



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104981250 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 14

(21) 申请号 201380067832. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 10. 23

A61K 38/18(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 38/00(2006. 01)

61/718, 128 2012. 10. 24 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 06. 24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/066353 2013. 10. 23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/066487 EN 2014. 05. 01

(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 郑霞

权利要求书1页 说明书59页

序列表28页 附图37页

(54) 发明名称

用于治疗贫血的方法

(57) 摘要

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。

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 β 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。

[0002] 1. 引言

[0003] 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。

[0004] 2. 发明背景

[0005] 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。

[0006] 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。

[0007] 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,β 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。β 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。

[0008] 转化生长因子 β (TGF-β) 家族 (该家族包括 TGF-β、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-β 1、激活素 A、BMP-2 和 BMP-4 全都与红细胞发生的调节有关。TGF-β 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。

[0009] TGF-β 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、脑和骨髓中检出 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。

[0010] 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- β 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。

[0011] 由激活素-受体 IIA 型 (ActRIIA) 的胞外域 (ECD) 和人 IgG1Fc 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 β 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)。

[0012] 3. 发明概述

[0013] 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、 β 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。

[0014] 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。

[0015] 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 的亲和力提高。

[0016] 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

[0017] a. 测定 GDF11 水平;和

[0018] 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 GDF11mRNA 水平、GDF11 蛋白水平或 GDF11 蛋白活性水平测定 GDF11 水平。

[0019] 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。

[0020] 4. 附图简述

[0021] 图 1 说明 SEQ ID NO 7 的鼠对应物 (mActRIIA-Fc) 改进 β 地中海贫血小鼠的血液学参数。Hbb^{th1/th1} 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 $N=3-5$ 。

[0022] 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 $N=3-5$ 。

[0023] 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。

[0024] 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。

[0025] 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。 $*p<0.05$, $N=4$ 。

[0026] 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。 $*p<0.05$, $N=4$ 。

[0027] 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 $5\mu\text{g/mL}$ 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。

[0028] 图 8 说明在 β 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。

[0029] 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 $5\mu\text{g/mL}$ ActRIIA-Fc (SEQ ID NO. 7) 和递增剂量的重组激活素 A ($0\text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $0.1\text{ng}/\mu\text{l}$ 、

0.5ng/ μ l、2.5ng/ μ l) 包被或将对对照血清 (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) β 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。

[0030] 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 μ g/mL ActRIIA-Fc 和递增剂量的重组激活素 B (0ng/ μ l、0.1ng/ μ l、0.5ng/ μ l、2.5ng/ μ l) 包被或将对对照血清 (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) β 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。

[0031] 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 $N = 3-5$ 。

[0032] 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。

[0033] 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 EP0、+/-50 μ 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 EP0、+/-50 μ 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 EP0、+/-200ng/mL GDF11、+/-100ug/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。

[0034] 5. 发明详述

[0035] 5.1 概述

[0036] 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 not found. 节。

[0037] 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%。

[0038] 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例降低至少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例降低至少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%。

[0039] 5.2 待治疗的贫血

[0040] 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。

[0041] 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 β 地中海贫血。 β 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。

[0042] 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的 GDF11mRNA 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的 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%。

[0043] 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。

[0044] 在某些实施方案中,待用本文提供的方法治疗的患者的血红蛋白水平小于 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。

[0045] 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。

[0046] 5.3 GDF11 的拮抗剂

[0047] 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。

[0048] 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。

[0049] 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。

[0050] 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。

[0051] 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。

[0052] 与其它 TGF- β 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。前肽自水解性地从分子的其余部分蛋白切割, 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。

[0053] 5.3.1 抗 GDF11 抗体

[0054] 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。

[0055] 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。

[0056] 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。

[0057] 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 $F(ab)_2$ 片段。可对所得 $F(ab)_2$ 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和力。术语“抗体”还包括 Fab、Fab' 和 $F(ab')$ 片段。

[0058] 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_H 蛋白或骆驼 V_H 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。

