核酸序列	<p>ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGTGTGGAGC                      AGTCTTCGTTTCGCGCGCGCGCTATACTTGGTAGATCAGAAAATCAGG                      AGTGTCTTTTTTAATGTAATTGGGAAAAGACAGAAACCAATCAAATG                      GTGTGAACCGTGTATGGTGACAAGATAAACGGCGCATGTTTTGCT                      ACCTGGAAAGAATTTCTGGTTCATGAAATAGTGAACAAGGTTGTTGG                      CTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGA                      CAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAA                      AGTTTTCTTATTTCCGGAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCA                      GTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGAAGTCAACATGCCACCCGCTG                      CCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAA                      AACCCAAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG                      GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT                      GGACGGGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAAGCCGGGAGGAGCAGT                      ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCTCCACCGTCTGCACCCAGGAC                      TGGCTGAATGGCAAGGATACAAGTCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCC                      AGTCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC                      CACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAG                      GTCAGCCTGACCTGCCTGTGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGT                      GGAGTGGGAGAGCAATGGGACGCGGAGAAACAACACTACAAGACCACGCTC                      CCGTGTGACTCCGACGGCTCTTCTTCTATATAGCAAGCTCACCCGTG</p>

[0235]

SEQ ID NO:	描述	序列
15	具有 EC 结构域 N 端 6 个氨基酸缺失和 EC 结构域 C 端 4 个氨基酸缺失(SEQ ID NO:28 的氨基酸 25-130) 和具有 L79D 突变的人 ActRIIB 可溶性(胞外)加工的多肽序列	<p>GACAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA                      TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG                      GTAAATGAGAAATTC</p> <p>ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELY                      KKGCVDDDFNFCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGP                      EVTYEPPP</p>
16	人 ActRIIB 前体蛋白序列(A64)	<p>MTAPWVALALLWGSLW PGSGRGEAETRECIYY NANWELERTNQSLER                      CEGEQDKRLHCYASWA NSSGTIELVKKGCWLD DFNCYDRQECVATEEN                      PQVYFCCCEGNFCNER FTHLPEAGGPEVTYEP PPTAPTLLTVLAYSLL                      PIGGLSLVLLAFWMY RHRKPPYGHVDIHEDP GPPPPSPLVGLKPLQL                      LEIKARGRFGCVWKAQ LMNDFVAVKIFPLQDK QSWQSEREIFSTPGMK                      HENLLQFIAAEKRGSN LEVELWLITAFHDKGS LTDYLGKNIITWNELC                      HVAETMSRGLSYLHED VPWCRGEGHKPSIAHR DFKSKNVLLKSDLTAV                      LADFGLAVRFEFGKPP GDTHGQVGTTRRYMAPE VLEGAINFQRDAFLRI                      DMYAMGLVLWELVSRC KAADGPVDEYMLPFEE EIGQHPSEELQEYVV                      HKKMRPTIKDHWLKHG GLAQLCVTIEECWDHD AEARLSAGCVEERVSL                      IRRSVNGTTSDCLVSL VTSVTNVLDLPPKESSI</p>
17	人 ActRIIB 可溶性(胞外)加工的多肽序列(SEQ ID NO:16 的氨基酸 19-134)	<p>SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG                      TIELVKKGCWLDDFNFCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE                      AGGPEVTYEPPTAPT</p>



[0237]

SEQ ID NO:	描述	序列
20	包含与 Fc 结构域融合的 ActRIIB 的可溶性胞外域(A64; SEQ ID NO:17)的融合蛋白	<p>TTGACATGATGCCATGGGGTTGGTGTGGGAGCTTGTGTCTCGCTGC                      AAGGCTGCAGACGGACCCGTTGGATGAGTACATGCTGCCCTTTGAGGAAGA                      GATTGGCCAGCACCCCTTCGTTGGAGGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTGCACA                      AGAAGATGAGGCCACCATTAAGATCACTGTTGAACACCCGGCCCTG                      GCCCAGCTTGTGTGACCATCGAGGAGTGTGGACCATGATGACAGAGGC                      TCGCTTGTCCGGGGCTGTGTGGAGGAGCGGGTGTCCCTGATTCGGAGGT                      CGGTCAACGGCACTACCTCGGACTGTCTCGTTTCCCTGTGACCTCTGTC                      ACCAATGTGACCTGCCCCCTAAAGAGTCAAGCATCTAA</p> <p>SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG                      TIELVKKGCWLDLDFNCFYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE                      AGGPEVTYEPPPTAPTTGGTHTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI                      SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV                      SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVEIKTISKAKGQPREPQVYVTLPP                      SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS                      FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> <p>SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG                      TIELVKKGCWLDLDFNCFYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE                      AGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH                      EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE                      YKCKVSNKALPVEIKTISKAKGQPREPQVYVTLPPSREEMTKNQVSLTCL                      VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ                      QGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> <p>ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG                      TIELVKKGCWLDLDFNCFYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE                      EVTYEPP</p>
21	包含与 Fc 结构域融合其 C 端 15 氨基酸缺失的 ActRIIB 的可溶性胞外域 (A64) (SEQ ID NO:18)的融合蛋白	<p>SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG                      TIELVKKGCWLDLDFNCFYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE                      AGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH                      EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE                      YKCKVSNKALPVEIKTISKAKGQPREPQVYVTLPPSREEMTKNQVSLTCL                      VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ                      QGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
22	其 EC 结构域 N 端 6 个氨基酸缺失和 EC 结构域 C 端 5 个氨基酸缺失 (SEQ ID NO:28 的氨基酸 25-129) 和具有	<p>ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG                      TIELVKKGCWLDLDFNCFYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE                      EVTYEPP</p>

[0238]

SEQ ID NO:	描述	序列
23	L79D 突变的人 ActRIIB 可溶性(胞外)加工的多肽序列 其EC 结构域N端6 个氨基酸缺失和 EC 结构域3 个氨基酸缺失 (SEQ ID NO:28 的氨基酸 25-131) 并具有 L79D 突变的人 ActRIIB 可溶性(胞外)加工的多肽序列	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELV KKGCVDDDDFNFCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGP EVTYEPPT
24	其EC 结构域N端6 个氨基酸缺失和 EC 结构域3 个氨基酸缺失 (SEQ ID NO:28 的氨基酸 25-131) 并具有 L79D 突变和具有 TPA 前导序列的未加工的 ActRIIB-Fc 融合蛋白	MDAMKRGCLCCVLLCGAVFVSPGAAETRECIYYNANWELERTNQSLERC EGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDDFNFCYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTGGGTHTCPPAPELLGG PSVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPVLDSDGSAFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
25	其EC 结构域N端6 个氨基酸缺失和	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK KKGCVDDDDFNFCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEV

[0239]

SEQ ID NO:	描述	序列
	EC 结构域C 端3个氨基酸缺失 (SEQ ID NO:28 的氨基酸 25-131) 并具有 L79D 突变的加工的 ActRIIB-Fc 融合蛋白	TYEPPPTGGTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSLIVLHQD WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
26	人 ActRIIB 可溶性(胞外)加工的多肽序列 (SEQ ID NO:16 的氨基酸 20-134)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWLDNFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPT
27	其C 端15个氨基酸缺失 (SEQ ID NO:16 的氨基酸 20-119) 的人 ActRIIB 可溶性(胞外)加工的多肽序列	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWLDNFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGFCNERFTHLPE A
28	人 ActRIIB 前体蛋白序列(R64)	MTAPWVALALLWGSW PGSGRGEAETRECIYY NANWELERTNQGLER CEGEQDKRLHCYASWR NSSGTIELVKKGCWLD DFNCYDRQECVATEEN PQVYFCCCEGFCNER FTHLPEAGGPEVTYEP PPTAPTLTIVLAYSLL PIGGLSLIVLLAFWMY RHRKPPYGHVDIHEDP GPPPPSPLVGLKPLQL LEIKARGRFGCVWKAQ LMNDFVAVKIFPLQDK QSWQSEREIFSTPGMK HENLLQFIAAEKRGSN LEVELWLITAFHDKGS LTDYLKGNITWNELC HVAETMSRGLSYLHED VPWCRGEGHKKPSIAHR DFKSKNVLLKSDLTAV LADFGLA VRFEFGKPP GDTHGQVGTTRRYMAPE VLEGAINFQRDAFLRI DMYAMGLVLWELVSRK KAADGPVDEYMLPFEE EIGQHPSELEELQEVVV

[0240]

SEQ ID NO:	描述	序列
		HKKMRPTIKDHWLKHPLGLAQLCVTIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSL IRRSVNGTTSDCLVSLVTSVTNVDLPPKESSI
29	人 ActRIIB 可溶性(胞外)加工的多肽序列(SEQ ID NO:28 的氨基酸 19-134)	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPT
30	其 C 端 15 个氨基酸缺失 (SEQ ID NO:28 的氨基酸 19-119) 的人 ActRIIB 可溶性(胞外)加工的多肽序列	SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGFCNERFTHLPE A
31	人 ActRIIB 可溶性(胞外)加工的多肽序列(SEQ ID NO:28 的氨基酸 20-134)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPT
32	其 C 端 15 个氨基酸缺失 (SEQ ID NO:28 的氨基酸 20-119) 的人 ActRIIB 可溶性(胞外)加工的多肽序列	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGFCNERFTHLPE A
33	其 EC 结构域 N 端 6	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELV KKGCVWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGFCNERFTHLPEAGGP

[0241]

SEQ ID NO:	描述	序列
34	<p>个氨基酸缺失和 EC 结构域 C 端 3 个氨基酸缺失 (SEQ ID NO:28 的氨基酸 25-131) 并具有 L79D 突变的人 ActRIIB 可溶性(胞外)加工的多肽序列</p> <p>其 EC 结构域 N 端 6 个氨基酸缺失和 EC 结构域 C 端 3 个氨基酸缺失 (SEQ ID NO:28 的氨基酸 25-131) 并具有 L79D 突变和具有 TPA 前导序列未加工的 ActRIIB-Fc 融合蛋白</p>	<p>EVTYEPPT</p> <p>MDAMKRGCCVLLCGAVFVSPGAAETRECIYYNANWELERTNQSLERC EGEQDKRLHICYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTGGGTHTCPPCPAPPELLGG PSVFLFPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCVMHEALHNHYT QKSLSPGK*</p>
35	<p>其 EC 结构域 N 端 6 个氨基酸缺失和 EC 结构域 C 端 3 个氨基酸缺失 (SEQ ID NO:28 的氨基酸 25-131) 并具有</p>	<p>ETRECIYYNANWELERTNQSLERC EGEQDKRLHICYASWANSSGTIELVK KGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEV TYEPPTGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPKPKDLMISRTPEVTCV VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVDFSCVMHEALHNHYTQKSLSPGK*</p>

[0242]

SEQ ID NO:	描述	序列
	L79D 突变的加工 的 ActRIIB-Fc 融合 蛋白	
36	具有 L79D 突变的 人 ActRIIB 可溶性( 胞外)加工的多肽序 列(SEQ ID NO:28 的氨基酸 20-134)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHICYASWRNSSG TIELVKKGCWDDDFNFCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPT
37	具有 L79D 突变的 人 ActRIIB 可溶性( 胞外)加工的多肽序 列(SEQ ID NO:16 的氨基酸 20-134)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHICYASWRNSSG TIELVKKGCWDDDFNFCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPT
38	用 GGG 接头与 Fc 结构域融合的具有 L79D 突变的人 ActRIIB 可溶性(胞 外)加工的多肽序列 (SEQ ID NO:28 的 氨基酸 20-134)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHICYASWRNSSG TIELVKKGCWDDDFNFCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPTGGGTHCPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
39	与 Fc 结构域融合的 具有 L79D 突变的 人 ActRIIB 可溶性( 胞外)加工的多肽序	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHICYASWRNSSG TIELVKKGCWDDDFNFCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPTGGGTHCPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS

[0243]

SEQ ID NO:	描述	序列
40	列(SEQ ID NO:16 的氨基酸 20-134) 与 Fc 结构域融合的具有 L79D 突变和 TPA 前导序列的人 ActRIIB 可溶性(胞外)加工的多肽序列 (SEQ ID NO:28 的氨基酸 20-134)	KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHHT QKLSLSLSPGK* MDAMKRGLCVLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYNNANWELERTNQSG LERCEGEQDKRLHLCYASWRNSSG TIELVKKGCWDDDFNCFYDRQECVATEENPQVYFCCCEGFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPTGGTHTCPPCPAPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHHT QKLSLSLSPGK*
41	与 Fc 结构域融合的具有 L79D 突变和具有 TPA 前导序列的人 ActRIIB 可溶性(胞外)加工的多肽序列 (SEQ ID NO:16 的氨基酸 20-134)	MDAMKRGLCVLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYNNANWELERTNQSG LERCEGEQDKRLHLCYASWRNSSG TIELVKKGCWDDDFNCFYDRQECVATEENPQVYFCCCEGFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPTGGTHTCPPCPAPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHHT QKLSLSLSPGK*
42	具有变异 C 端序列 ( 公 开 于 WO2007/053775) 的人 ActRIIB 可溶性(胞外)加工的多肽序列	GRGEAETRECIYNNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHLCYASWRNSSGT IELVKKGCWDDDFNCFYDRQECVATEENPQVYFCCCEGFCNERFTHLPEA GGPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQGGALWLCLEGPAHE

[0244]

SEQ ID NO:	描述	序列
43	具有带 L79D 突变的变异 C 端序列(公开 WO2007/053775)的人 ActRIIB 可溶性(胞外)加工的多肽序列	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGT IELVKKGCWDDDFNFCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQGGSGALWLCLEGPAHE
44	用 TGGG 接头与 Fc 结构域融合的具有带 L79D 突变的变异 C 端序列(公开 WO2007/053775)的人 ActRIIB 可溶性(胞外)加工的多肽序列	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGT IELVKKGCWDDDFNFCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA GGPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQGGSGALWLCLEGPAHE TGGGTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK*
45	编码 SEQ ID NO:24 的核酸序列	ATGGATGCAA TGAAGAGAGAG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC AGTCTTCGTT TCGCCCGGGG CCGCCGAAAC CCGCGAATGT ATTTATTACA ATGCTAATTG GGAACCTCGAA CGGACGGAACC AATCCGGGCT CGAACGGTGT GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTCGT GGAGGAACTC CTCCGGGACG ATTGAACTGG TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTTCA ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTCGCGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC TATTTCTGTT GTTGCAGGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT CCCCGAAGCC GCGGGGCCCG AGGTGACCTA TGAACCCCCG CCCACCCGTTG GTGGAACCTCA CACATGCCCA CCGTGCACCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAAGACC

[0245]

SEQ ID NO:	描述	序列
		CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCTCACC GTCCTGACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCCACG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC ACAAGACCAC GCCTCCCCTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTAT AGCAAAGTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAAGACC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAG TGA
46	包含与 Fc 结构域融合的 ActRIIB 的可溶性胞外域(R64; SEQ ID NO:29)的融合蛋白	SGRGEAETRECIYNNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPTGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPKEIKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
47	包含与 Fc 结构域融合的其 C 端 15 个氨基酸缺失(SEQ ID NO:30)的可溶性 ActRIIB 的胞外域(R64)的融合蛋白	SGRGEAETRECIYNNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPVPKEIKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

<p><b>48</b></p>	<p>全长未加工的前体蛋白 GDF11, 即 GDF11 前蛋白质</p>	<p>MVLAAPLLLGFLLLALELRPRGEEAEGPAAAA                  AAAAAAAAAAGVGGERSRPAPSVAPEDGCPV                  CVWRQHSRELRLSEIKSQLSKLRLKEAPNISRE                  VVKQLLPKAPPLQQILDHDFQGDALQPEDFLE                  EDEYHATTETVISMAQETDPAVQTDGSPLCCHF                  HFSPKVMFTKVLKAQLWVYLRVPRPATVYLQ                  ILRLKPLTGEGTAGGGGGRRHIRIRSLKIELHS                  RSGHWQSIDFKQVLHSWFRQPQSNWGIEINAF                  DPSGTDLAVTSLGPGAEGLHPFMELRVLENTKR                  SRRNLGLDCDEHSSESRCRCRYPLTVDFEAFGW                  DWIAPKRYKANYCSGQCEYMFQMKYPHTHL                  VQQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNDKQQ                  IYGKIPGMVVDRCGCS</p>
<p><b>49</b></p>	<p>编码 SEQ ID NO: 48 的核酸序列</p>	<p>ATGGTGCTCGCGGCCCGCTGCTGCTGGGCTT                  CCTGCTCCTCGCCCTGGAGCTGCGGCCCGG                  GGGGAGGCGGCCGAGGGCCCCGCGGCGGCG                  GCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCG                  GGGGTCGGGGGGGAGCGCTCCAGCCGGCCA                  GCCCCGTCCGTGGCGCCCGAGCCGGACGGCT                  GCCCCGTGTGCGTTTGGCGGCAGCACAGCCG                  CGAGCTGCGCCTAGAGAGCATCAAGTCGCAG                  ATCTTGAGCAAACCTGCGGCTCAAGGAGGCGC                  CCAACATCAGCCGCGAGGTGGTGAAGCAGCT                  GCTGCCAAGGCGCCGCGCTGCAGCAGATC                  CTGGACCTACACGACTTCCAGGGCGACGCGC                  TGCAGCCCAGGACTTCCTGGAGGAGGACGA                  GTACCACGCCACCACCGAGACCGTCATTAGC                  ATGGCCCAGGAGACGGACCCAGCAGTACAGA                  CAGATGGCAGCCCTCTCTGCTGCCATTTTCAC                  TTCAGCCCCAAGGTGATGTTCAAAAGGTAC                  TGAAGGCCAGCTGTGGGTGTACCTACGGCC                  TGTACCCCGCCAGCCACAGTCTACCTGCAGA                  TCTTGCGACTAAAACCCCTAACTGGGGAAGG                  GACCGCAGGGGGAGGGGGCGGAGGCCGGCG                  TCACATCCGTATCCGCTCACTGAAGATTGAGC                  TGCACTCAGCTCAGGCCATTGGCAGAGCAT                  CGACTTCAAGCAAGTGCTACACAGCTGGTTC                  CGCCAGCCACAGAGCAACTGGGGCATCGAGA                  TCAACGCCTTTGATCCCAGTGGCACAGACCT                  GGCTGTCACCTCCCTGGGGCCGGGAGCCGAG                  GGGCTGCATCCATTCATGGAGCTTCGAGTCCT                  AGAGAACACAAAACGTTCCCGGCGGAACCT                  GGGTCTGGACTGCGACGAGCACTCAAGCGAG                  TCCCGCTGCTGCCGATATCCCCTCACAGTGGA                  CTTTGAGGCTTTCGGCTGGGACTGGATCATCG                  CACCTAAGCGCTACAAGGCCAACTACTGCTC                  CGGCCAGTGCGAGTACATGTTTCATGAAAAAT                  ATCCGCATACCCATTTGGTGCAGCAGGCCAAT                  CCAAGAGGCTCTGCTGGGCCCTGTTGTACCC                  CCACCAAGATGTCCCAATCAACATGCTCTAC</p>

[0246]

		TTCAATGACAAGCAGCAGATTATCTACGGCAA GATCCCTGGCATGGTGGTGGATCGCTGTGGCT GCTCT
50	人 GDF11 蛋白的 GDF11 前肽	AEGPAAAAAAAAAAAAAAAAAGVGGERSRPAPSVA PEPDGCPVCVWRQHSRELRLSEIKSQILSKLRL KEAPNISREVVKQLLPKAPPLQQILDHDFQGD ALQPEDFLEEDEYHATTETVISMAQETDPAVQT DGSPLCCHFHFSPKVMFTKVLKAQLWVYLRPV PRPATVYQLILRLKPLTGEGTAGGGGGGRRHIRI RSLKIELHSRSGHWQSIDFKQVLHSWFRQPQSN WGIEINAFDPSGTDLAVTSLGPGA EGLHPFMEL RVLENTKRSRR
51	编码 SEQ ID NO: 50 的核酸序列	GCCGAGGGCCCCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCG GCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGGGGTTCGGG GGGGAGCGCTCCAGCCGGCCAGCCCCGTCCG TGGCGCCCGAGCCGGACGGCTGCCCCGTGTG CGTTTGGCGGCAGCACAGCCGCGAGCTGCGC CTAGAGAGCATCAAGTCGCAGATCTTGAGCA AACTGCGGCTCAAGGAGGCGCCCAACATCAG CCGCGAGGTGGTGAAGCAGCTGCTGCCCAAG GCGCCGCGCTGCAGCAGATCCTGGACCTAC ACGACTTCCAGGGCGACGCGCTGCAGCCCGA GGACTTCTGGAGGAGGACGAGTACCACGCC ACCACCGAGACCGTCATTAGCATGGCCCAGG AGACGGACCCAGCAGTACAGACAGATGGCAG CCCTCTCTGCTGCCATTTTCACTTCAGCCCCA AGGTGATGTTCAAAAGGTACTGAAGGCCCA GCTGTGGGTGTACCTACGGCCTGTACCCCGCC CAGCCACAGTCTACCTGCAGATCTTGCGACTA AAACCCCTAACTGGGGAAGGGACCGCAGGG GGAGGGGGCGGAGGCGGCGTACATCCGTA TCCGCTCACTGAAGATTGAGCTGCACTCACG CTCAGGCCATTGGCAGAGCATCGACTTCAAG CAAGTGCTACACAGCTGGTTCCGCCAGCCAC AGAGCAACTGGGGCATCGAGATCAACGCCTT TGATCCCAGTGGCACAGACCTGGCTGTCACC TCCCTGGGGCCGGGAGCCGAGGGGCTGCATC CATTATGGAGCTTCGAGTCCTAGAGAACAC AAAACGTTCCCGGCGG
52	成熟人 GDF11 蛋白	NLGLDCDEHSSSRCCRYPLTVDFEAFGWDWII APKRYKANYCSGQCEYMFQMKYPHTHLVQQA NPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNDKQQIIYGK IPGMVVDRCGCS
53	编码 SEQ ID NO: 52 的核酸序列	AACCTGGGTCTGGACTGCGACGAGCACTCAA GCGAGTCCCGCTGCTGCCGATATCCCCTCACA GTGGACTTTGAGGCTTTCGGCTGGGACTGGA TCATCGCACCTAAGCGCTACAAGGCCAACTAC TGCTCCGGCCAGTGCAGATACATGTTTCATGCA AAAATATCCGCATACCCATTTGGTGCAGCAGG

[0247]

[0248]		CCAATCCAAGAGGCTCTGCTGGGCCCTGTTGT ACCCCCACCAAGATGTCCCAATCAACATGCT CTACTTCAATGACAAGCAGCAGATTATCTACG GCAAGATCCCTGGCATGGTGGTGGATCGCTGT GGCTGCTCT
	54 与鼠Fc结构域融合的鼠 ActRIIA胞外域 ("mActRIIA-Fc")	SEQ ID NO: 7 的鼠对应物

[0249] 8. 等同内容

[0250] 虽然参照其具体实施方案详细描述了本发明, 但应了解, 在功能上等同的变化落入本发明的范围内。实际上, 根据前面的描述和附图, 除本文所示和描述的修改以外, 本发明的各种修改对本领域技术人员而言是显而易见的。这类修改欲落入随附权利要求书的范围内。本领域技术人员应认识到, 或能够只是采用常规实验确定, 本文所述本发明的具体实施方案的许多等同内容。随附权利要求书欲包括所述等同内容。

[0251] 本说明书提及的所有出版物、专利和专利申请通过引用结合到该说明书中, 其程度与每个单独的出版物、专利或专利申请具体而单独指明通过引用以其整体结合到本文中一样。

## 序列表

- <110> 细胞基因公司  
 <120> 用于治疗贫血的方法  
 <130> 12827-331-228  
 <140>  
 <141>  
 <150> 61/718,128  
 <151> 2012-10-24  
 <160> 53  
 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0  
 <210> 1  
 <211> 513  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <220>  
 <223> 人ActRIIA前体多肽  
 <400> 1

```

Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys
1           5           10           15
Ser Ser Gly Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe
           20           25           30
Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu
           35           40           45
Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp
           50           55           60
Lys Asn Ile Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu
65           70           75           80
Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp
           85           90           95
Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu
           100          105          110
Lys Phe Ser Tyr Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn
           115          120          125
Pro Val Thr Pro Lys Pro Pro Tyr Tyr Asn Ile Leu Leu Tyr Ser Leu
           130          135          140
Val Pro Leu Met Leu Ile Ala Gly Ile Val Ile Cys Ala Phe Trp Val
145          150          155          160
Tyr Arg His His Lys Met Ala Tyr Pro Pro Val Leu Val Pro Thr Gln

```

	165	170	175
Asp Pro Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Leu Gly Leu Lys Pro Leu			
	180	185	190
Gln Leu Leu Glu Val Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys			
	195	200	205
Ala Gln Leu Leu Asn Glu Tyr Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Ile Gln			
	210	215	220
Asp Lys Gln Ser Trp Gln Asn Glu Tyr Glu Val Tyr Ser Leu Pro Gly			
225	230	235	240
Met Lys His Glu Asn Ile Leu Gln Phe Ile Gly Ala Glu Lys Arg Gly			
	245	250	255
Thr Ser Val Asp Val Asp Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Glu Lys			
	260	265	270
Gly Ser Leu Ser Asp Phe Leu Lys Ala Asn Val Val Ser Trp Asn Glu			
	275	280	285
Leu Cys His Ile Ala Glu Thr Met Ala Arg Gly Leu Ala Tyr Leu His			
	290	295	300
Glu Asp Ile Pro Gly Leu Lys Asp Gly His Lys Pro Ala Ile Ser His			
305	310	315	320
Arg Asp Ile Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Asn Asn Leu Thr Ala			
	325	330	335
Cys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Leu Lys Phe Glu Ala Gly Lys Ser			
	340	345	350
Ala Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro			
	355	360	365
Glu Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg			
	370	375	380
Ile Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Ala Ser Arg			
385	390	395	400
Cys Thr Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu			
	405	410	415
Glu Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Asp Met Gln Glu Val Val			
	420	425	430
Val His Lys Lys Lys Arg Pro Val Leu Arg Asp Tyr Trp Gln Lys His			
	435	440	445
Ala Gly Met Ala Met Leu Cys Glu Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His			
	450	455	460
Asp Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Gly Glu Arg Ile Thr			
465	470	475	480

Gln Met Gln Arg Leu Thr Asn Ile Ile Thr Thr Glu Asp Ile Val Thr  
 485 490 495  
 Val Val Thr Met Val Thr Asn Val Asp Phe Pro Pro Lys Glu Ser Ser  
 500 505 510

Leu

<210> 2

<211> 115

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 人ActRIIA可溶性(胞外), 加工的多肽

<400> 2

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

Lys Pro Pro

115

<210> 3

<211> 100

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人ActRIIA可溶性(胞外), 加工的多肽, 其C端15个氨基酸缺失

<400> 3

Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn  
 1 5 10 15  
 Trp Glu Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly  
 20 25 30

Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser  
 35 40 45  
 Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn  
 50 55 60  
 Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val  
 65 70 75 80  
 Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr  
 85 90 95  
 Phe Pro Glu Met  
 100

<210> 4

<211> 1542

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<223> 人ActRIIA前体

<400> 4

atgggagctg ctgcaaagtt ggcgtttgcc gtctttctta tctcctgttc ttcaggtgct 60  
 atacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 120  
 agaaccaatc aaactggtgt tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 180  
 tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaacaagg ttgttggtctg 240  
 gatgatatca actgctatga caggactgat tgtttagaaa aaaaagacag ccctgaagta 300  
 tatttttggt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg 360  
 gaagtcacac agcccacttc aatccagtt acacctaagc caccctatta caacatcctg 420  
 ctctattcct tgggtgccact tatgttaatt gcggggattg tcatttgtgc attttggtg 480  
 tacaggcatc acaagatggc ctaccctcct gtacttgttc caactcaaga cccaggacca 540  
 cccccacctt ctccattact agggttgaaa cactgcagt tattagaagt gaaagcaagg 600  
 ggaagatttg gttgtgtctg gaaagcccag ttgcttaacg aatatgtggc tgtcaaaata 660  
 tttccaatac aggacaaaca gtcattgcaa aatgaatagc aagtctacag tttgcctgga 720  
 atgaagcatg agaacatatt acagttcatt ggtgcagaaa aacgaggcac cagtgttgat 780  
 gtggatcttt ggctgatcac agcatttcat gaaaagggtt cactatcaga ctttcttaag 840  
 gctaatgtgg tctcttgtaa tgaactgtgt catattgcag aaacctggc tagaggattg 900  
 gcatatttac atgaggatat acctggccta aaagatggcc acaaacctgc catatctcac 960  
 agggacatca aaagtaaaaa tgtgtgtttg aaaaacaacc tgacagcttg cattgctgac 1020  
 tttgggttgg ccttaaaatt tgaggctggc aagtctgcag gcgatacca tggacaggtt 1080  
 ggtaccggga ggtacatggc tccagaggta ttagagggtg ctataaactt cgaaagggat 1140  
 gcatttttga ggatagatat gtatgcatg ggattagtcc tatgggaact ggcttctcgc 1200  
 tgtactgctg cagatggacc tgtagatgaa tacatgttgc catttgagga ggaaattggc 1260  
 cagcatccat ctcttgaaga catgcaggaa gttgttgtgc ataaaaaaaa gaggcctggt 1320

ttaagagatt attggcagaa acatgctgga atggcaatgc tctgtgaaac cattgaagaa 1380  
 tgttgggatc acgacgcaga agccaggta tcagctggat gtgtaggtga aagaattacc 1440  
 cagatgcaga gactaacaaa tattattacc acagaggaca ttgtaacagt ggtcacaatg 1500  
 gtgacaaatg ttgactttcc tcccaaagaa tctagtctat ga 1542

<210> 5

<211> 345

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<223> 人ActRIIA可溶性(胞外)多肽

<400> 5

atacttggtg gatcagaaac tcaggagtgt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 60  
 agaaccaatc aaactggtgt tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 120  
 tttgctacct ggaagaatat ttctggttcc attgaaatag tgaacaagg ttgttggtg 180  
 gatgatatca actgctatga caggactgat tgtgtagaaa aaaaagacag ccctgaagta 240  
 tatttttgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt tttcttattt tccagagatg 300  
 gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaagc caccc 345

<210> 6

<211> 225

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体 - 包含与Fc结构域融合的ActRIIA的可溶性胞外域的融合蛋白

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (43) .. (43)

<223> Asp或Ala

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (100) .. (100)

<223> Lys或Ala

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (212) .. (212)

<223> Asn或Ala

<400> 6

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser



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

<210> 8

<211> 21

<212> PRT

<213> 意蜂

<220>

<223> 蜜蜂蜂毒肽的前导

<400> 8

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile

1                    5                    10                    15

Ser Tyr Ile Tyr Ala

20

<210> 9

<211> 22

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 组织纤溶酶原激活物 (TPA) 的前导

<400> 9

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly

1                    5                    10                    15

Ala Val Phe Val Ser Pro

20

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 天然ActRIIA前导

<400> 10

Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys

1                    5                    10                    15

Ser Ser Gly Ala

20

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体 - ActRIIA-hFc和ActRIIA-mFc N端序列





145	150	155	160
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
	165	170	175
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
	180	185	190
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
	195	200	205
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
	210	215	220
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
225	230	235	240
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys			
	245	250	255
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
	260	265	270
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			
	275	280	285
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
	290	295	300
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu			
305	310	315	320
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys			
	325	330	335
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
	340	345	350
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	355	360	365

Lys

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 1114

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体 - 编码具有TPA前导序列的未加工的ActRIIA-hFc的核酸序列

&lt;400&gt; 14

```

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt 60
tcgccccggcg ccgctatact tggtagatca gaaactcagg agtgtctttt tttaatgcta 120
attgggaaaa agacagaacc aatcaaactg gtgttgaacc gtgttatggt gacaaagata 180
aacggcggca ttgttttgc tacctggaaga atatttctgg ttccattgaa tagtgaaca 240

```

aggttggtgg ctggatgata tcaactgcta tgacaggact gattgtgtag aaaaaaaga 300  
 cagccctgaa gtatatcttct gttgctgtga gggcaatatg tgtaatgaaa agttttctta 360  
 ttttccggag atggaagtca cacagcccac ttcaaatcca gttacaccta agccaccac 420  
 cggtggtgga actcacacat gccaccctg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc 480  
 agtcttcctc ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt 540  
 cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt 600  
 ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac 660  
 gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta 720  
 caagtgcaag gtctccaaca aagcctccc agtcccctc gagaaaacca tctccaaagc 780  
 caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac 840  
 caagaaccag gtcagcctga cctgctggt caaagcttc tatcccagcg acatcgccgt 900  
 ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgctc ccgtgctgga 960  
 ctccgacggc tccttcttcc tctatagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca 1020  
 ggggaacgtc ttctcatget ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa 1080  
 gagcctctcc ctgtctccgg gtaaagaga attc 1114

<210> 15

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体 - 具有EC结构域N端6个氨基酸缺失和EC结构域C端4个氨基酸缺失 (SEQ ID NO:28的氨基酸25-130) 和具有L79D突变的人ActRIIB可溶性(胞外)加工的多肽序列

<400> 15

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

<210> 16



260	265	270
Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys		
275	280	285
His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp		
290	295	300
Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg		
305	310	315
Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val		
	325	330
Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro		
	340	345
Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu		
	355	360
Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile		
	370	375
Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys		
385	390	395
Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu		
	405	410
Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val		
	420	425
His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro		
	435	440
Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp		
	450	455
Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu		
465	470	475
Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu		
	485	490
Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile		
	500	505
		510
<210> 17		
<211> 116		
<212> PRT		
<213> 智人		
<220>		
<223> 人ActRIIB可溶性(胞外), 加工的多肽		
<400> 17		
Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala		

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

<210> 18

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> C端15个氨基酸缺失的人ActRIIB可溶性(胞外)加工的多肽序列

<400> 18

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

<210> 19

<211> 1539

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<223> 人ActRIIB (A64) 前体

<400> 19

```

atgacggcgc cctgggtggc cctcgccctc ctctggggat cgctgtggcc cggctctggg 60
cgtggggagg ctgagacacg ggagtgcac tactacaacg ccaactggga gctggagcgc 120
accaaccaga gcggcctgga gcgctgcgaa ggcgagcagg acaagcggct gcaactgctac 180
gcctcctggg ccaacagctc tggcaccatc gagctcgtga agaagggctg ctggctagat 240
gacttcaact gctacgatag gcaggagtgt gtggccactg aggagaacct ccagggtgtac 300
ttctgctgct gtgaaggcaa cttctgcaac gacgcttca ctcatctgcc agaggctggg 360
ggccccgaag tcacgtacga gccacccccg acagccccca cctgtctcac ggtgctggcc 420
tactcaactg tgcccatcgg gggcctttcc ctcatcgtcc tgctggcctt ttggatgtac 480
cggcatcgca agcccccta cggtcattgt gacatccatg aggacctgg gcctccacca 540
ccatcccctc tgggtggcct gaagccactg cagctgctgg agatcaaggc tcgggggcgc 600
tttggtgtg tctggaaggc ccagctcatg aatgactttg tagctgtcaa gatcttccca 660
ctccaggaca agcagtcgtg gcagagtga cgggagatct tcagcacacc tggcatgaag 720
cacgagaacc tgctacagtt cattgctgcc gagaagcgag gctccaacct cgaagtagag 780
ctgtggctca tcacggcctt ccatgacaag ggctccctca cggattacct caagggaac 840
atcatcacat ggaacgaact gtgtcatgta gcagagacga tgtcacgagg cctctcatac 900
ctgcatgagg atgtgccctg gtgccgtggc gagggccaca agccgtctat tgcccacagg 960
gactttaaaa gtaagaatgt attgctgaag agcgacctca cagccgtgct ggctgacttt 1020
ggcttggctg ttcgatttga gccaggaaa cctccagggg acaccacgg acaggtaggc 1080
acgagacggg acatggctcc tgaggtgctc gagggagcca tcaactcca gagagatgcc 1140
ttcctgcgca ttgacatgta tgccatgggg ttggtgctgt gggagcttgt gtctcgtgc 1200
aaggctgcag acggaccctg ggatgagtac atgctgcctt ttgaggaaga gattggccag 1260
cacccttcgt tggaggagct gcaggaggtg gtggtgcaca agaagatgag gccaccatt 1320
aaagatcact ggttgaacaa cccgggcctg gccagcttt gtgtgacct cgaggagtgc 1380
tgggacctat atgcagagcg tcgcttgctc gcgggctgtg tggaggagcg ggtgtccctg 1440
attcggaggc cggtaaacgg cactacctcg gactgtctcg tttccctggt gacctctgtc 1500
accaatgtgg acctgcccc taaagagtca agcatctaa 1539

```

<210> 20

<211> 344

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体 - 包含与Fc结构域融合的ActRIIB的可溶性胞外域的融合蛋白

<400> 20

Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala

1

5

10

15

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





<213> 人工序列

<220>

<223> 人ActRIIB可溶性(胞外), 其EC结构域N端6个氨基酸缺失和EC结构域3个氨基酸缺失并具有L79D突变的人ActRIIB可溶性(胞外)加工的多肽

<400> 23

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

<210> 24

<211> 360

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 其EC结构域N端6个氨基酸缺失和EC结构域3个氨基酸缺失并具有L79D突变和具有TPA前导序列的未加工的ActRIIB-Fc融合蛋白

<400> 24

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

Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu			
100	105	110	
Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu			
115	120	125	
Pro Pro Pro Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala			
130	135	140	
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro			
145	150	155	160
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val			
165	170	175	
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val			
180	185	190	
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
195	200	205	
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln			
210	215	220	
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala			
225	230	235	240
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
245	250	255	
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr			
260	265	270	
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
275	280	285	
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr			
290	295	300	
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr			
305	310	315	320
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe			
325	330	335	
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys			
340	345	350	
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
355	360		
<210> 25			
<211> 335			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			

<223> 其EC结构域N端6个氨基酸缺失和EC结构域C端3个氨基酸缺失并具有L79D突变的加工的ActRIIB-Fc融合蛋白

<400> 25

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

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 290 295 300

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 305 310 315 320

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330 335

<210> 26

<211> 115

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 人ActRIIB可溶性(胞外)加工的多肽

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

Ala Pro Thr  
 115

<210> 27

<211> 100

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 其C端15个氨基酸缺失的人ActRIIB可溶性(胞外)加工的多肽序列

<400> 27

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

Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly

	20		25		30														
Glu	Gln	Asp	Lys	Arg	Leu	His	Cys	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala	Asn	Ser	Ser				
	35						40					45							
Gly	Thr	Ile	Glu	Leu	Val	Lys	Lys	Gly	Cys	Trp	Leu	Asp	Asp	Phe	Asn				
	50						55					60							
Cys	Tyr	Asp	Arg	Gln	Glu	Cys	Val	Ala	Thr	Glu	Glu	Asn	Pro	Gln	Val				
65					70					75					80				
Tyr	Phe	Cys	Cys	Cys	Glu	Gly	Asn	Phe	Cys	Asn	Glu	Arg	Phe	Thr	His				
					85					90					95				
Leu	Pro	Glu	Ala																
					100														
<210>	28																		
<211>	512																		
<212>	PRT																		
<213>	智人																		
<220>																			
<223>	人ActRIIB前体蛋白																		
<400>	28																		
Met	Thr	Ala	Pro	Trp	Val	Ala	Leu	Ala	Leu	Leu	Trp	Gly	Ser	Leu	Trp				
1				5					10					15					
Pro	Gly	Ser	Gly	Arg	Gly	Glu	Ala	Glu	Thr	Arg	Glu	Cys	Ile	Tyr	Tyr				
				20					25					30					
Asn	Ala	Asn	Trp	Glu	Leu	Glu	Arg	Thr	Asn	Gln	Ser	Gly	Leu	Glu	Arg				
				35					40					45					
Cys	Glu	Gly	Glu	Gln	Asp	Lys	Arg	Leu	His	Cys	Tyr	Ala	Ser	Trp	Arg				
				50					55					60					
Asn	Ser	Ser	Gly	Thr	Ile	Glu	Leu	Val	Lys	Lys	Gly	Cys	Trp	Leu	Asp				
65					70					75					80				
Asp	Phe	Asn	Cys	Tyr	Asp	Arg	Gln	Glu	Cys	Val	Ala	Thr	Glu	Glu	Asn				
					85					90					95				
Pro	Gln	Val	Tyr	Phe	Cys	Cys	Cys	Glu	Gly	Asn	Phe	Cys	Asn	Glu	Arg				
				100					105					110					
Phe	Thr	His	Leu	Pro	Glu	Ala	Gly	Gly	Pro	Glu	Val	Thr	Tyr	Glu	Pro				
				115					120					125					
Pro	Pro	Thr	Ala	Pro	Thr	Leu	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Tyr	Ser	Leu	Leu				
				130					135					140					
Pro	Ile	Gly	Gly	Leu	Ser	Leu	Ile	Val	Leu	Leu	Ala	Phe	Trp	Met	Tyr				
145					150					155					160				
Arg	His	Arg	Lys	Pro	Pro	Tyr	Gly	His	Val	Asp	Ile	His	Glu	Asp	Pro				

	165		170		175
Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu					
	180		185		190
Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln					
	195		200		205
Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys					
	210		215		220
Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys					
225		230		235	240
His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn					
	245		250		255
Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser					
	260		265		270
Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys					
	275		280		285
His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp					
	290		295		300
Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg					
305		310		315	320
Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val					
	325		330		335
Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro					
	340		345		350
Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu					
	355		360		365
Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile					
	370		375		380
Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys					
385		390		395	400
Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu					
	405		410		415
Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val					
	420		425		430
His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro					
	435		440		445
Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp					
	450		455		460
Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu					
465		470		475	480

Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu  
 485 490 495

Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile  
 500 505 510

<210> 29

<211> 116

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 人ActRIIB可溶性(胞外)加工的多肽

<400> 29

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ala Pro Thr  
 115

<210> 30

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 其C端15个氨基酸缺失的人ActRIIB可溶性(胞外)加工的多肽

<400> 30

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

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

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

	35		40		45														
Ser	Gly	Thr	Ile	Glu	Leu	Val	Lys	Lys	Gly	Cys	Trp	Leu	Asp	Asp	Phe				
	50						55				60								
Asn	Cys	Tyr	Asp	Arg	Gln	Glu	Cys	Val	Ala	Thr	Glu	Glu	Asn	Pro	Gln				
65					70					75					80				
Val	Tyr	Phe	Cys	Cys	Cys	Glu	Gly	Asn	Phe	Cys	Asn	Glu	Arg	Phe	Thr				
			85						90						95				
His	Leu	Pro	Glu	Ala															

<210> 31

<211> 115

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 人ActRIIB可溶性(胞外), 加工的多肽

<400> 31

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

<210> 32

<211> 100

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 其C端15个氨基酸缺失的人ActRIIB可溶性(胞外)加工的多肽序列

<400> 32



<213> 人工序列

<220>

<223> 其EC结构域N端6个氨基酸缺失和EC结构域C端3个氨基酸缺失并具有L79D突变和具有TPA前导序列未加工的ActRIIB-Fc融合蛋白

<400> 34

```

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

```

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 275 280 285  
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 290 295 300  
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 305 310 315 320  
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 325 330 335  
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 340 345 350  
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 355 360

<210> 35

<211> 335

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 其EC结构域N端6个氨基酸缺失和EC结构域C端3个氨基酸缺失并具有L79D突变的加工的ActRIIB-Fc融合蛋白