[0059] 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的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} 或更小的亲合力（解离常数）。

[0060] 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。

[0061] 在一个实施方案中，抗 GDF11 抗体以高亲合力结合 GDF11。因此，在一个实施方案中，抗 GDF11 抗体的 IC₅₀ 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 IC₅₀ 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 具有强的结合亲合力 (Kd)。因此抗 GDF11 抗体的 Kd 小于约 4.2×10^{-9} M 或 4.0×10^{-9} M、小于约 4.6×10^{-10} M、 4.0×10^{-10} M 或 2×10^{-10} M 或小于约 8×10^{-11} M、 7×10^{-11} M、 5×10^{-12} M 或 1.4×10^{-12} M。或者，用于本文所述方法的抗 GDF 抗体对 GDF11 的 Kd 不大于约 4.2×10^{-9} M 或 4.0×10^{-9} M、不大于约 4.6×10^{-10} M、 4.0×10^{-10} M 或 2×10^{-10} M 或不大于约 8×10^{-11} M、 7×10^{-11} M、 5×10^{-12} M 或 1.4×10^{-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 Kd。

[0062] 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。

[0063] 5.3.2 包含 ACTRII 多肽的 GDF11 拮抗剂

[0064] 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。

[0065] 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 β 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%。

[0066] 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。

[0067] 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- β 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。

[0068] (a) ActRIIA

[0069] 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。

[0070] 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- 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。

[0071] 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- β 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。

[0072] 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。

[0073] 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)。

[0074] 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 γ 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。

[0075] 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。

[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。

[0077] 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。

[0078] 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。

[0079] 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。

[0080] 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)。

[0081] 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。

[0082] 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。

[0083] 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 (HIS₆) 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。

[0084] 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。

[0085] 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)。

[0086] 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。

[0087] 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。

[0088] 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 β -gal 的 pBlueBac III)。

[0089] 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。

[0090] 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。

[0091] 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)。

[0092] 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 & Sons:1992)。

[0093] 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 B1 1 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。

[0094] 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 (del 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。

[0095] (b) ActRIIB

[0096] 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。

[0097] 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- 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。

[0098] 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- β 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。

[0099] 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 WO 2006/012627 和 WO 2010/019261(这些参考文献的公开内容以其整体结合到本文中)。

[0100] 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。

[0101] 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。

[0102] 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。

[0103] 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。

[0104] 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。

[0105] 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。

[0106] 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)。

[0107] 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 γ 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。

[0108] 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。

[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。

[0110] 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。

[0111] 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。

[0112] 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。

[0113] 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)。

[0114] 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。

[0115] 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。

[0116] 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 (HIS₆) 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。可容易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。

[0117] 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。

[0118] 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）。

[0119] 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。

[0120] 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。

[0121] 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。

[0122] 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。

[0123] 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。

[0124] 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。

[0125] 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 TGF β 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。

[0126] 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。

[0127] 5.3.3 GDF11 前肽

[0128] 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。

[0129] 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。

[0130] 5.3.4 GDF11 结合蛋白

[0131] 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。

[0132] 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- β 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。

[0133] 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。

[0134] 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。

[0135] 5.3.5 GDF11 类似物

[0136] 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。

[0137] 5.3.6 GDF11 多核苷酸拮抗剂

[0138] 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。

[0139] 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。

[0140] 5.4 测定法

[0141] 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。

[0142] 5.4.1 红细胞水平

[0143] 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。

[0144] 5.4.2 红细胞集落形成单位(CFU-E)

[0145] 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。

[0146] 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))。

[0147] 5.4.3 红细胞爆发集落形成单位 (BFU-E)

[0148] 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。

[0149] 5.4.4 血细胞比容

[0150] 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。

[0151] 5.4.5 祖红细胞的细胞凋亡

[0152] 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。

[0153] 5.4.6 红细胞共培养系统

[0154] 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。

[0155] 5.4.7 转录反应测定法

[0156] 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。

[0157] 5.5 药物组合物

[0158] 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。

[0159] 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。

[0160] 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。

[0161] 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。

[0162] 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、聚乳酸和聚酐。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。

[0163] 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，或作为酏剂或糖浆剂，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。

[0164] 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。

[0165] 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、糖浆剂和酏剂。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、聚乙二醇和山梨醇酐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。

[0166] 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酐酯、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。

[0167] 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。

[0168] 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。

[0169] 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。

[0170] 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。

[0171] 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 Fraley 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。

[0172] 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。

[0173] 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。

[0174] 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 β 地中海贫血小鼠模型的贫血。

[0176] 6.1 ACTRIIA 诱杀剂治疗 β 地中海贫血

[0177] β 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- β 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- β 家族成员在 β 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- β 家族成员在 β 地中海贫血的无效红细胞发生中的作用,在人 β 地中海贫血小鼠模型中使用结合多种 TGF- β 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- β 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 β 地中海贫血小鼠模型,该小鼠具有天然存在的 β -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 β -主基因缺失 (Skow LC 等; Cell 1983)。Hbbth1/th1 小鼠构成 β 地中海贫血媒介 (intermedia) 的模型。这些小鼠具有几个复现人 β 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)、10⁻⁶M 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 μ 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 $\times$ 10⁶ 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% CO₂ 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 $\pm$ 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 Fc γ R mAb 2.4G2 进行了 IgG 受体阻断。然后将细胞 (1 $\times$ 10⁶) 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 3-6 μm 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℃,1,100g)。将血浆重新离心 (5 分钟,4℃,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 β 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 1O)。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- β 超家族配体在 β 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 β 地中海贫血中的失效脾红细胞发生。

[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 β 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 α -珠蛋白和两个 β -珠蛋白亚基组成的四聚体蛋白质) 的产生。 β 地中海贫血是一种常见的遗传性血红蛋白病, 其特征在于 β -珠蛋白基因产生受损或缺乏, 继而非配对的 α -亚基蓄积。成熟中的类红细胞中过量的未结合的游离 α -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 β 地中海贫血相关的无效红细胞发生中 TGF- β 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 tunel 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(且在小得多的程度上的激活素 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- β 家族成员可能涉及 β 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 α RBC 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- β 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 μ g/mL mActRIIA-Fc 包被 (图 7A)。将递增剂量的重组 GDF11 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,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 μ g/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 μ 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	MGAAAKLAFVFLISCSGAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEMEVTQPTSNPVTPKPPYYNILLYSVPLMLIAGIVICAFWVYRHHKMAYPPVLVPTQDPGPPPSPLLGLKPLQLLEVKARGFGCVWKAQLNEYVAVKIFPIQDKQSWQNEYEYVYSLPGMKHENILQFIGAEKRGTSVDVDLWLITAFHEKGSLSDFLKANVVSWNELCHIAETMARGLAYLHEDIPGLKDGHKPAISHRDIKSNVLLKNNLTACIADFGALKFEAGKSAGDTHGQVGTTRRYMAPEVLEGAINFQDAFLRIDMYAMGLVLWELASRCTAADGPVDEYMLPFEEEEIQHPSEDMQEVVVKKKRPVLRDYWQKHAGMAMLCETIEECWDHDAEARLSAGCVGERITQMQRLTNIITTEDIVTVVTMVTNVDFPPKESL
2	人 ActRIIA 可溶性(胞外)加工的多肽序列	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEMEVTQPTSNPVTPKPP
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	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDINCYDRDTCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPPEM

[0232]