<400> 35

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

145	150	155	160
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
	165	170	175
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
	180	185	190
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys			
	195	200	205
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile			
	210	215	220
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro			
225	230	235	240
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu			
	245	250	255
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn			
	260	265	270
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser			
	275	280	285
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg			
	290	295	300
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu			
305	310	315	320
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	325	330	335

<210> 36

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有L79D突变的人ActRIIB可溶性(胞外)加工的多肽序列

<400> 36

Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn			
1	5	10	15
Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly			
	20	25	30
Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser			
	35	40	45
Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Asp Asp Asp Phe Asn			
	50	55	60
Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val			



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





115	120	125
Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Gly Gly Gly Thr		
130	135	140
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser		
145	150	155
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
165	170	175
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
180	185	190
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
195	200	205
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
210	215	220
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
225	230	235
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
245	250	255
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
260	265	270
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
275	280	285
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
290	295	300
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
305	310	315
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
325	330	335
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
340	345	350
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
355	360	365

<210> 41

<211> 368

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 与Fc结构域融合的具有L79D突变和具有TPA前导序列的人ActRIIB可溶性(胞外)加工的多肽序列

<400> 41

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

305	310	315	320
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser			
	325	330	335
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
	340	345	350
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	355	360	365

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 具有变异C端序列的人ActRIIB可溶性(胞外)加工的多肽序列

&lt;400&gt; 42

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

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 具有带L79D突变的变异C端序列的人ActRIIB可溶性(胞外)加工的多肽序列

&lt;400&gt; 43

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

<210> 44

<211> 370

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 用TGGG接头与Fc结构域融合的具有带L79D突变的变异C端序列的人ActRIIB可溶性(胞外)加工的多肽序列

<400> 44

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

100	105	110
Pro Ser Gly Gly Pro Glu Ala Thr Ala Ala Ala Gly Asp Gln Gly Ser		
115	120	125
Gly Ala Leu Trp Leu Cys Leu Glu Gly Pro Ala His Glu Thr Gly Gly		
130	135	140
Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
145	150	155
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
165	170	175
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
180	185	190
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
195	200	205
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
210	215	220
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
225	230	235
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
245	250	255
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
260	265	270
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
275	280	285
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
290	295	300
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
305	310	315
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
325	330	335
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
340	345	350
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
355	360	365
Gly Lys		
370		
<210> 45		
<211> 1083		
<212> DNA		
<213> 人工序列		

<220>

<223> 其EC结构域N端6个氨基酸缺失和EC结构域C端3个氨基酸缺失并具有L79D突变和TPA前导序列的未加工的ActRIIB-Fc融合蛋白

<400> 45

```

atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60
tcgcccggcg ccgccgaaac ccgcgaatgt atttattaca atgctaattg ggaactcgaa 120
cggacgaacc aatccgggct cgaacggtgt gagggggaac aggataaacg cctccattgc 180
tatgcgtcgt ggaggaactc ctccgggacg attgaactgg tcaagaaagg gtgctgggac 240
gacgatttca attgttatga ccgccaggaa tgtgtcgcga ccgaagagaa tccgcaggtc 300
tattttctgtt gttgcgaggg gaattttctgt aatgaacggt ttaccacact ccccgaagcc 360
ggcgggcccc aggtgacctg tgaacccccg cccaccggtg gtggaactca cacatgcccc 420
ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tectcttccc cccaaaacct 480
aaggacacct tcatgatctc ccggaccctc gaggtccatc gcgtgggtgt ggacgtgagc 540
cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 600
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtgggtcag cgtctctacc 660
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gactacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 720
ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 780
gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 840
ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccc 900
gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcett ctctctctat 960
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1020
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa 1080
tga 1083

```

<210> 46

<211> 344

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 包含与Fc结构域融合的ActRIIB的可溶性胞外域的融合蛋白

<400> 46

```

Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala
1           5           10           15
Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu
           20           25           30
Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser
           35           40           45
Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe
           50           55           60
Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln

```

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

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 329

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

<220>

<223> 包含与Fc结构域融合的其C端15个氨基酸缺失的可溶性ActRIIB的胞外域 (R64) 的融合蛋白

<400> 47

```

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

```

275	280	285
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val		
290	295	300
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln		
305	310	315
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325		
<210> 48		
<211> 407		
<212> PRT		
<213> 未知		
<220>		
<223> 全长未加工的前体蛋白GDF11 (GDF11前蛋白质)		
<400> 48		
Met Val Leu Ala Ala Pro Leu Leu Leu Gly Phe Leu Leu Leu Ala Leu		
1	5	10
Glu Leu Arg Pro Arg Gly Glu Ala Ala Glu Gly Pro Ala Ala Ala Ala		
	20	25
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Val Gly Gly Glu Arg Ser		
	35	40
Ser Arg Pro Ala Pro Ser Val Ala Pro Glu Pro Asp Gly Cys Pro Val		
	50	55
Cys Val Trp Arg Gln His Ser Arg Glu Leu Arg Leu Glu Ser Ile Lys		
65	70	75
Ser Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Lys Glu Ala Pro Asn Ile Ser		
	85	90
Arg Glu Val Val Lys Gln Leu Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Gln Gln		
	100	105
Ile Leu Asp Leu His Asp Phe Gln Gly Asp Ala Leu Gln Pro Glu Asp		
	115	120
Phe Leu Glu Glu Asp Glu Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr Val Ile Ser		
	130	135
Met Ala Gln Glu Thr Asp Pro Ala Val Gln Thr Asp Gly Ser Pro Leu		
145	150	155
Cys Cys His Phe His Phe Ser Pro Lys Val Met Phe Thr Lys Val Leu		
	165	170
Lys Ala Gln Leu Trp Val Tyr Leu Arg Pro Val Pro Arg Pro Ala Thr		
	180	185
Val Tyr Leu Gln Ile Leu Arg Leu Lys Pro Leu Thr Gly Glu Gly Thr		

195	200	205
Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly	Arg Arg His Ile	Arg Ile Arg Ser Leu
210	215	220
Lys Ile Glu Leu His Ser Arg	Ser Gly His Trp Gln Ser	Ile Asp Phe
225	230	235
Lys Gln Val Leu His Ser Trp	Phe Arg Gln Pro Gln Ser	Asn Trp Gly
245	250	255
Ile Glu Ile Asn Ala Phe Asp	Pro Ser Gly Thr Asp Leu	Ala Val Thr
260	265	270
Ser Leu Gly Pro Gly Ala Glu	Gly Leu His Pro Phe Met	Glu Leu Arg
275	280	285
Val Leu Glu Asn Thr Lys Arg	Ser Arg Arg Asn Leu Gly	Leu Asp Cys
290	295	300
Asp Glu His Ser Ser Glu Ser	Arg Cys Cys Arg Tyr Pro	Leu Thr Val
305	310	315
Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp	Asp Trp Ile Ile Ala Pro	Lys Arg Tyr
325	330	335
Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly	Gln Cys Glu Tyr Met Phe	Met Gln Lys
340	345	350
Tyr Pro His Thr His Leu Val	Gln Gln Ala Asn Pro Arg	Gly Ser Ala
355	360	365
Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr	Lys Met Ser Pro Ile Asn	Met Leu Tyr
370	375	380
Phe Asn Asp Lys Gln Gln Ile	Ile Tyr Gly Lys Ile Pro	Gly Met Val
385	390	395
Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser		
405		

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 1221

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 未知

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 全长未加工的前体蛋白GDF11 (GDF11前蛋白质)

&lt;400&gt; 49

```

atggtgctcg cggccccgct gctgctgggc ttctgctcc tcgccctgga gctgcgcccc 60
cgggggggagg cggccgaggg ccccgcgggc gcggcgggcg cggcgggcggc ggcggcagcg 120
gcggggggtcg ggggggagcg ctccagcccg ccagccccgt ccgtggcgcc cgagccggac 180
ggctgccccg tgtgcgtttg gcggcagcac agcccgagac tgcgcctaga gagcatcaag 240
tcgcagatct tgagcaaact gcggctcaag gaggcgcccc acatcagccg cgaggtggtg 300

```

aagcagctgc tgcccaaggc gccgccctg cagcagatcc tggacctaca cgacttccag 360  
 ggcgacgcgc tcagccccga ggacttctg gaggaggacg agtaccacgc caccaccgag 420  
 accgtcatta gcatggccca ggagacggac ccagcagtac agacagatgg cagccctctc 480  
 tgctgccatt ttcacttcag ccccaagggtg atgttcacaa aggtactgaa ggcccagctg 540  
 tgggtgtacc tacggcctgt accccgccc gccacagtct acctgcagat cttgcgacta 600  
 aaaccctaa ctggggaagg gaccgcagg ggagggggcg gaggccggcg tcacatccgt 660  
 atccgctcac tgaagattga gctgcaactca cgctcaggcc attggcagag catcgacttc 720  
 aagcaagtgc tacacagctg gttccgccag ccacagagca actggggcat cgagatcaac 780  
 gcctttgatc ccagtggcac agacctggct gtcacctccc tggggccggg agccgagggg 840  
 ctgcatccat tcatggagct tcgagtecta gagaacacaa aacgttcccg gcggaacctg 900  
 ggtctggact gcgacgagca ctcaagcgag tcccgtctg gccgatatcc cctcacagtg 960  
 gactttgagg ctttcggetg ggactggatc atcgcaccta agcgtacaa ggccaactac 1020  
 tgctccggcc agtgcgagta catgttcatg caaaaatata cgcatacca tttggtgcag 1080  
 caggccaatc caagaggetc tgctgggccc tgttgtacc ccaccaagat gtcccacatc 1140  
 aacatgctct acttcaatga caagcagcag attatctac gcaagatccc tggcatggtg 1200  
 gtggatcgt gtggctgctc t 1221

<210> 50

<211> 274

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 人GDF11蛋白的GDF11前肽

<400> 50

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

Val Gln Thr Asp Gly Ser Pro Leu Cys Cys His Phe His Phe Ser Pro  
 130 135 140  
 Lys Val Met Phe Thr Lys Val Leu Lys Ala Gln Leu Trp Val Tyr Leu  
 145 150 155 160  
 Arg Pro Val Pro Arg Pro Ala Thr Val Tyr Leu Gln Ile Leu Arg Leu  
 165 170 175  
 Lys Pro Leu Thr Gly Glu Gly Thr Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg  
 180 185 190  
 Arg His Ile Arg Ile Arg Ser Leu Lys Ile Glu Leu His Ser Arg Ser  
 195 200 205  
 Gly His Trp Gln Ser Ile Asp Phe Lys Gln Val Leu His Ser Trp Phe  
 210 215 220  
 Arg Gln Pro Gln Ser Asn Trp Gly Ile Glu Ile Asn Ala Phe Asp Pro  
 225 230 235 240  
 Ser Gly Thr Asp Leu Ala Val Thr Ser Leu Gly Pro Gly Ala Glu Gly  
 245 250 255  
 Leu His Pro Phe Met Glu Leu Arg Val Leu Glu Asn Thr Lys Arg Ser  
 260 265 270

Arg Arg

<210> 51

<211> 822

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<223> 人GDF11蛋白的GDF11前肽

<400> 51

gccgagggcc ccgcggcggc ggcggcggcg gcggcggcgg cggcagcggc gggggtcggg 60  
 ggggagcgct ccagccggcc agccccgtcc gtggcgcccg agccggacgg ctgccccgtg 120  
 tgcgtttggc ggcagcacag ccgcgagctg cgcctagaga gcatcaagtc gcagatcttg 180  
 agcaaaactgc ggctcaagga ggcgccaac atcagcccg aggtggtgaa gcagctgctg 240  
 cccaaggcgc cgccgctgca gcagatcctg gacctacag acttccaggg cgacgcgctg 300  
 cagcccgagg acttctgga ggaggacgag taccacgcca ccaccgagac cgtcattagc 360  
 atggcccagg agacggacc agcagtacag acagatggca gccctctctg ctgccatttt 420  
 cacttcagcc ccaagtgat gttcaciaaag gtactgaagg ccagctgtg ggtgtaccta 480  
 cggcctgtac cccgcccagc cacagtctac ctgcagatct tgcgactaaa acccctaact 540  
 ggggaagggg ccgcaggggg agggggcgga ggccggcgtc acatccgtat ccgctcactg 600  
 aagattgagc tgcactcacg ctcaggccat tggcagagca tcgacttcaa gcaagtgcta 660  
 cacagctggt tccgccagcc acagagcaac tggggcatcg agatcaacgc ctttgatccc 720  
 agtggcacag acctggctgt cacctcctg gggccgggag ccgaggggct gcatccattc 780



图 1A

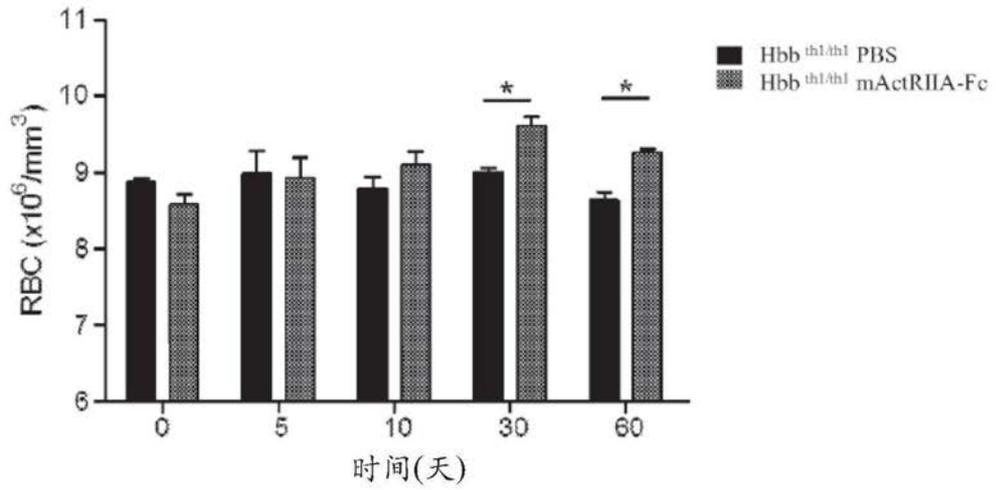


图 1B

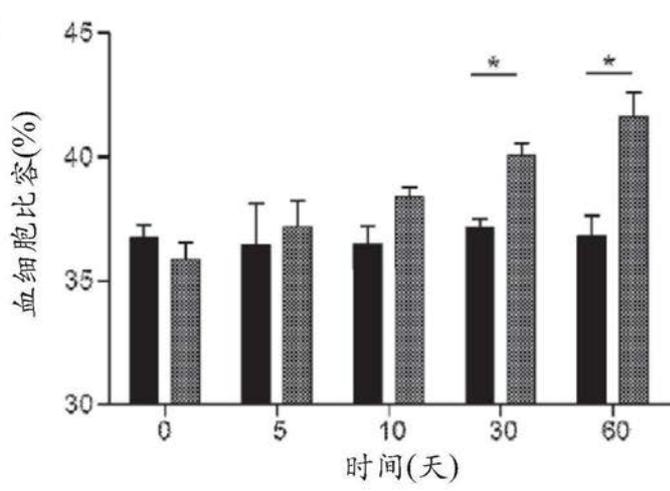


图 1C

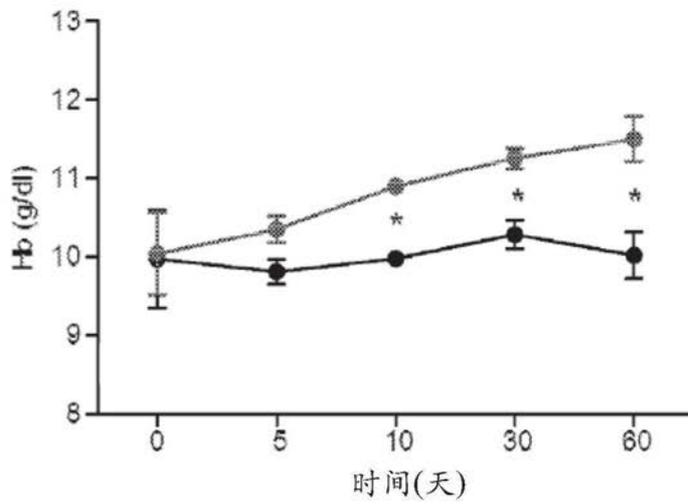


图 1D

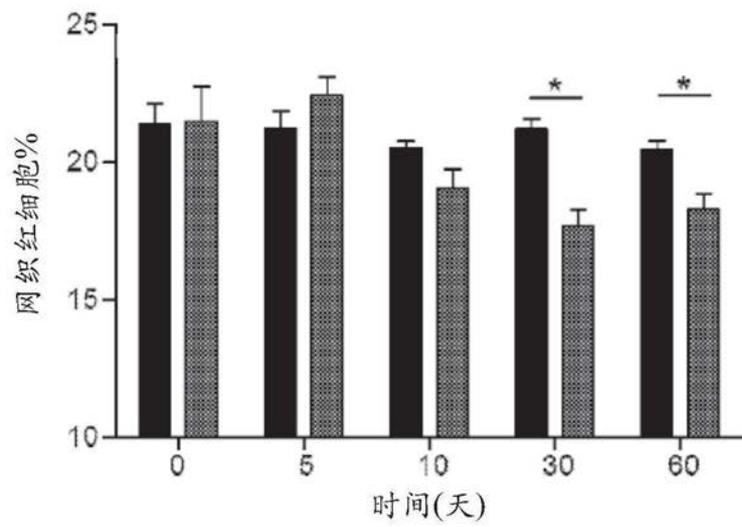
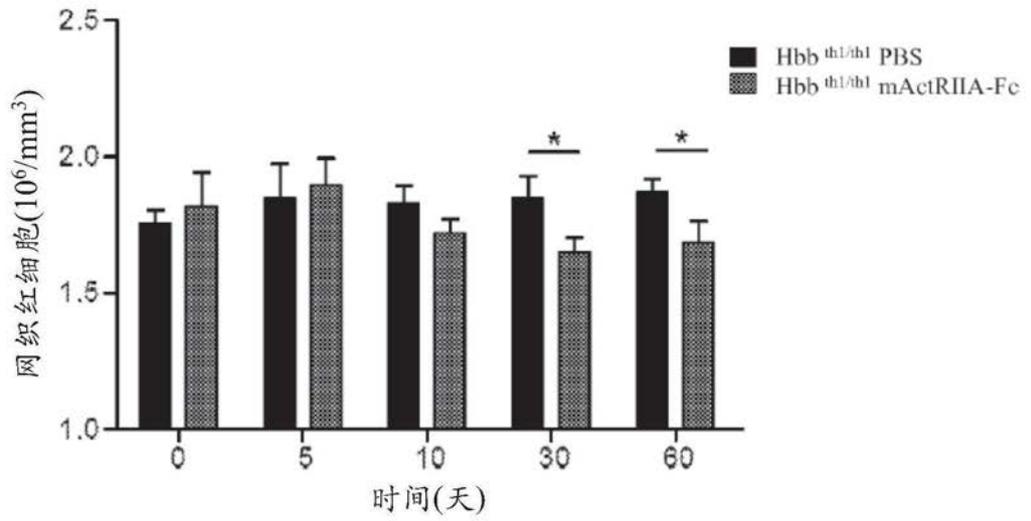


图 1E

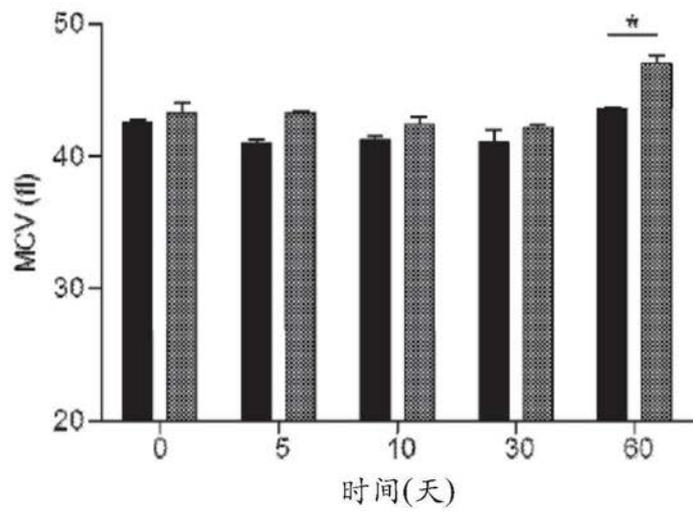


图 1F

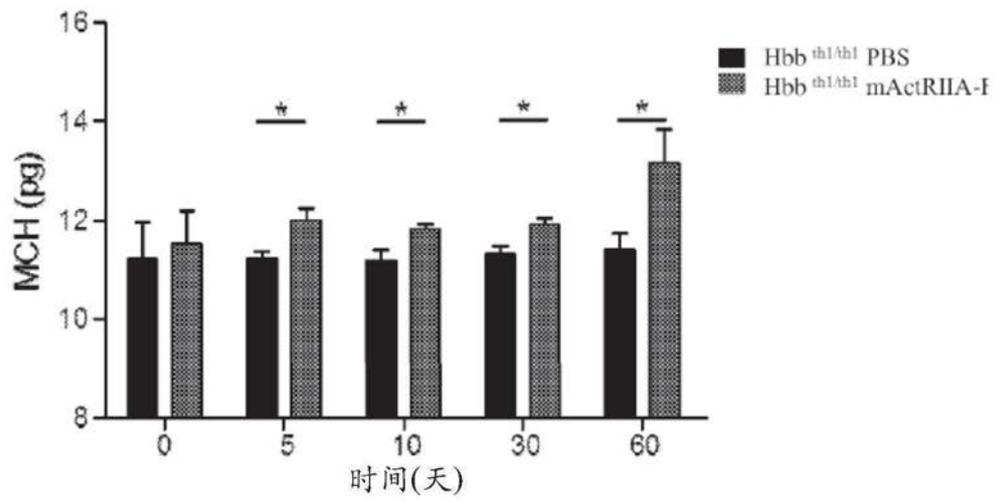


图 1G

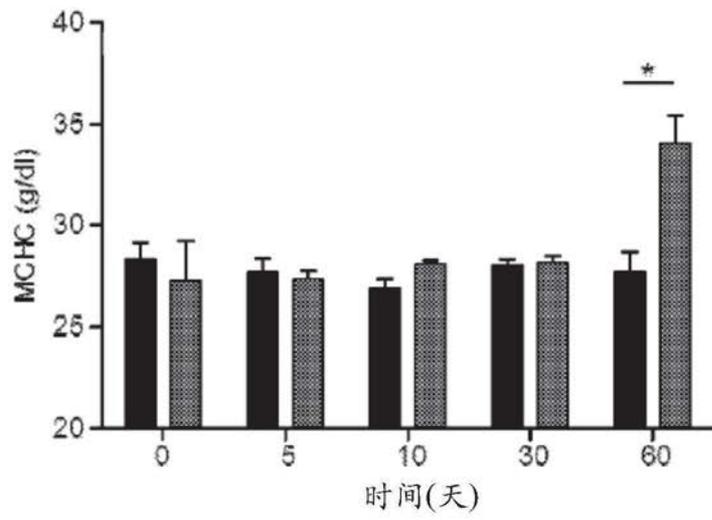
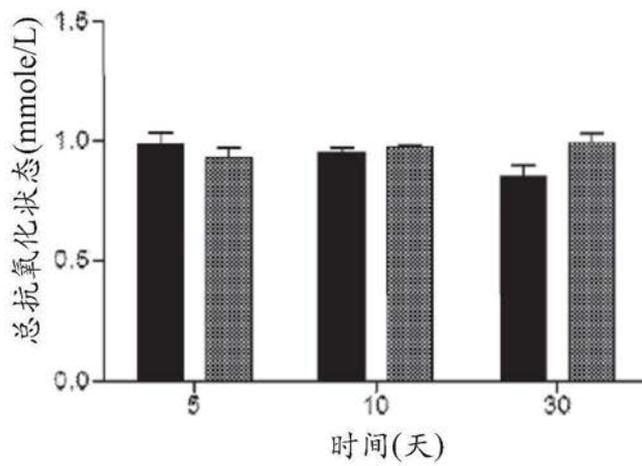