SEQ ID NO:	描述	序列
4	编码人 ActRIIA 前体蛋白的核酸序列	ATGGAGCTGCTGCAAAAGTTGGCGTTTGCCGTCTTTCTTATCTCCTGTTC TTCAGGTGCTATACTTGGTAGATCAGAAACTCAGGAGTGTCTTTTCTTTA ATGCTAATTGGGAAAAGACAGAACCAATCAAACTGGTGTGAACCGTGT TATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCAATTGTTTGCTACCTGGGAAGAATAT TTCTGGTTCATTGAAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCA ACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAGACAGCCCTGAAGTA TATTTTGTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTCTTATTT TCCAGAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAATCCAGTTACACCTAAGC CACCTATTACAACATCCTGCTCTATTCTTGGTGCCACTTATGTTAATT GCGGGGATTGTCATTGTGTCATTTTGGGTGTACAGGCATCACAGATGGC CTACCTCCTGTACTTGTTCCACTCAAGACCCAGGACCCACCCACCTT CTCCATTACTAGGGTTGAAACCACTGCAGTTATTAGAAAGTGAAGCAAGG GGAAGATTGTTGTTGTTCTGCTGGAAGCCCAAGTTGCTTAACGAATATGTGGC TGTCAAAATATTTCCAATACAGGACAAACAGTCATGGCAAAATGAATACG AAGTCTACAGTTTGCCTGGAATGAAGCATGAGAACATATTACAGTTCATT GGTGCAGAAAACGAGGCACCAAGTGTGATGTGGATCTTTGGCTGATCAC AGCATTTTCATGAAAAGGGTTCACTATCATCAGACTTCTTAAAGGCTAATGTGG TCTCTTGGAATGAACGTGTGCATATTGCAGAAACCATGGCTAGAGGATTG GCATATTTACATGAGGATATACCTGGCCTAAAGATGGCCACAAACCTGC CATATCTCACAGGGACATCAAAAAGTAAAATGTGCTGTTGAAAACAACCC TGACAGCTTGCAATTGCTGACTTTGGGTTGGCCTTAAATTTGAGGCTGGC AAGTCTCAGGCGATACCCATGGACAGGTTGGTACCCGGAGGTACATGGC TCCAGAGGTATTAGAGGGTGCTATAAACTTCGAAAAGGGATGCATTTTGA GGATAGATATGTATGCCATGGGATTAGTCTCTATGGGAAGTGGCTTCTCGC

[0233]

SEQ ID NO:	描述	序列
		TGTA CTGCTGCAGATGGACCTGTAGATGAATACATGTTGCCATTGAGGA GGAAATTGGCCAGCATCCATCTCTTGAAGACATGCAGGAAGTTGTTGTC ATAAAAAGAGAGCCTGTTTAAAGAGATTATTGGCAGAAACATGCTGGA ATGCCAATGCTCTGTGAACCATTGAAGAATGTTGGGATCACGACGCAGA AGCCAGGTTATCAGCTGGATGTGTAGGTGAAAGAATTACCCAGATGCAGA GACTAACAAATATTATTACCACAGAGGACATTGTAACAGTGTCAACAATG GTGACAAATGTTGACTTCTCCTCCCAAGAATCTAGTCTATGA
5	编码人 ActRIIA 可溶性(胞外)多肽的核酸序列	ATACTTGGTAGATCAGAAACTCAGGAGTGCTTTTCTTTAATGCTAATTG GGAAAGAGACAGAACCAATCAAACTGGTGTGAACCGTGTATGTTGAC A AAGATAACGGCGCATTTGTTGCTACCTGGAAGAATATTCTGTTCC ATTGAAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGA CAGGACTGATTGTGTAGAAAAGAGACAGCCCTGAAGTATATTTTGTGTT GCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTCTTATTTTCCAGAGATG GAAGTCACACAGCCCACTTCAAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCC
6	包含与 Fc 结构域融合的可溶性胞外域的融合蛋白	THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVD(A)VSHE DPEVKFNWYVVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCK(A)VSNKALPVPPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGPFPLYSKLTVDKSR WQQGNVVFSCVMHEALHN(A)HYTQKSLSPGK*
7	与人 Fc 结构域融合的人 ActRIIA 的胞外	ILGRSETQECLFFENANWEKDRNTQGTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGS IEIVKQGCWLDDINCYDRITDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPFEM EVTQPTSNPVTPKPTGGTHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV

[0234]