图 1H



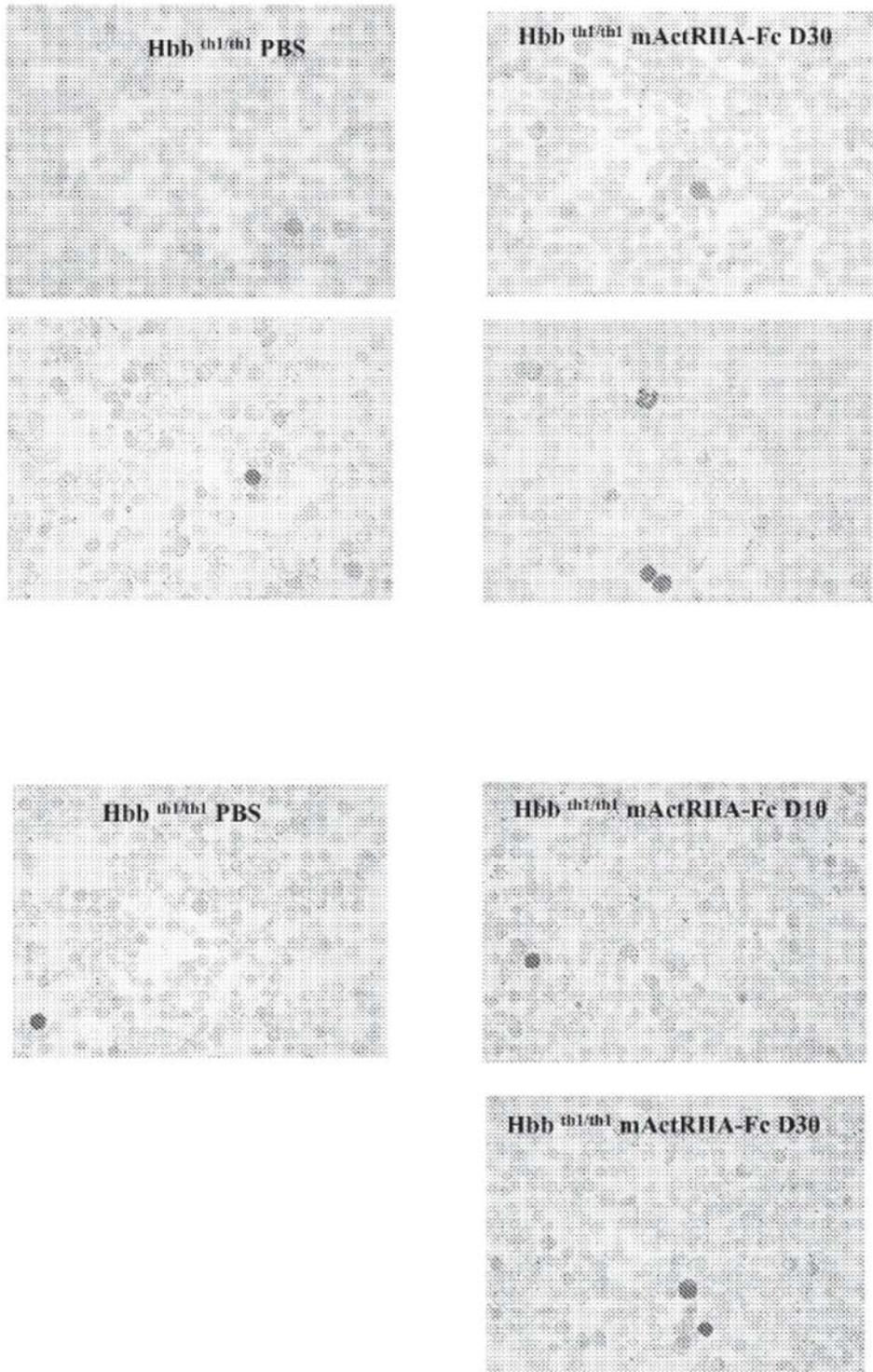


图1I

图 1J

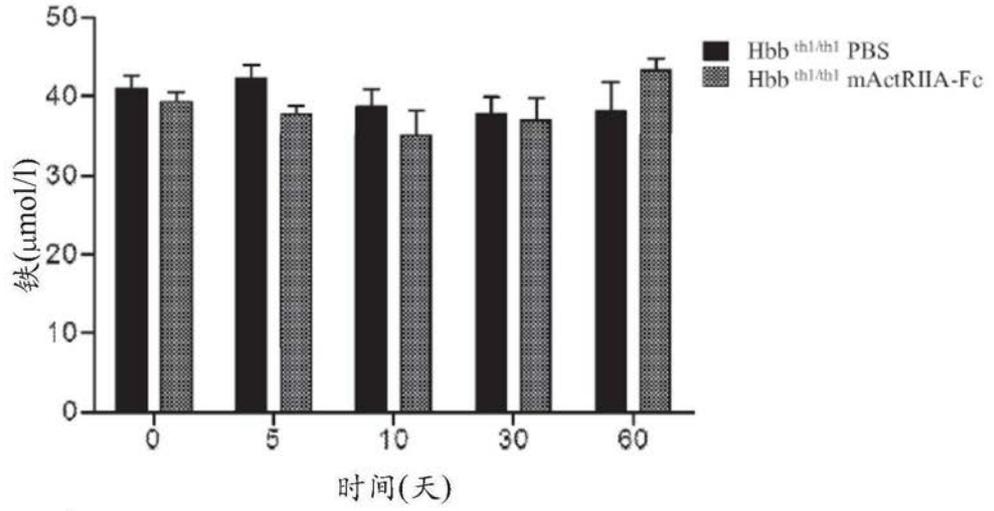


图 1K

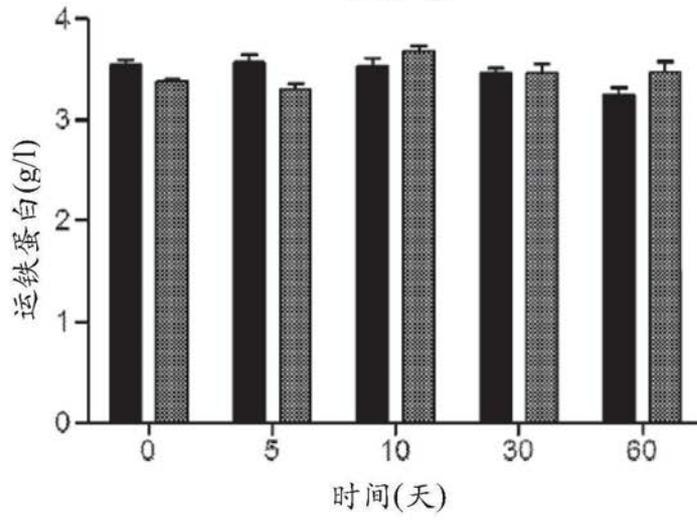
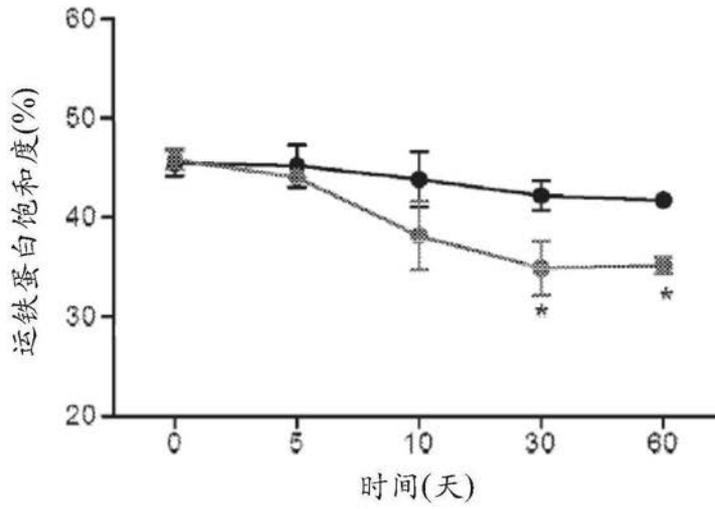