SEQ ID NO:	描述	序列
	域	SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSGGS FFLYSKLLTVDKSRWQQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK MKFLVNVALVFMVVYISYIYA
8	蜜蜂蜂毒肽的前 导序列(HBML)	
9	组织纤溶酶原激 活物(TPA)的前 导序列	MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSP
10	天然 ActRIIA 前 导序列	MGAAAKLAFVFLISCSSGA
11	ActRIIA-hFc 和 ActRIIA-mFc N 端序列	ILGRSETQE
12	ActRIIA 胞外域 C 端 15 个氨基酸 缺失的 ActRIIA-Fc 蛋白 质	ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGS IEIVKQGCWLLDDINCYDRITDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFP TGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPVPPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
13	具有 TPA 前导序	MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRITNQT GVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLLDDINCYDRITDCVEKK

[0235]

SEQ ID NO:	描述	序列
	列的未加工的 ActRIIA-hFc	DSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTTPKPPTGGGTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PVPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	编码具有 TPA 前导序列的未加工的 ActRIIA-hFc 的核酸序列	ATGGATGCAATGAAGAGAGGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGTGTGGAGC AGTCTTCGTTTCGCCCGCGCGCTATACTTGGTAGATCAGAACTCAGG AGTGTCTTTTAAATGCTAATTGGGAAAGACAGAACCAATCAAACTG GTGTTGAACCGTGTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATGTTTGTCT ACCTGGAAGAATAATTCTGTTCCATTGAATAGTGAAACAAGTTGTTGG CTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAGA CAGCCCTGAAGTATATTCTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAA AGTTTCTTATTTCCGGAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAATCCA GTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGAACCTCACACATGCCACCGTG CCCAGCACCTGAACCTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAA AACCAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAATGCGGTG GTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG T GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG T ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCTCACCCTCCTGCACACGAGAC TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCTCCAAACAAGCCCTCC C

[0236]

SEQ ID NO:	描述	序列
		AGTCCCATCGAGAAACCATCTCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA C CACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAACCA G GTCAGCCTGACCTGCCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAACGCCT C CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAATGAGAAATTC ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELV KKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGP EVTYEPPP
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	

[0237]

SEQ ID NO:	描述	序列
16	人 ActRIIB 前体蛋白序列(A64)	MTAPWVALALLWGSW PGSGRGEAETRECIY NANWELERTNQSLER CEGEQDKRLHCYASWA NSSGTIELVKKGCWLD DFNCYDRQECVATEEN PQVYFCCCEGNFCNER FTHLPEAGGPEVTYEP PPTAPTLLTVLAYSLL PIGGLSLIVLLAFWMY RHRKPPYGHVDIHEDP GPPPPSPLVGLKPLQL LEIKARGRFGCVWKAQ LMNDFVAVKIFPLQDK QSWQSEREIFSTPGMK HENLLQFIAAEKRGSN LEVELWLITAFHDKGS LTDYLGKGNITWNELC HVAETMSRGLSYLHED VPWCRGEGHKPSIAHR DFKSKNVLLKSDLTAV LADFGLAVRFEFGKPP GDTHGQVGTTRYMAPE VLEGAINFQRDAFLRI DMYAMGLVLWELVSRG KAADGPVDEYMLPFEE EIGQHPSLEELQEVVV HKKMRPTIKDHWLKHG GLAQLCVTIEECWDHD AEARLSAGCVEERVSL IRRSVNGTTSDCLVSL VTSVTNVLDLPKESI SGRGEAETRECIYNNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWLDNFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPT
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)	
18	C 端 15 个氨基酸缺失的人 ActRIIB 可溶性(胞外)加工的多肽序列(SEQ ID	SGRGEAETRECIYNNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWLDNFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE A

[0238]