图 1L



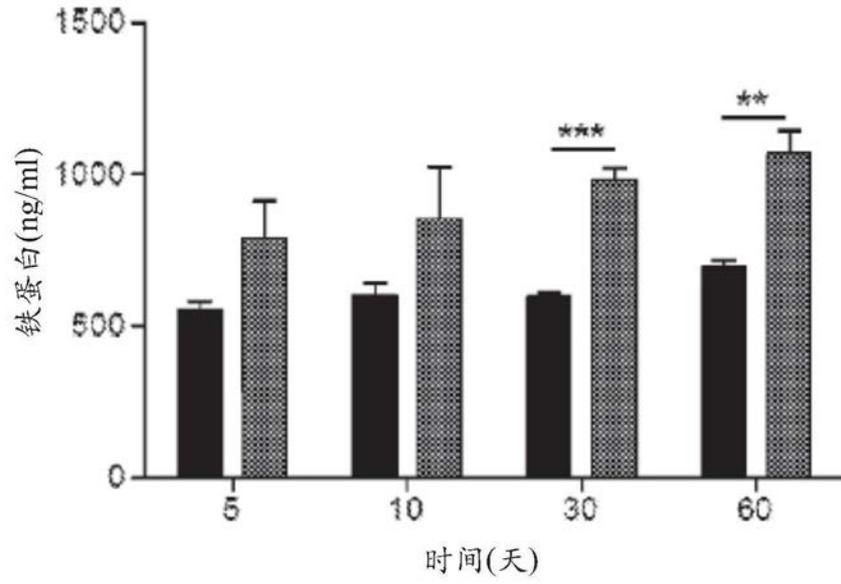


图1M

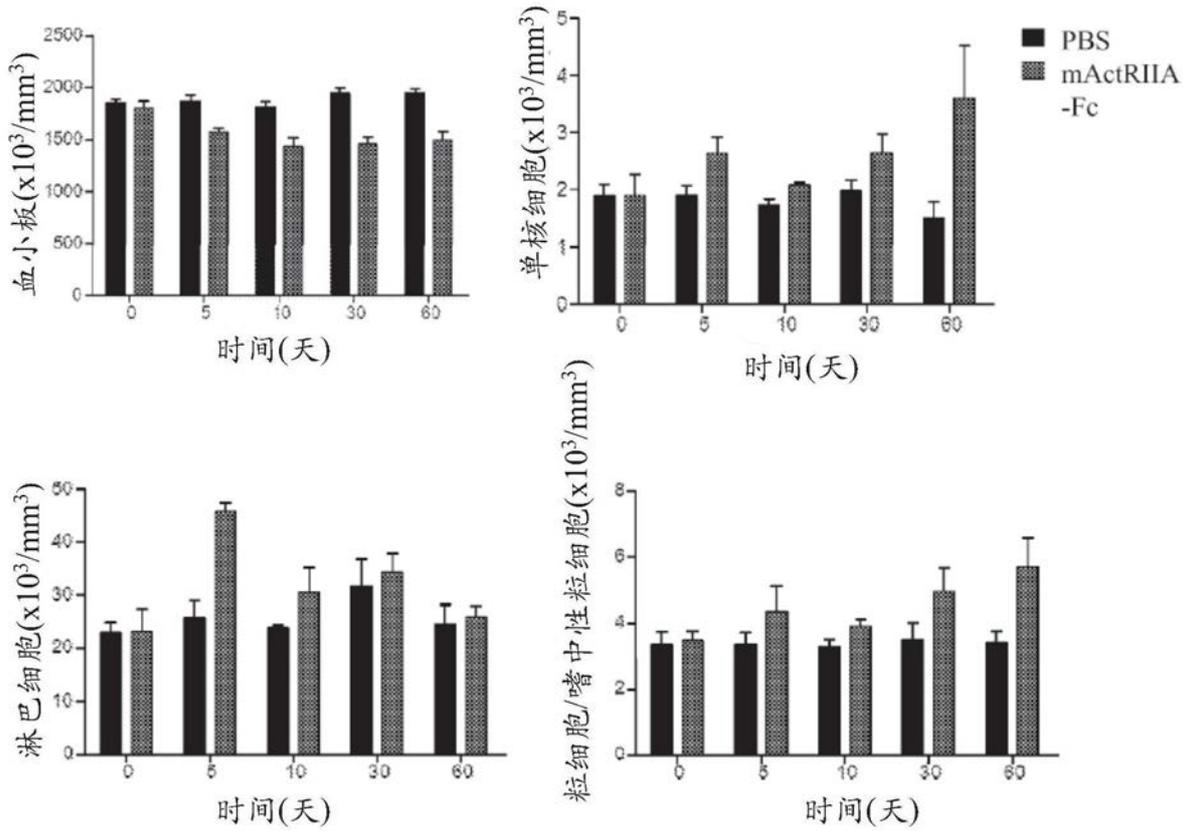


图1N

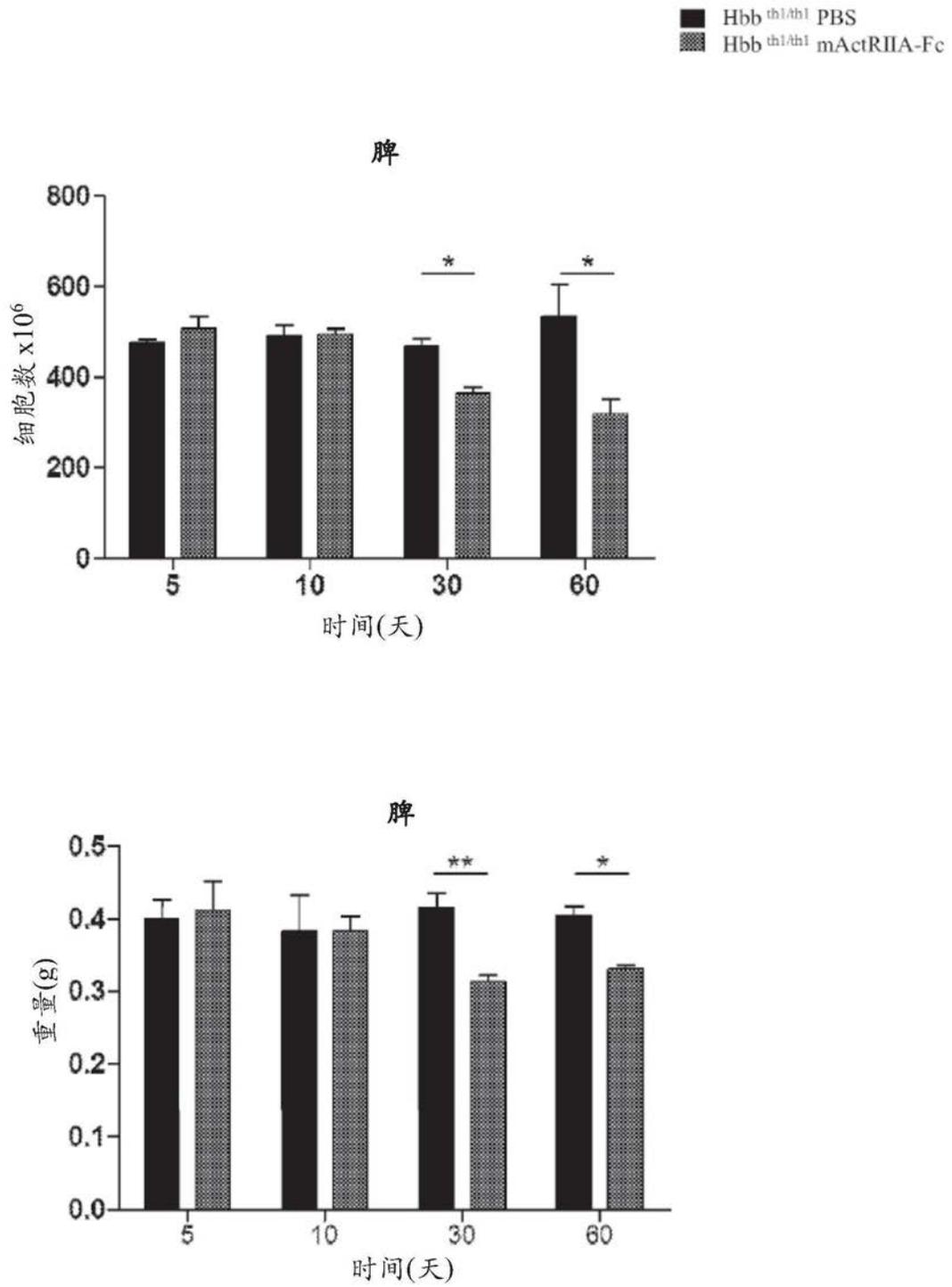


图10

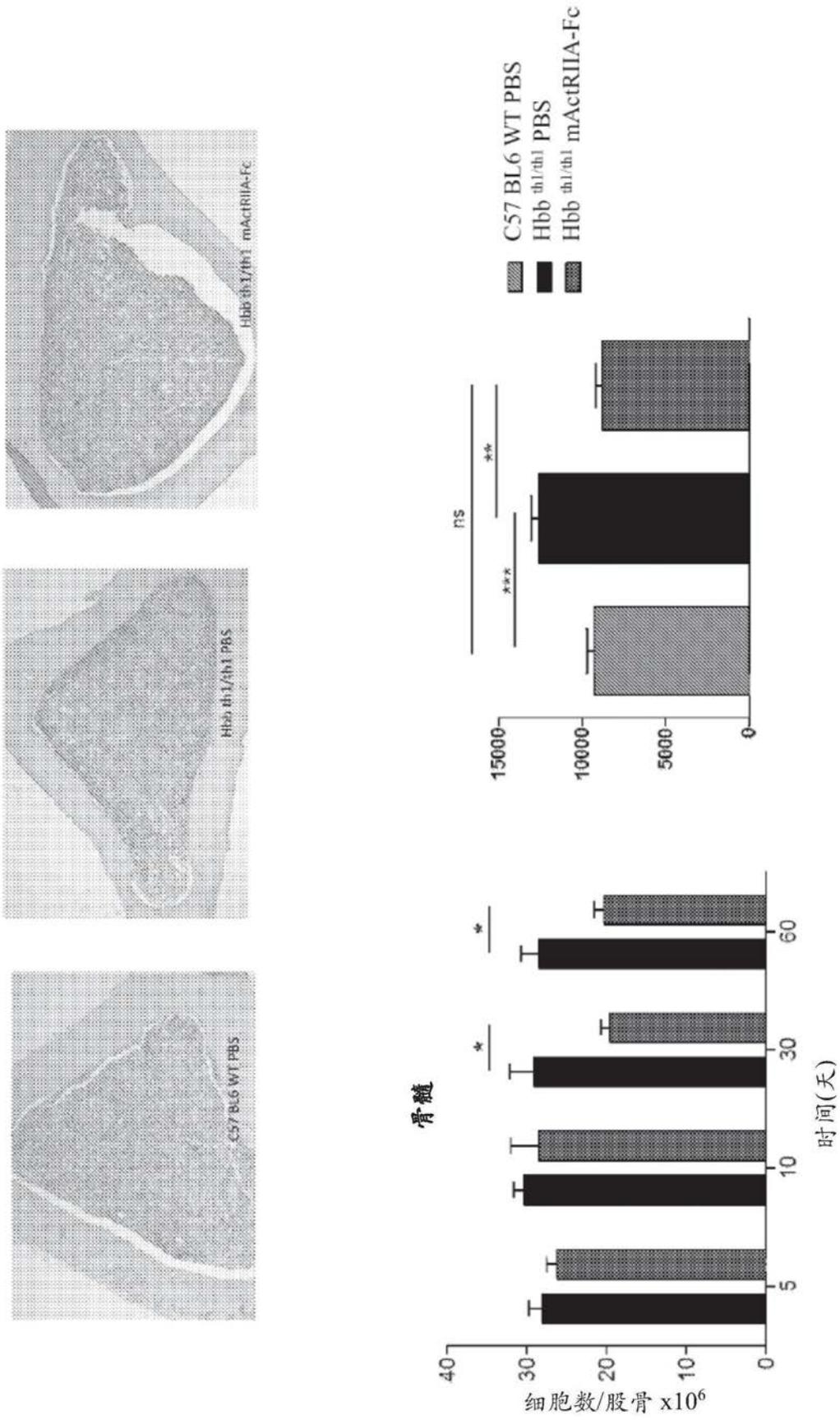


图1P

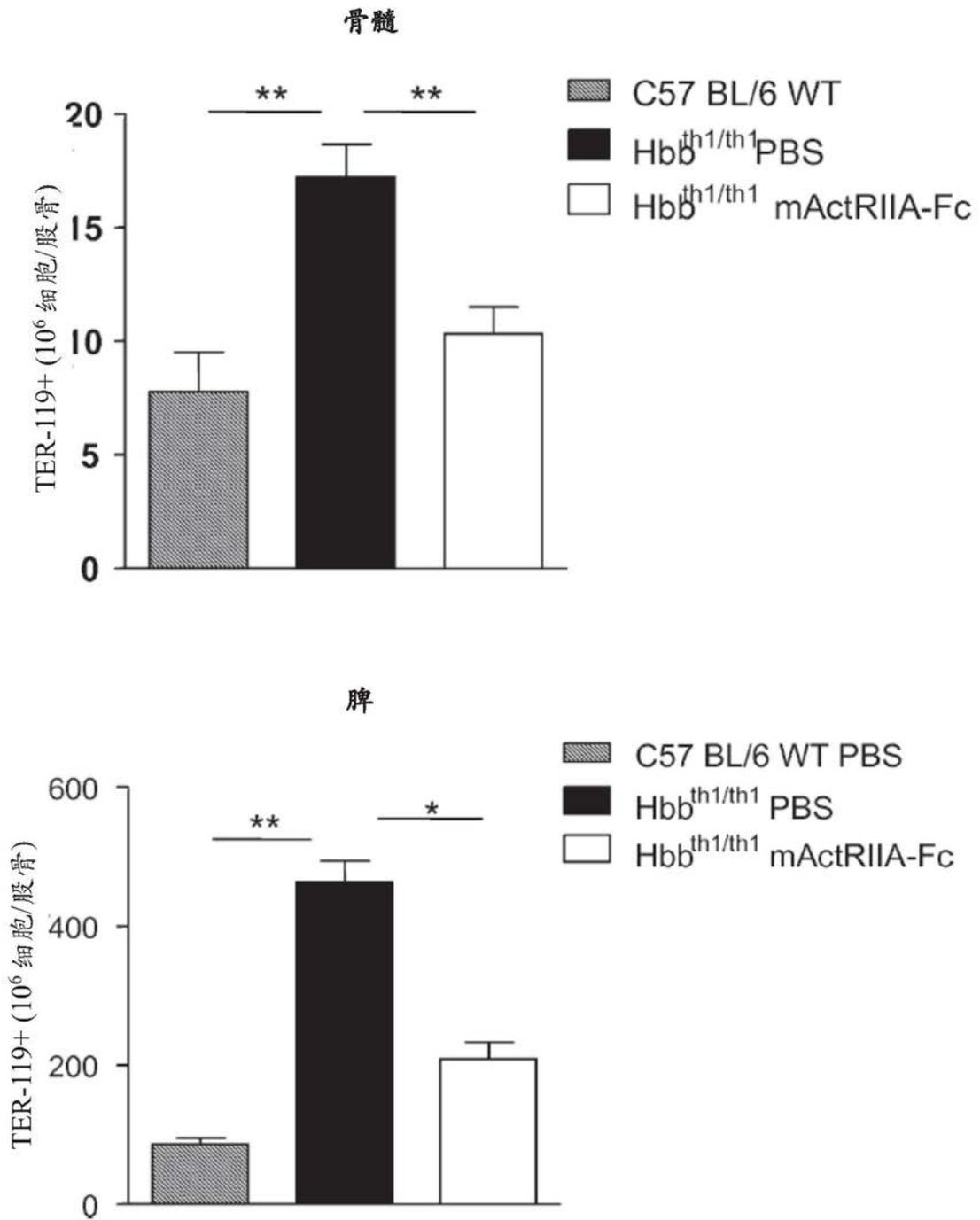


图10

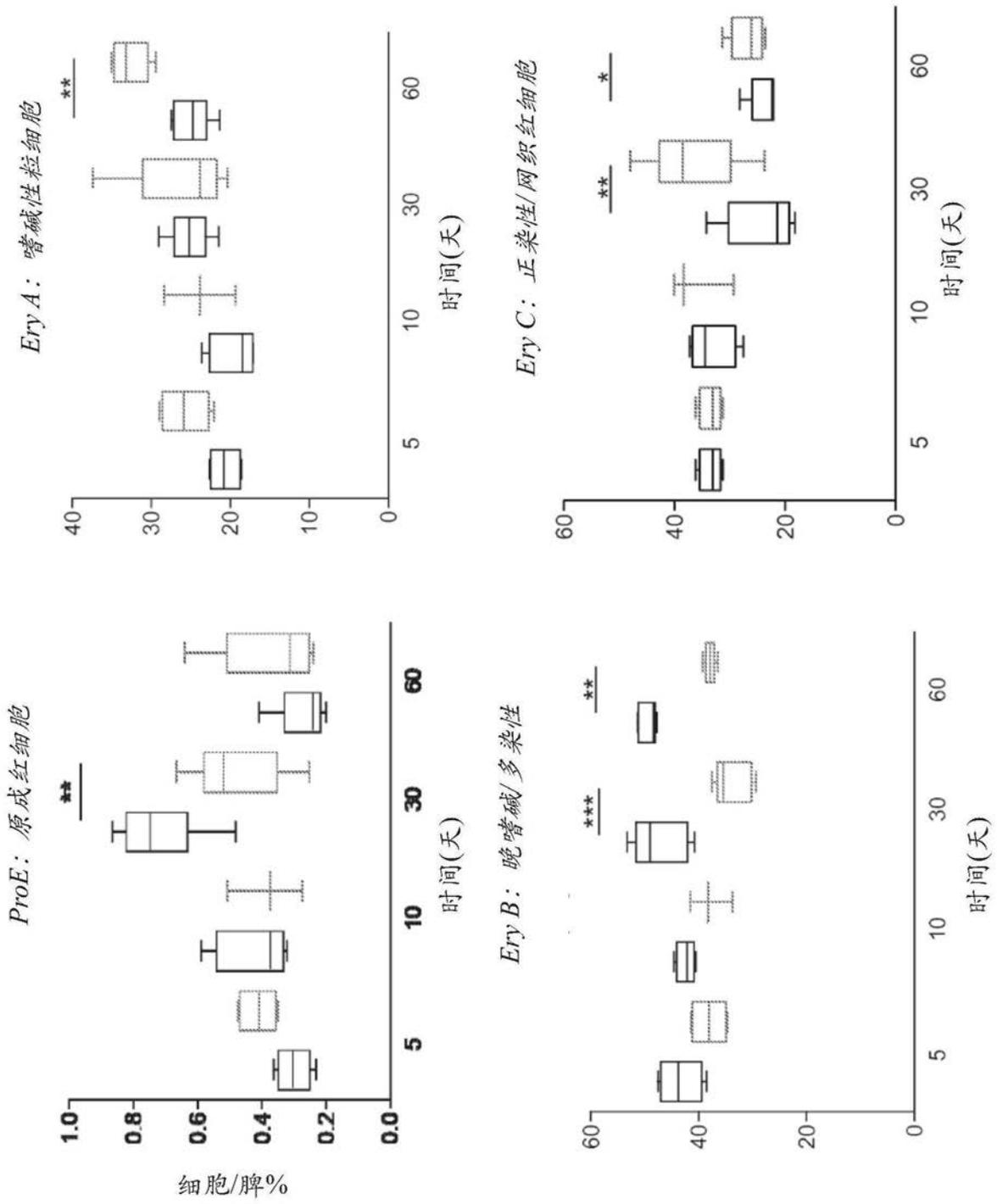
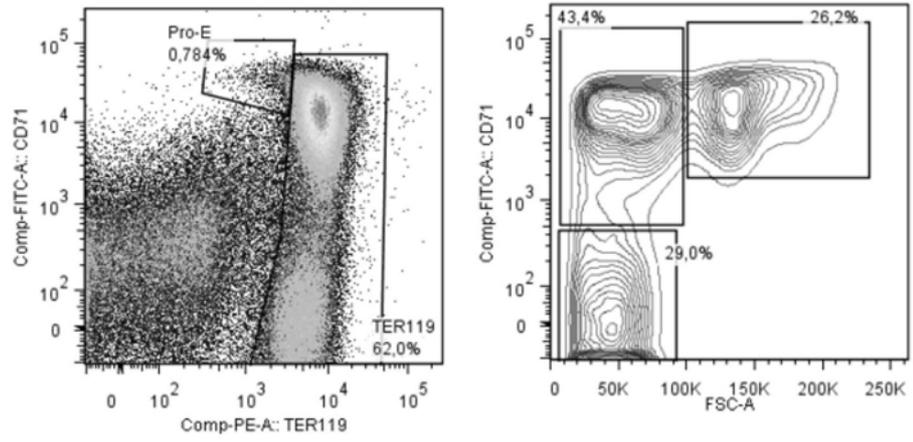


图2A

脾 PBS



脾  
mActRIIA-Fc

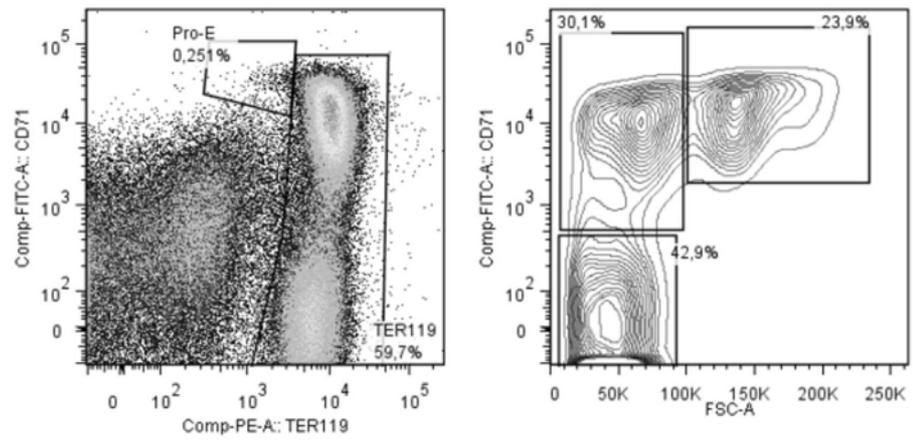


图2A续

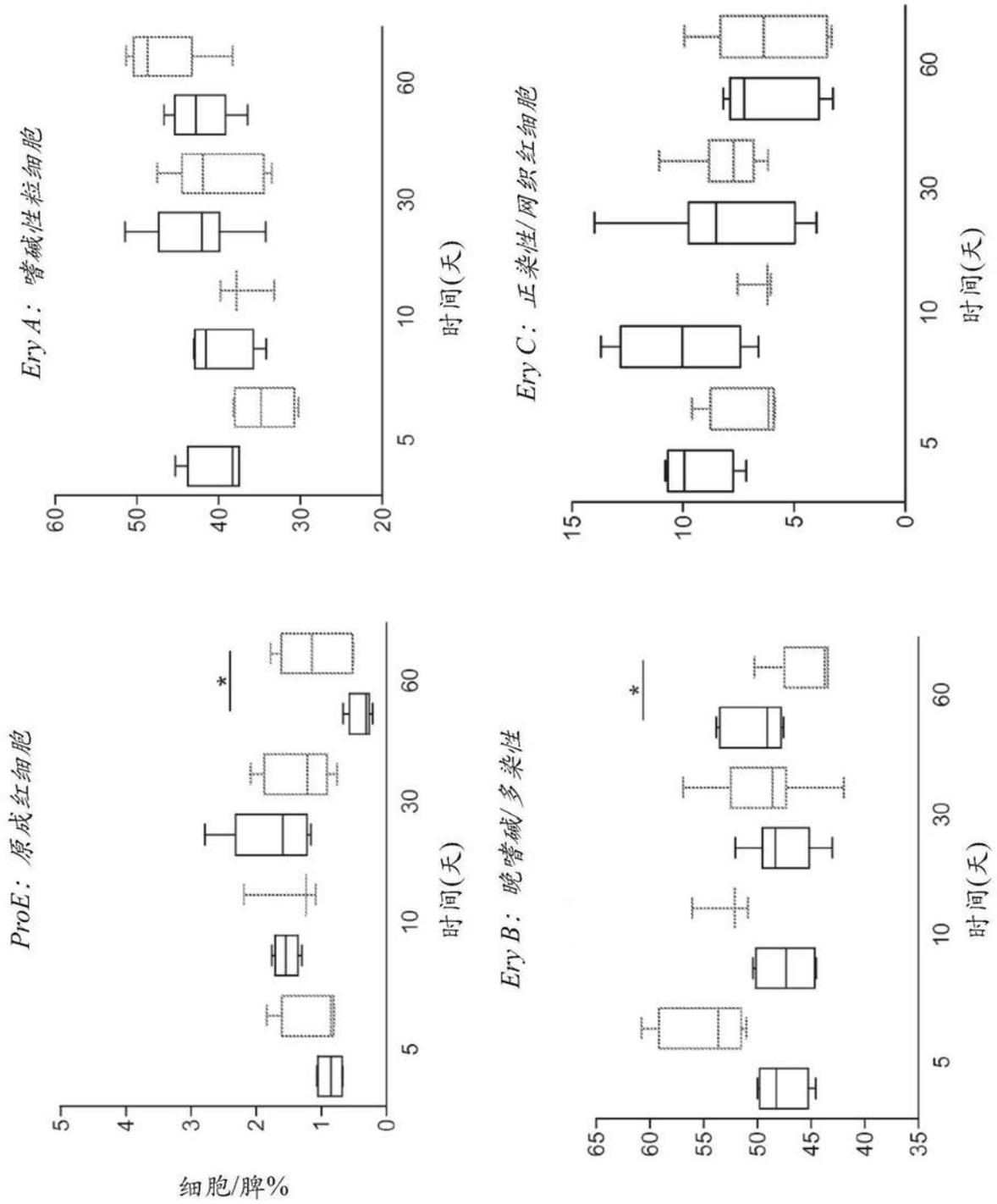


图2B

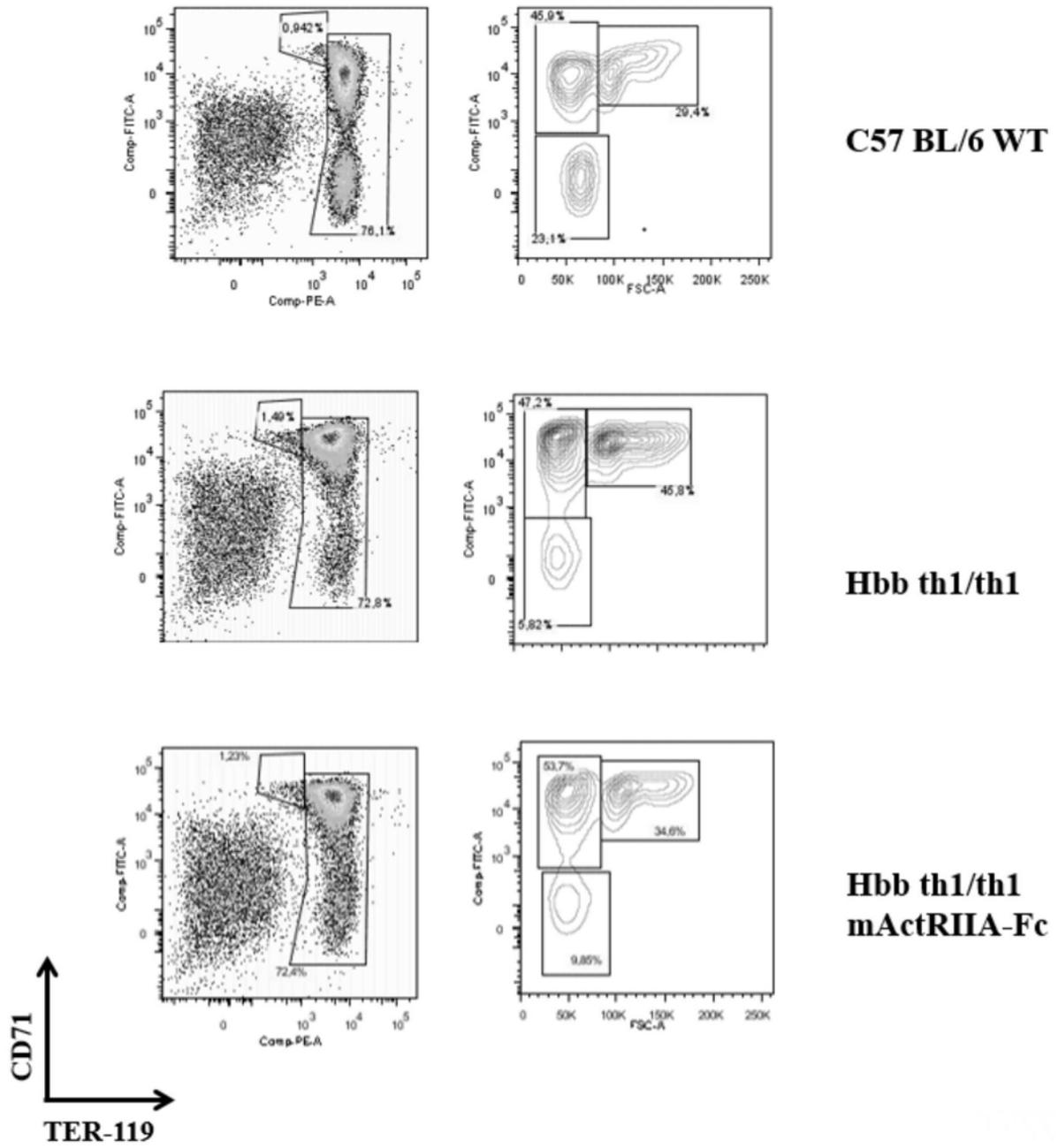


图2B续

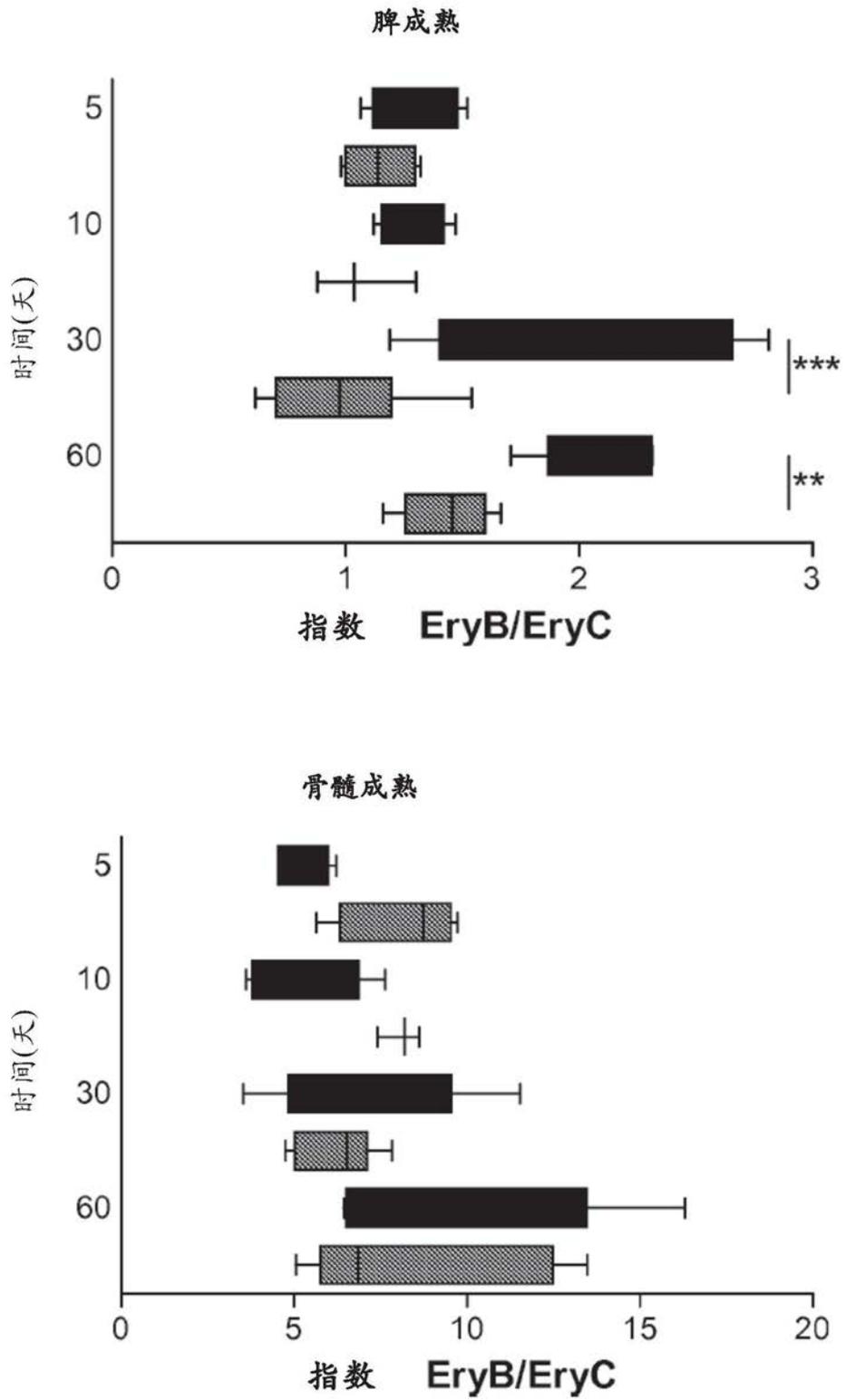


图2C

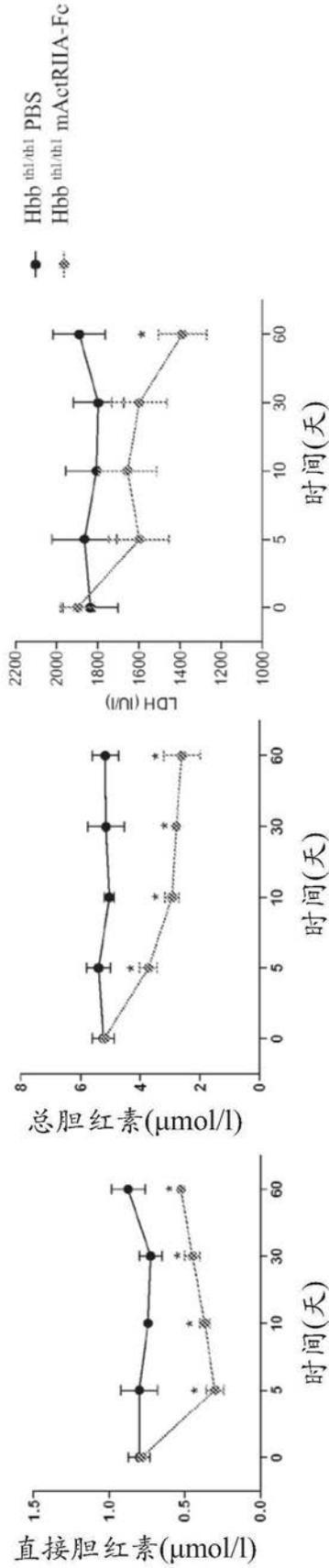


图2D

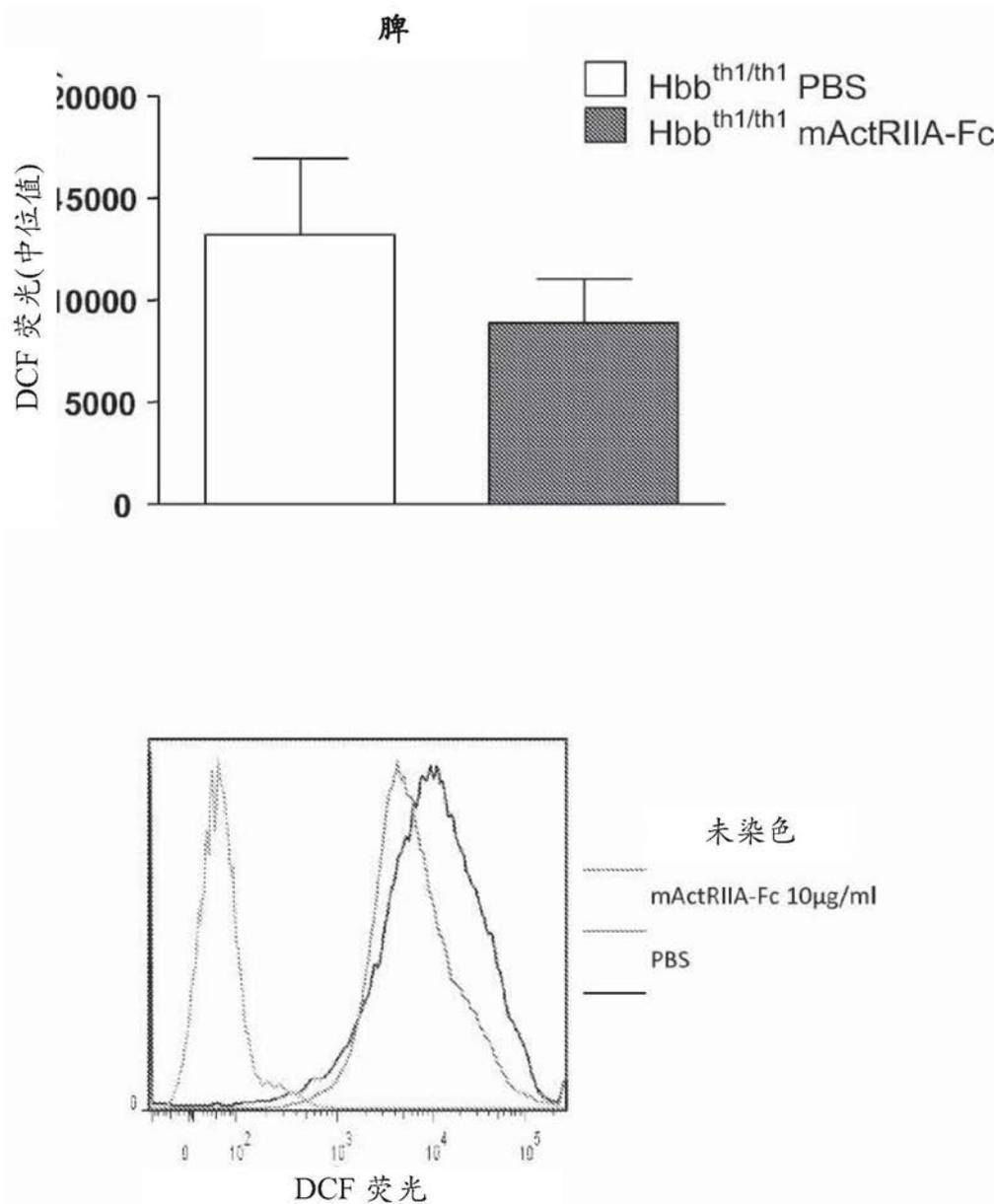


图2E

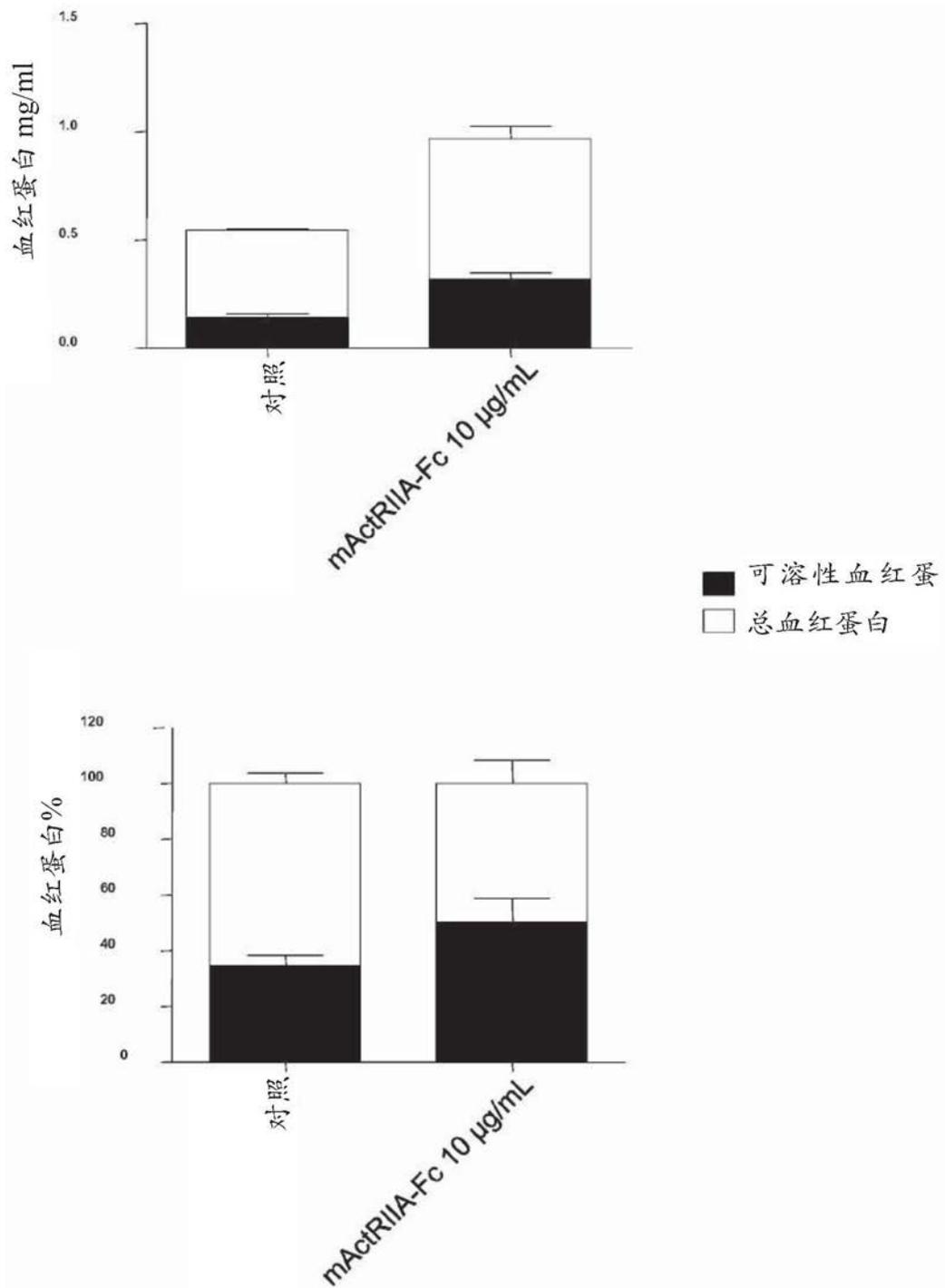


图2F

骨髓

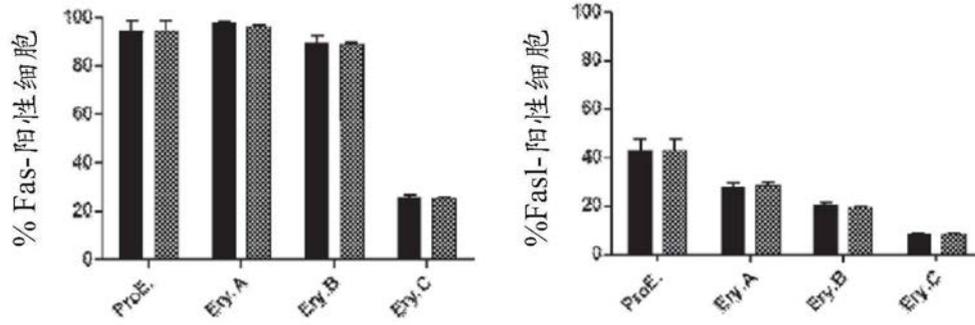


图3A

脾

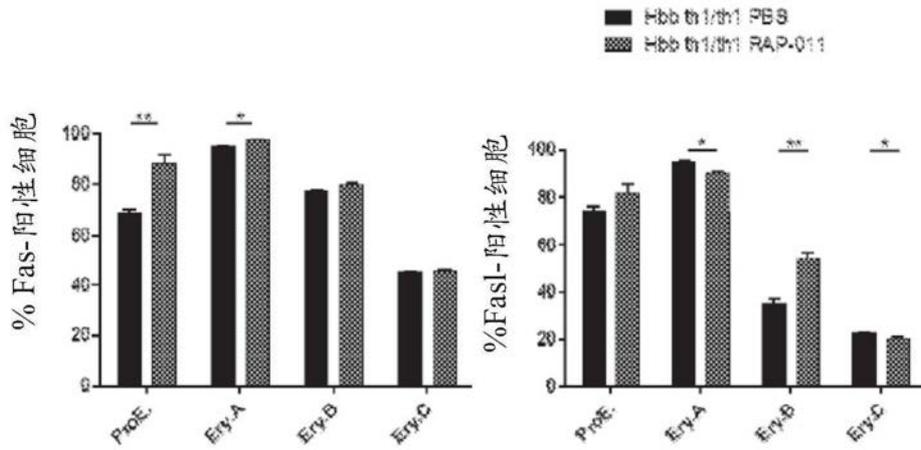


图3B

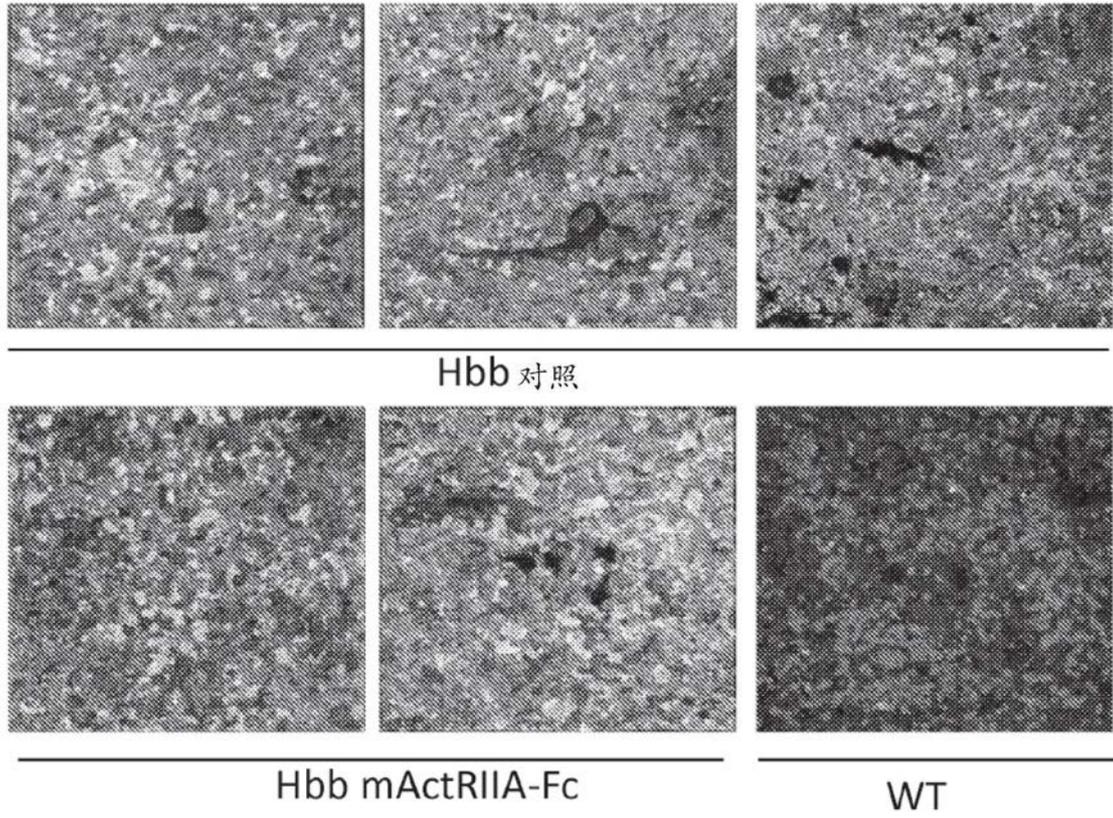


图3C

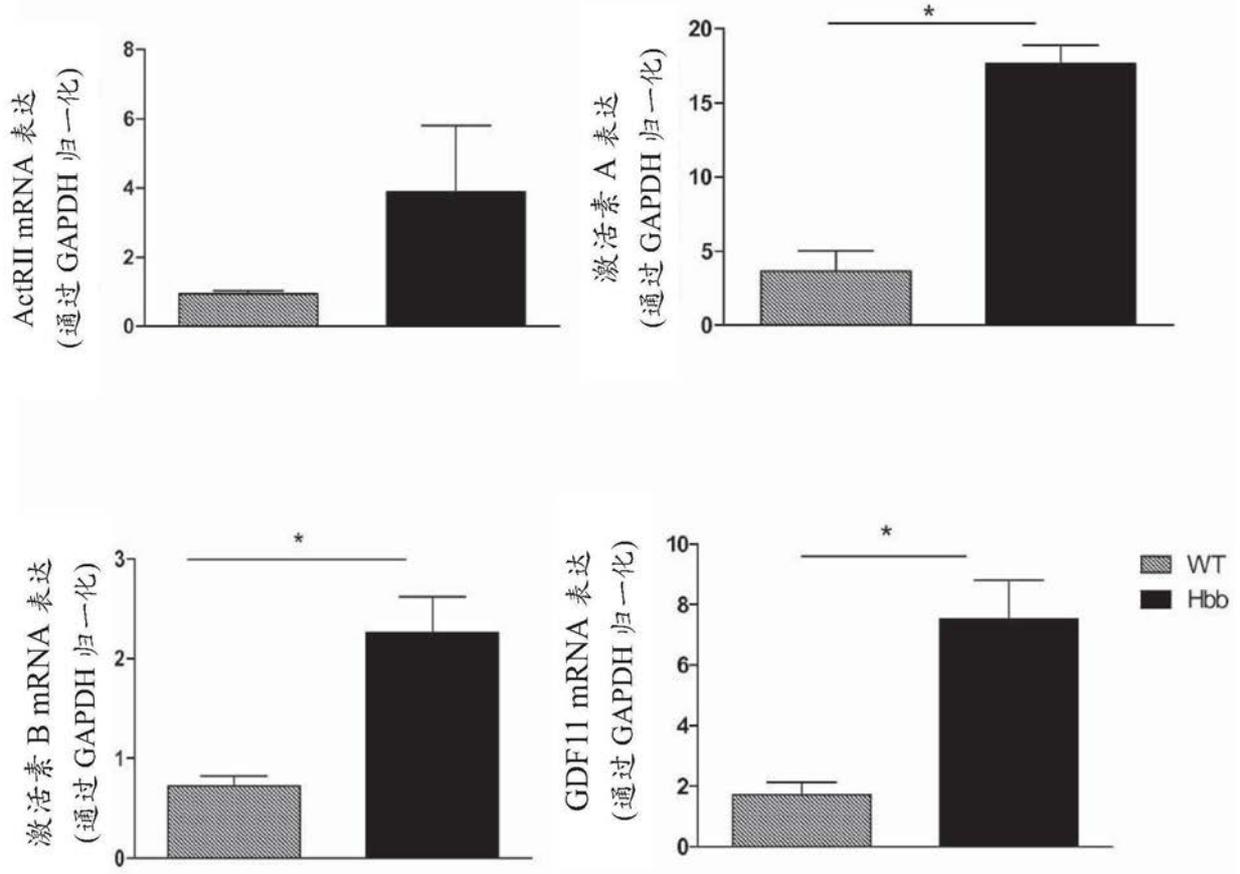


图4A

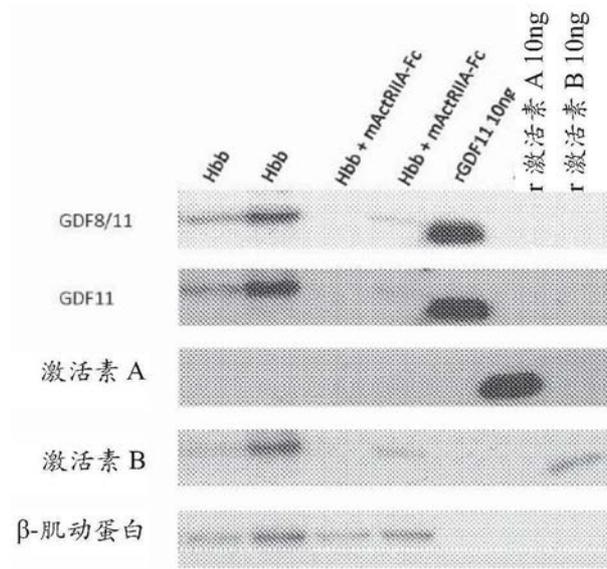


图4B

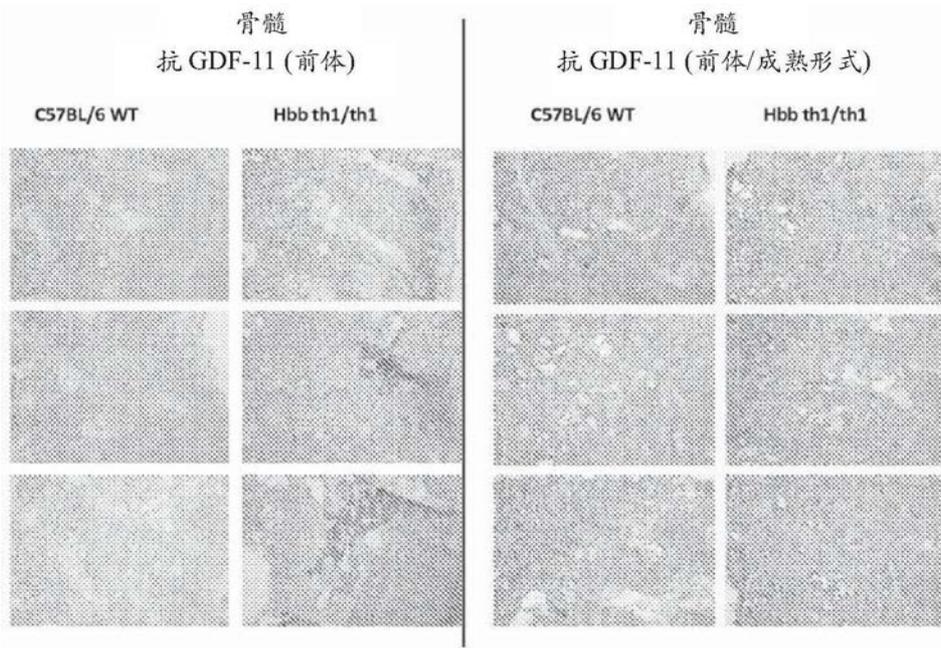


图4C

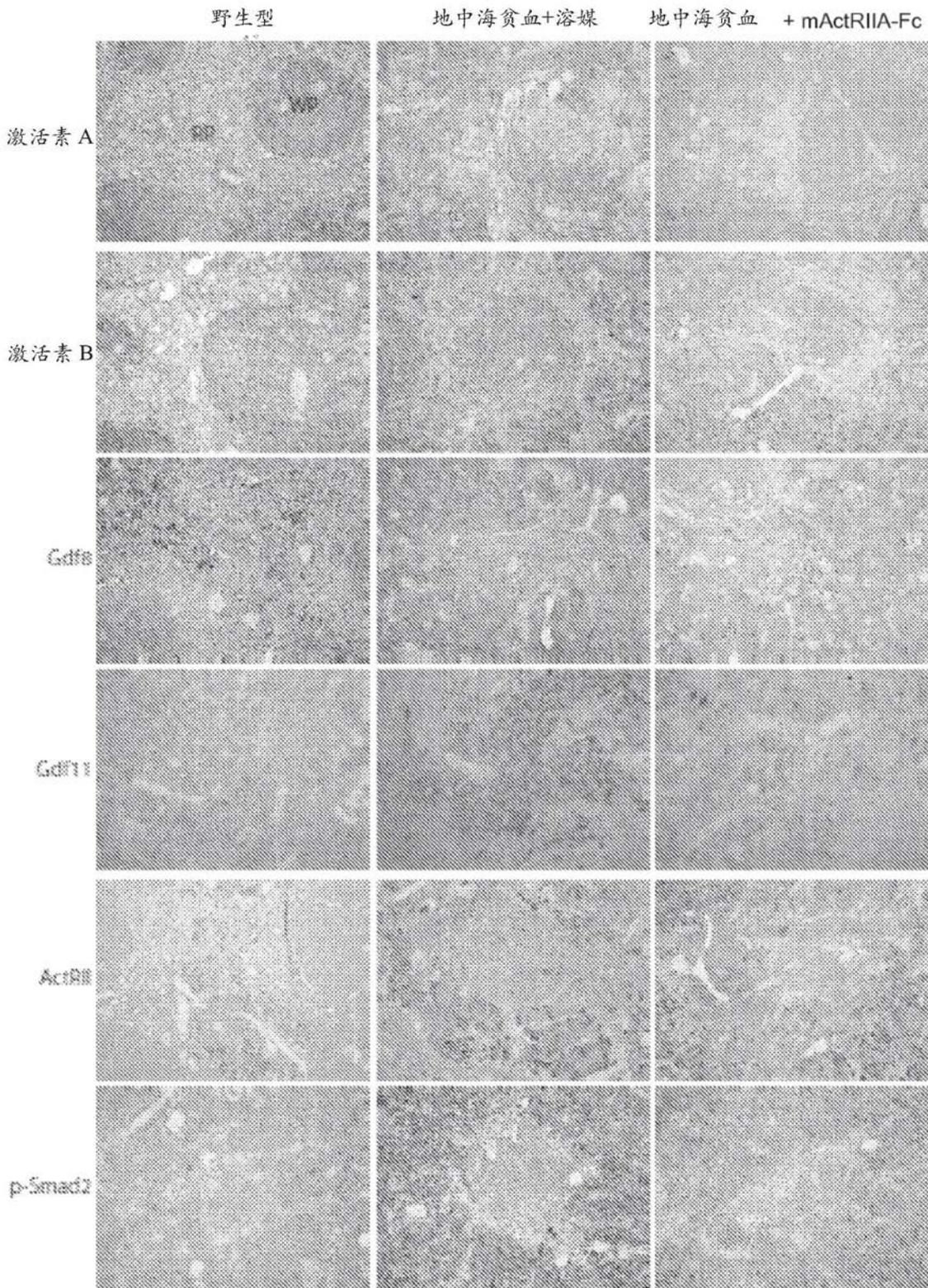


图5A

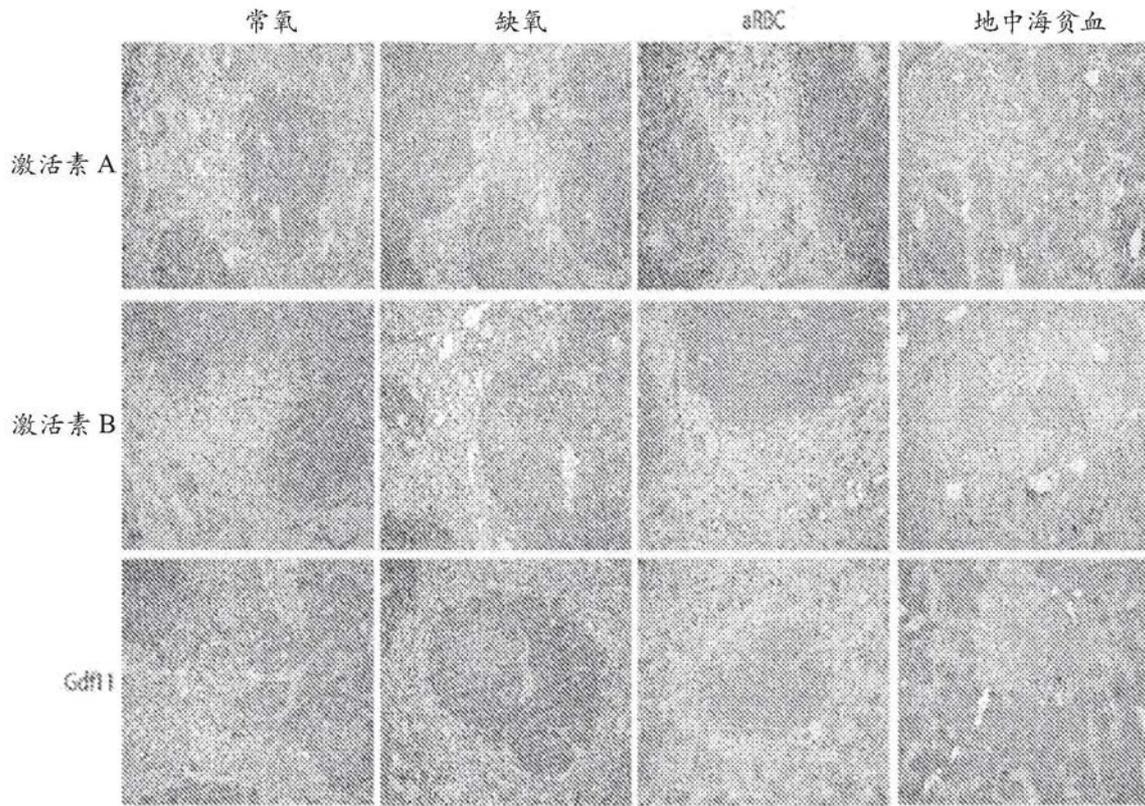


图5B

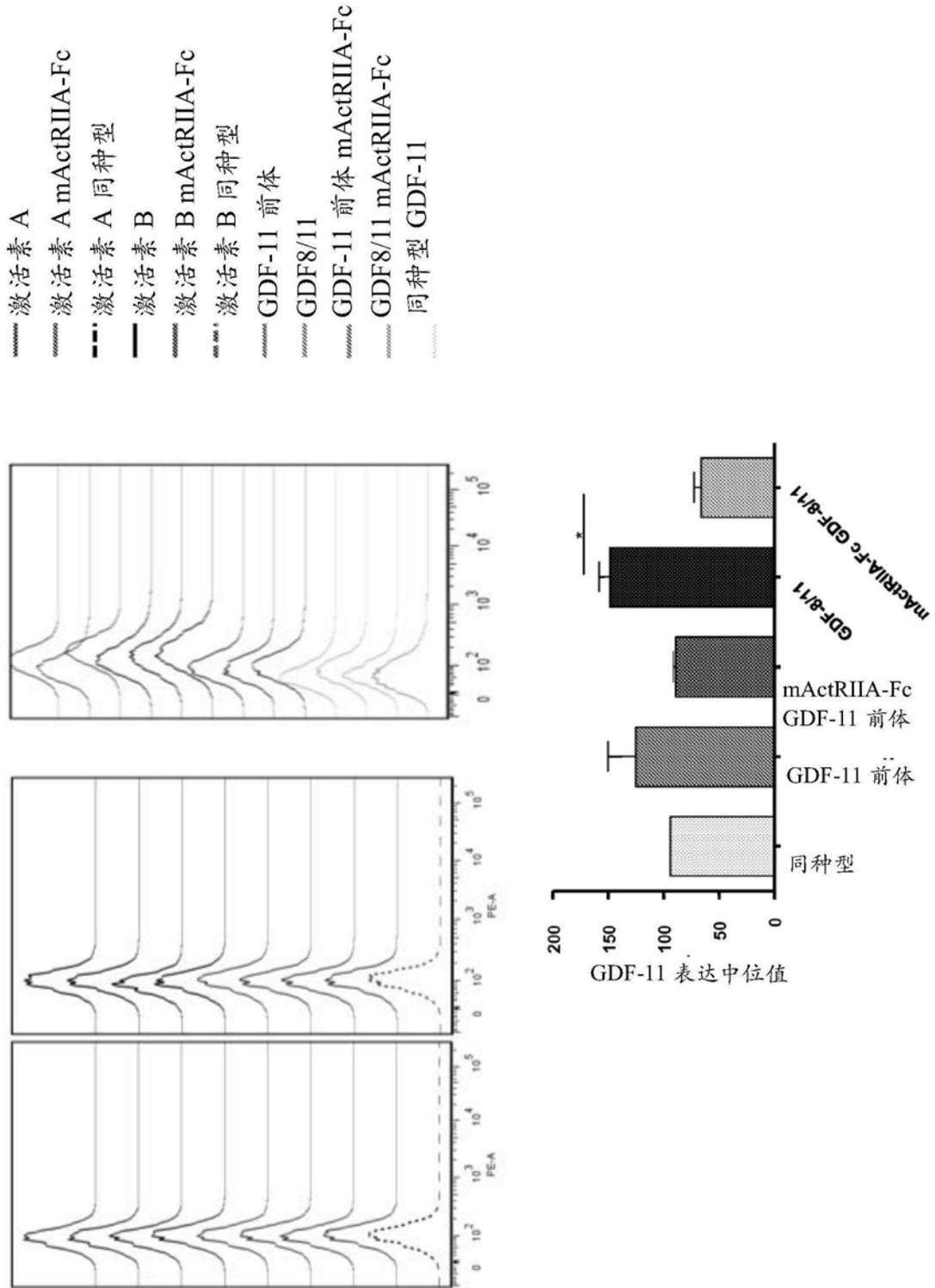


图5C

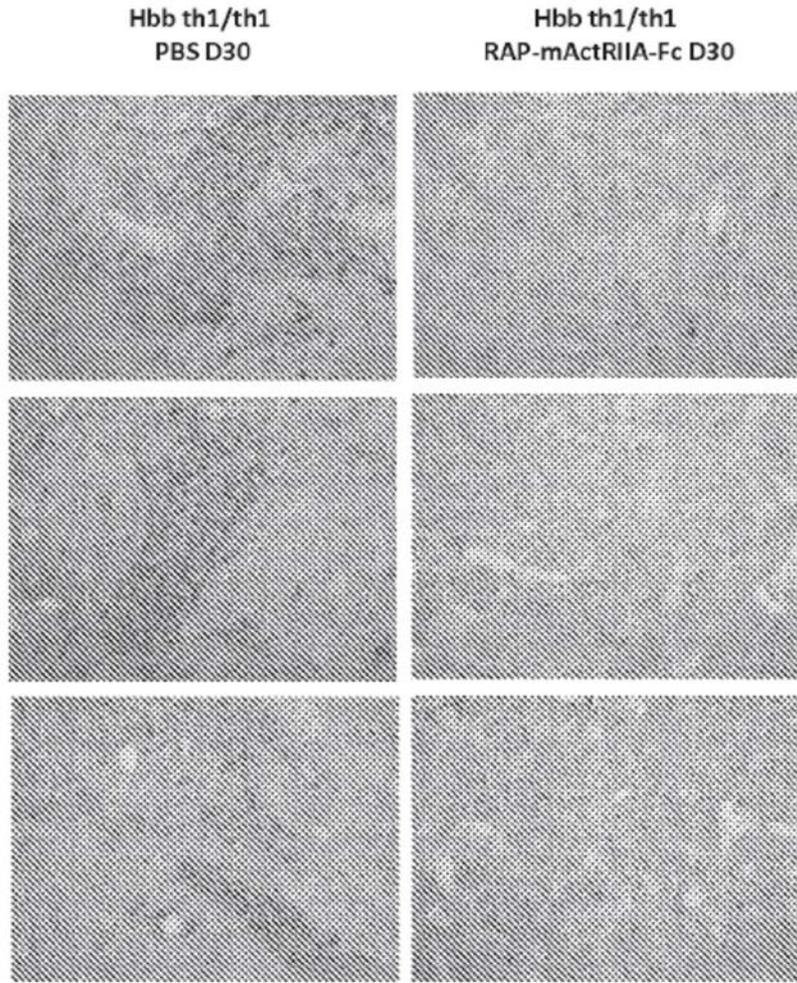


图5D

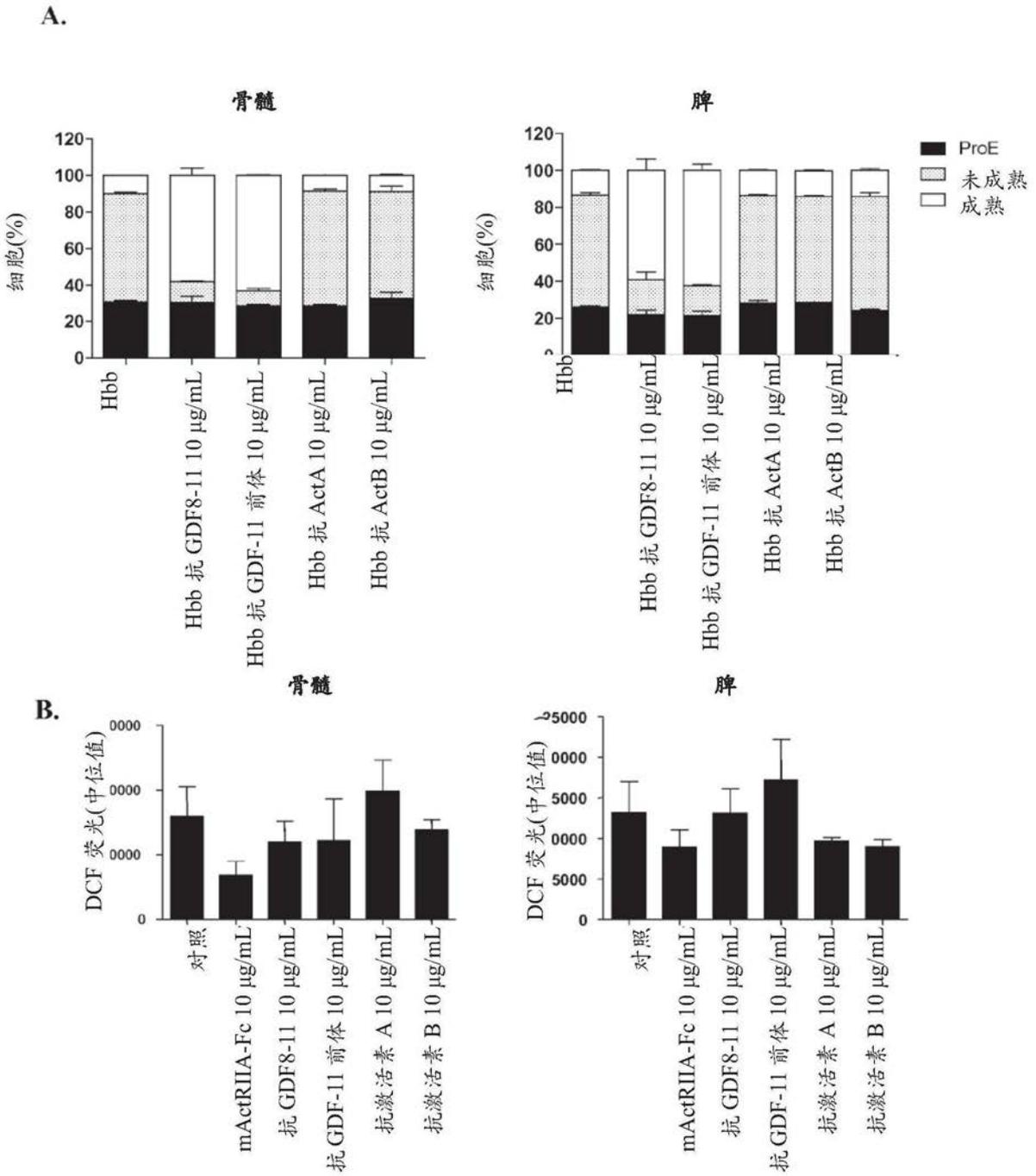
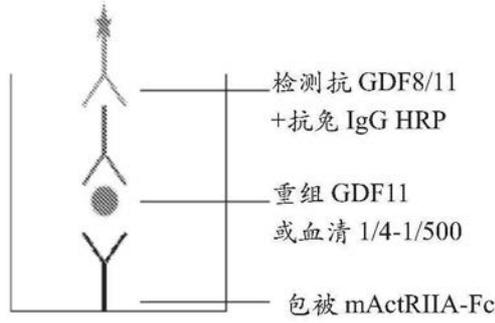


图6

A.



B.

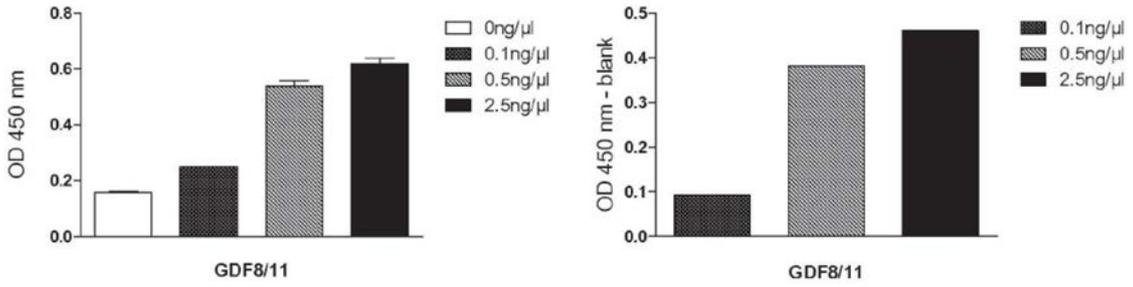


图7

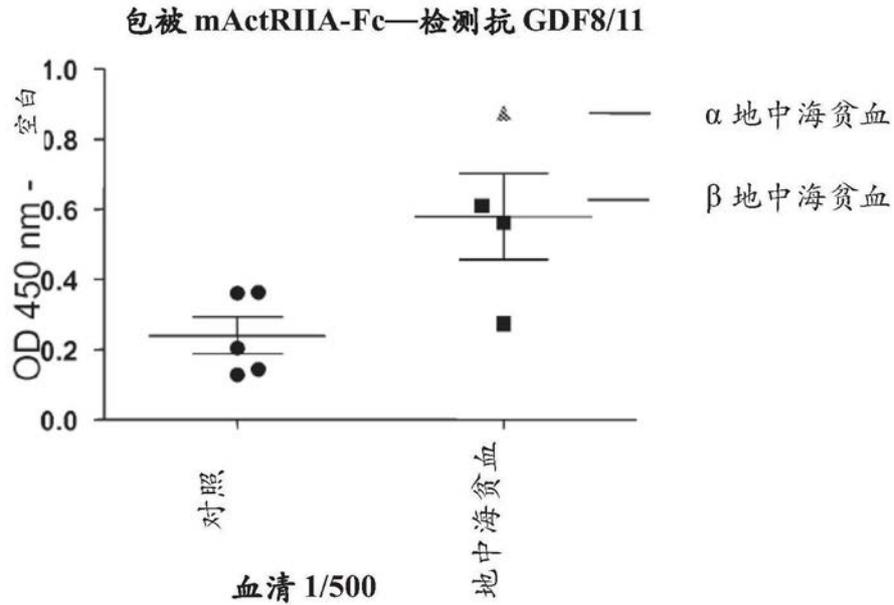


图8

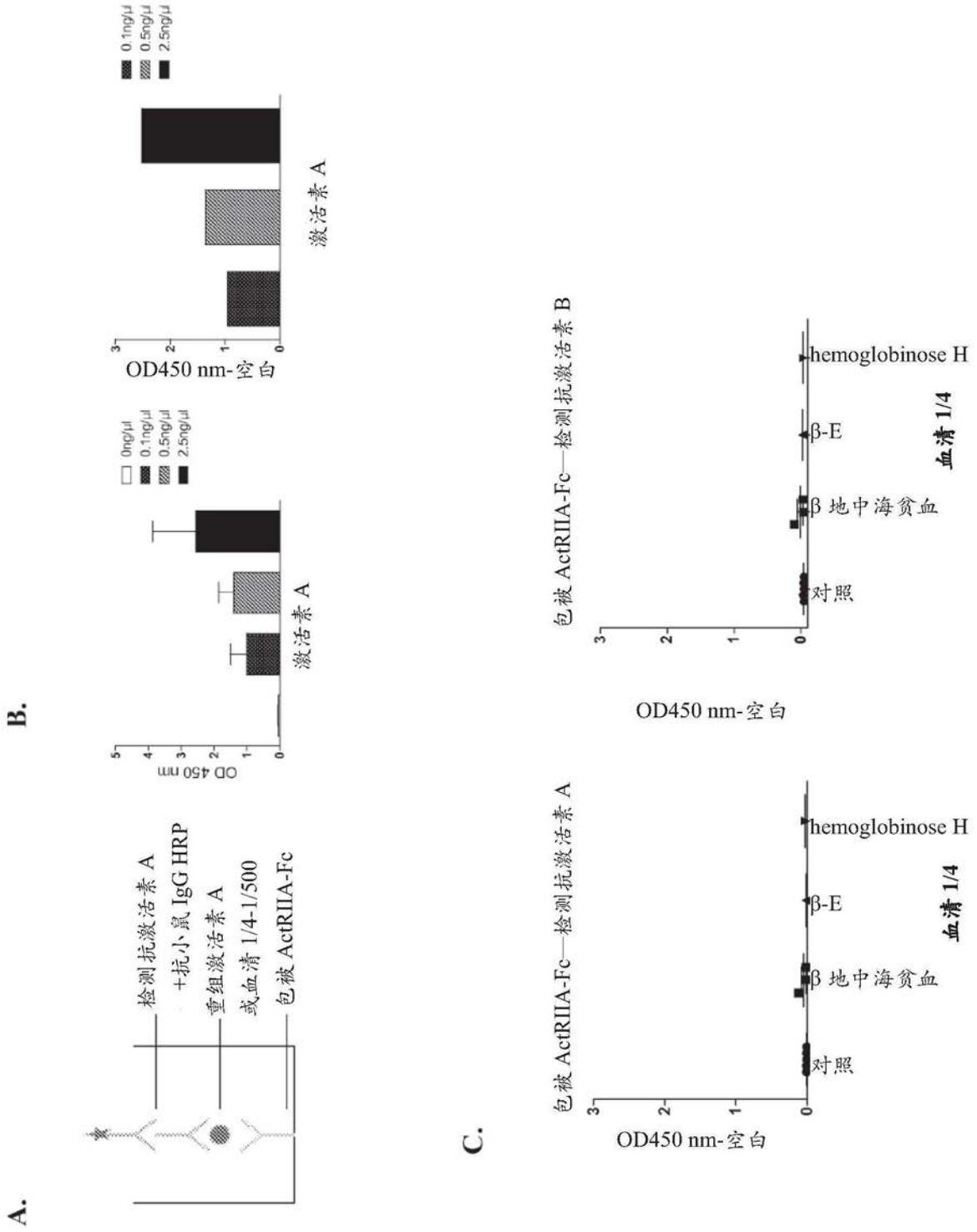


图9

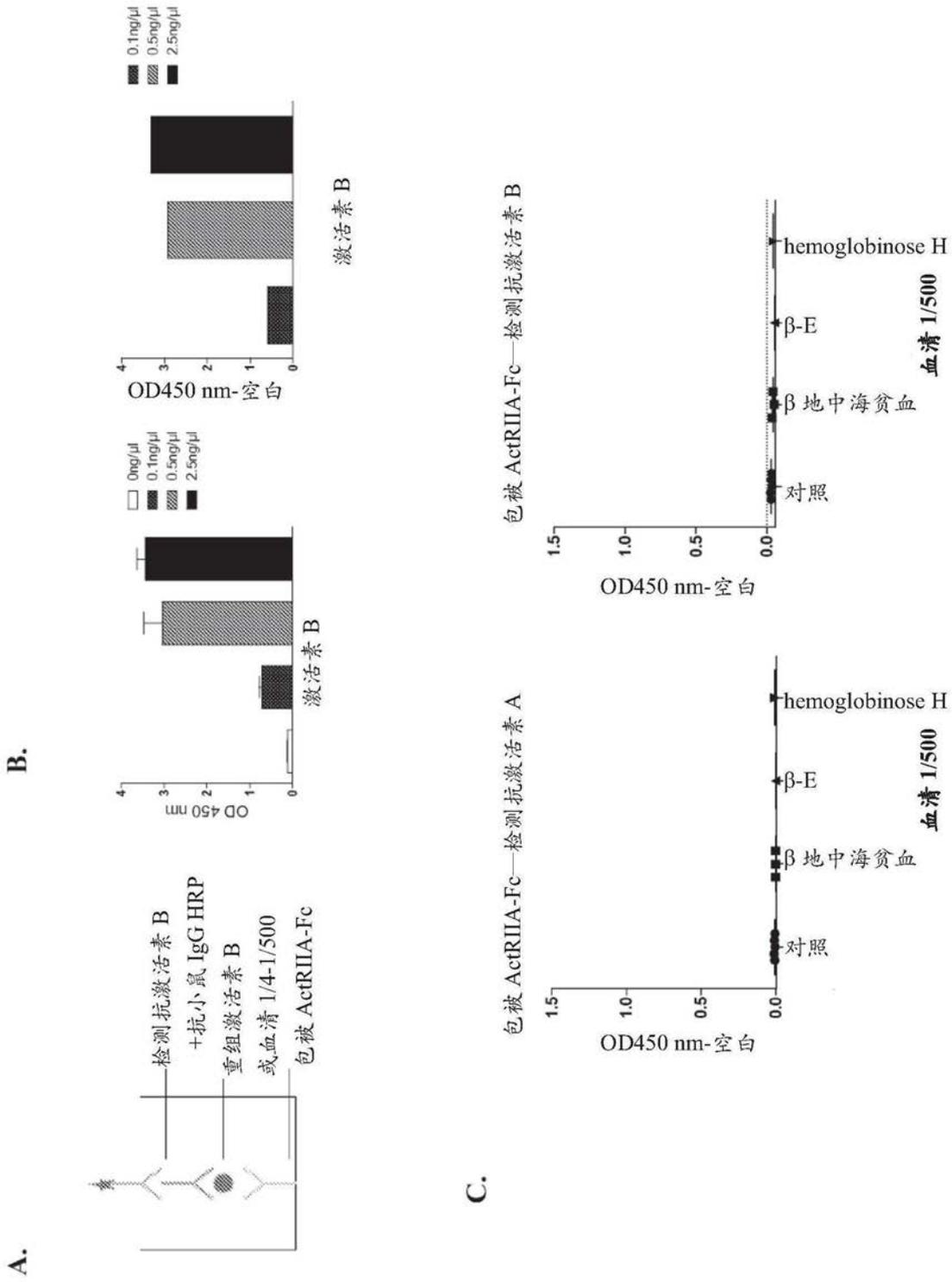


图10

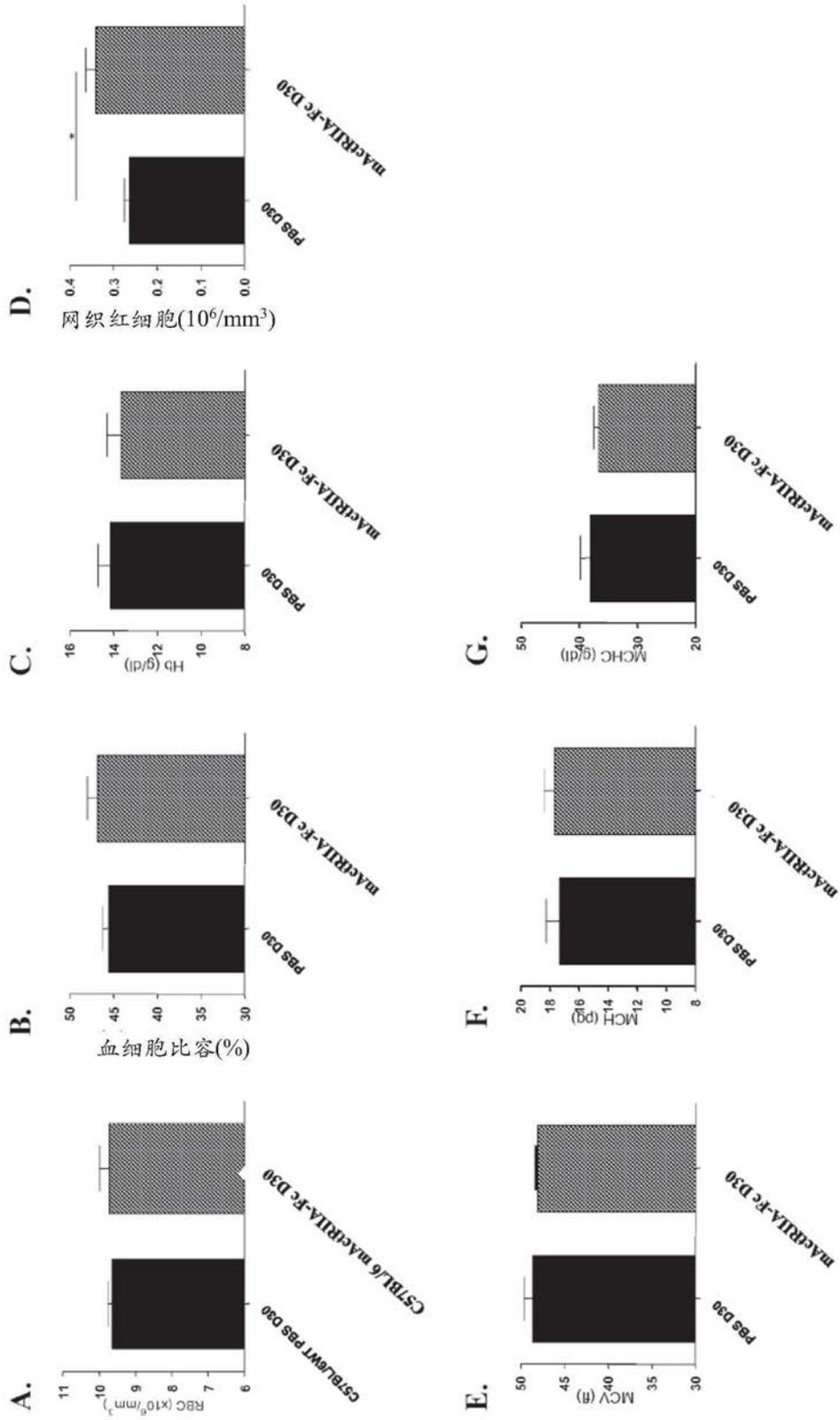


图11

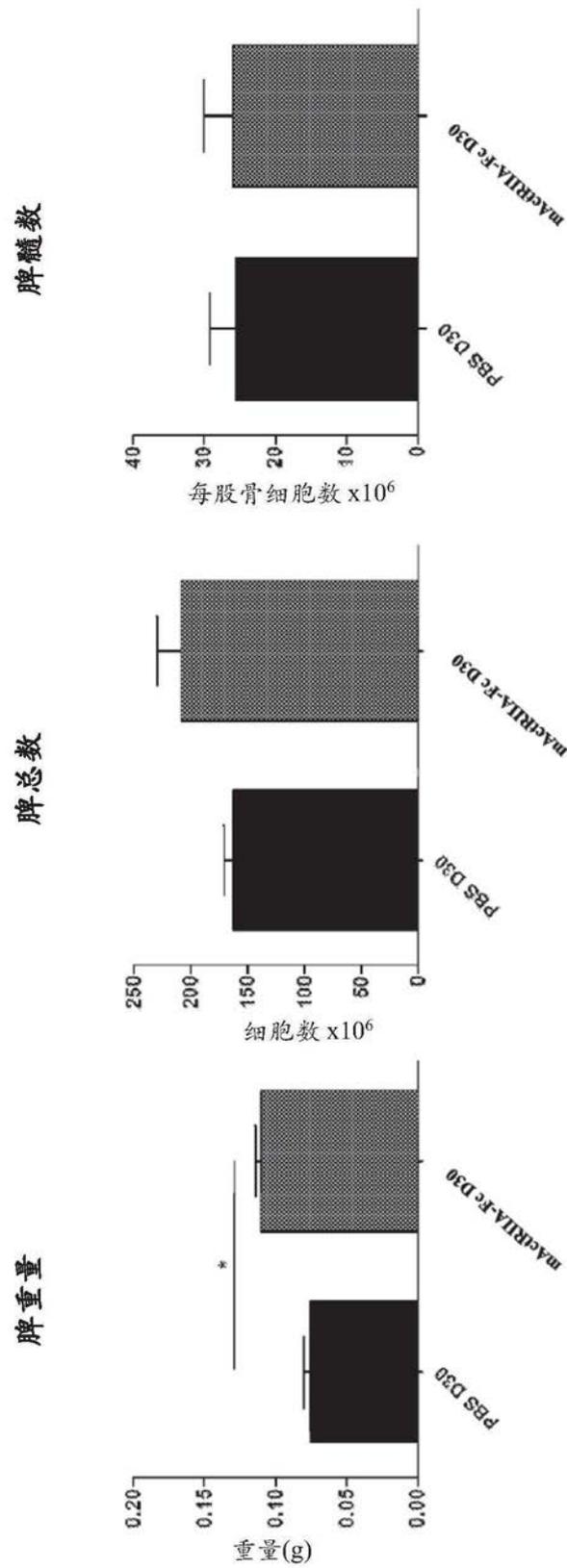


图12

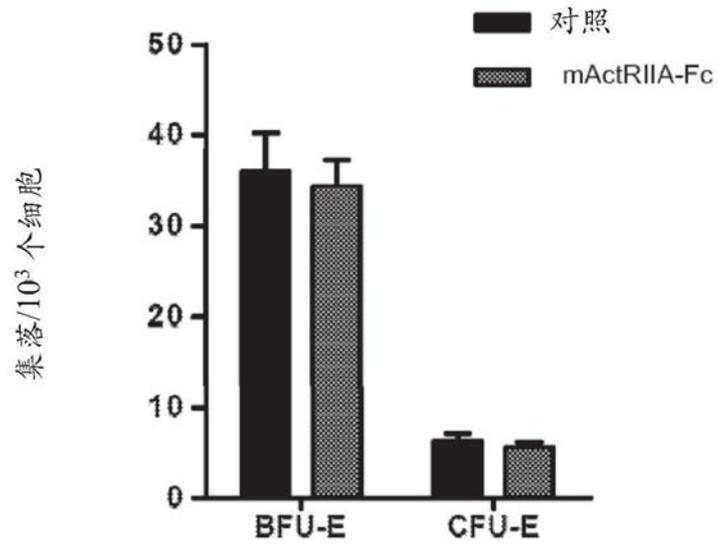


图13A

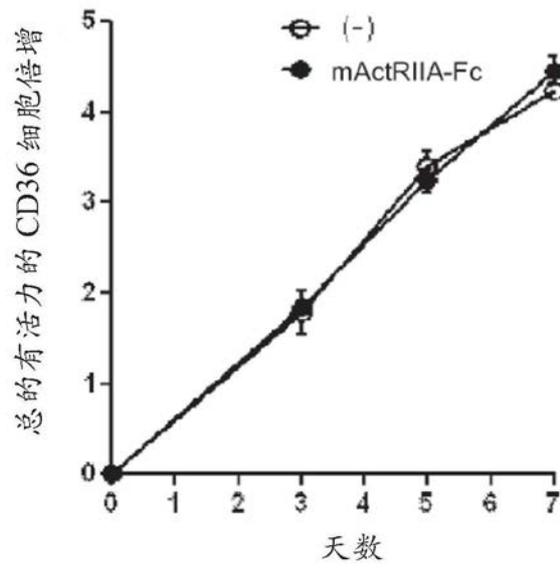


图13B

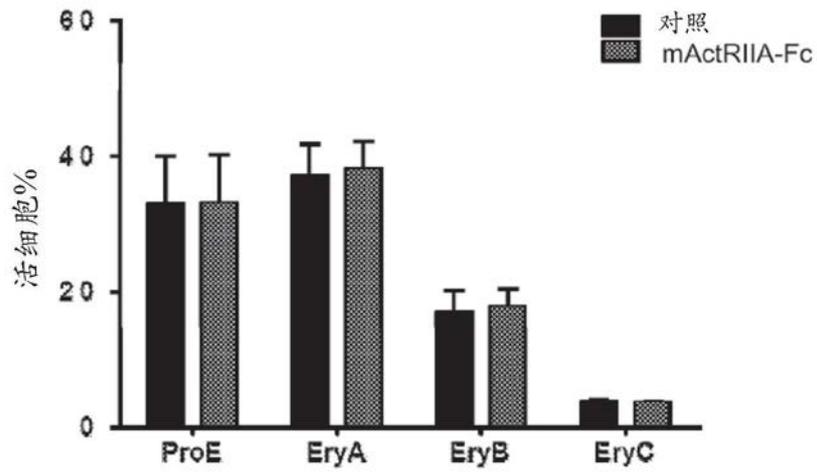


图13C

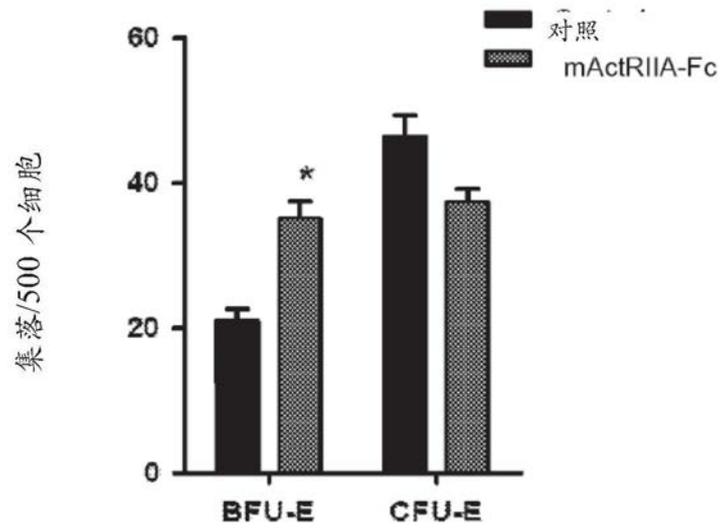


图13D

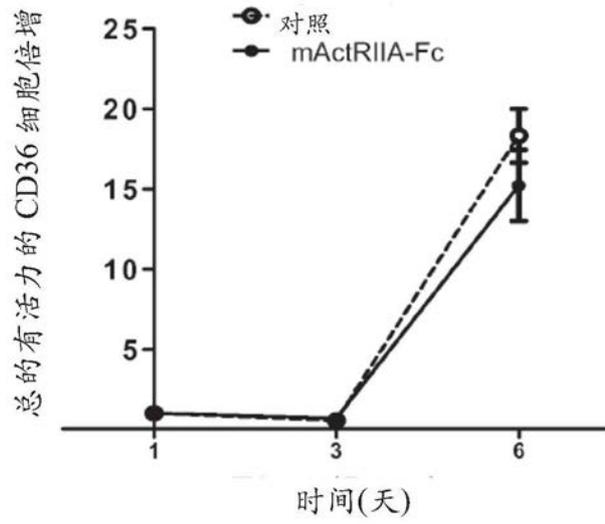


图13E

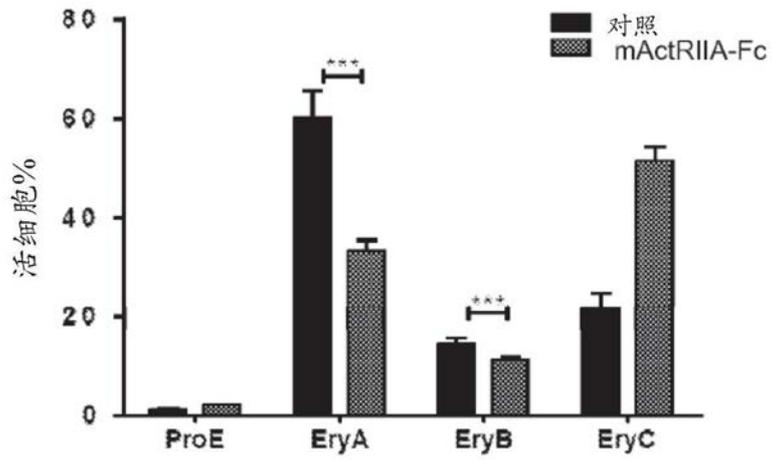


图13F

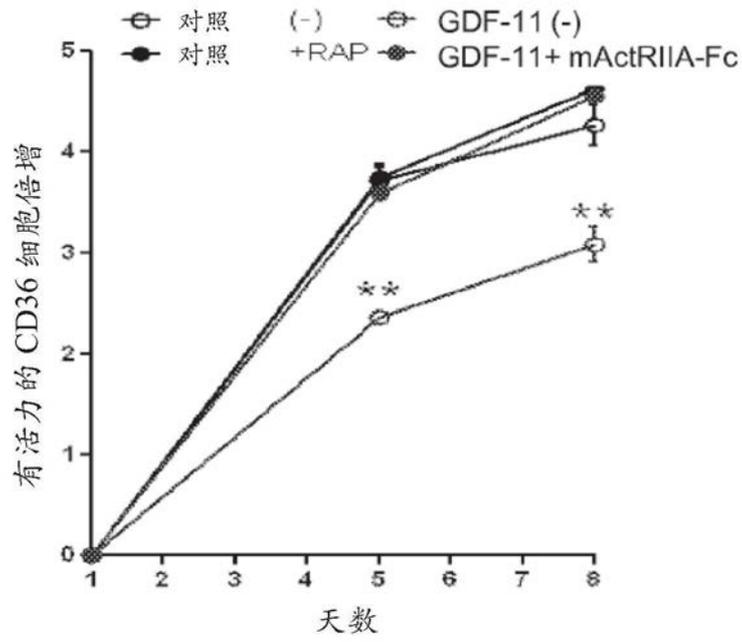


图13G

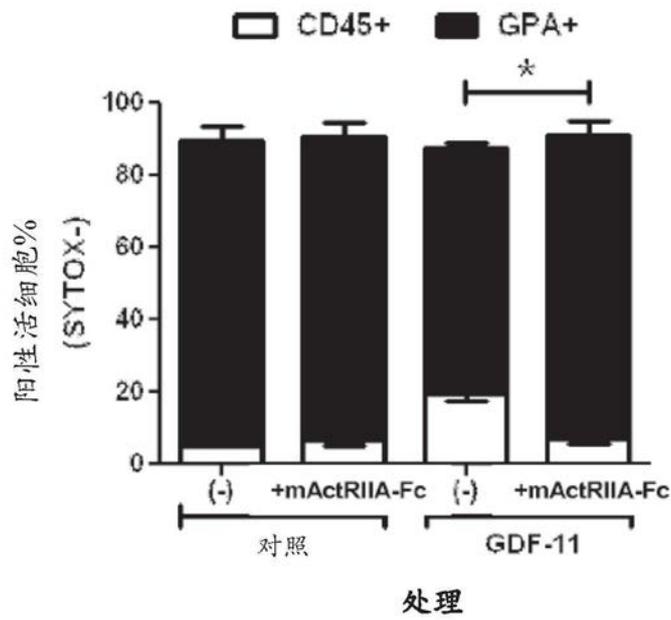


图13H