SEQ ID NO:	描述	序列
19	NO:16 的氨基酸 19-119) 编码人 ActRIIB (A64) 前体蛋白 的核酸序列	ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGGCC CGGCTCTGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGTCATCTACTACAAC G CCAACTGGAGCTGGAGCGCACCAACCAAGAGCGGCCCTGGAGCGCTGCGA A GGCGAGCAGGACAAAGCGGCTGCACTGCTACGCCCTCCTGGGCCAACAGCT C TGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACT GCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAAACCCCAAGGTGTA C TTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCTTCACTCATTTGCC AGAGGCTGGGGGCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCGACAGCCCCC A CCCTGCTACGGTGTGGCCTACTCACTGCTGCCCATCGGGGGCCTTTCC CTCATCGTCCCTGCTGGCCTTTTGGATGTACCGGCATCGCAAGCCCCCTA CGGTCAATGTGGACATCCATGAGGACCCCTGGGCCCTCCACCACCATCCCCTC TGGTGGCCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAAGGCTCGGGGGCG C TTTGGCTGTGTCTGGAAGGCCCCAGCTCATGATGACTTTGTAGCTGTCAA GATCTTCCCACTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAGTGAACGGGAGATCT TCAGCACACCTGGCATGAGCACGAGAACCTGCTACAGTTTCATTGCTGCC GAGAAGCGAGGCTCCAAACCTCGAAGTAGAGCTGTGGCTCATCACGGCCTT

[0239]

SEQ ID NO:	描述	序列
		CCATGACAAGGGCTCCCTCACGGATTACCTCAAGGGGAACATCATCACAT GGAACGAACCTGTGTATGTATGACAGACGATGTCACGAGGCTCTCATAC CTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGCCGTGGCAGGGCCACAAGCCGTCTAT TGCCACACAGGACTTTAAAGTAAGAATGTATTGCTGAAGAGCGACCTCA CAGCCGTGCTGGCTGACTTTGGCTTGGCTGTTCGATTTGAGCCAGGGA CCTCAGGGGACACCCACGGACAGGTAGGCACGAGACGGTACATGGCTC C TGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTTCCAGAGAGATGCCCTTCCTGCGCA TTGACATGTATGCCATGGGGTTGGTGTGTGGGAGCTTGTGTCTCGCTGC AAGGCTGCAGACGAGACCCCGTGGATGAGTACATGCTGCCCTTTGAGGAAGA GATTGGCCAGCACCCCTTCGTTGGAGGAGCTGCAGGAGTGGTGGTGCAC A AGAAGATGAGGCCCCACCATTAAAGATCACTGGTTGAAACACCCGGGCCTG GCCAGCCTTTGTGTGACCATCGAGGAGTGTGGACCATGATGCAGAGGC TCGCTTGTCCGGGGCTGTGTGGAGGAGCGGGTGTCCCTGATTCGGAGGT CGGTCAACGGCACTACCTCGGACTGTCTCGTTTCCCTGGTGACCTCTGTC ACCAATGTGACCTGCCCCCTAAAGAGTCAAGCATCTAA SGRGEAETRECIYNNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCHYASWANSSG TIELVKKGCWLDDFNICYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPYEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNNYKTTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
20	包含与 Fc 结构的融合的可溶性胞外域(A64; SEQ ID NO:17)的融合蛋白	

[0240]

SEQ ID NO:	描述	序列
21	包含与 Fc 结构域融合的其 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	SGRGEATRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPVPPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
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 L79D 突变的人 ActRIIB 可溶性(胞外)加工的多肽序列	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELV KKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGP EVTYEPP
23	其 EC 结构域 N	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELV KKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGP

[0241]

SEQ ID NO:	描述	序列
	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	EVTYEPPPT
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	MDAMKRGGLCCVLLLCGAVFVSPGAAETRECIYYNANWELERTNQSLERC EGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTGGGTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVVDGVVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDSGFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK*

[0242]

SEQ ID NO:	描述	序列
	ActRIIB-Fc 融合蛋白	
25	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 突变的加工的 ActRIIB-Fc 融合蛋白	ETRECIYNNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVK KGCWDDDDFNICYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEV TYEPPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSEFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
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)	GRGEAETRECIYNNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWLDDFNICYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPT
27	其 C 端 15 个氨基酸缺失 (SEQ	GRGEAETRECIYNNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWLDDFNICYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE A

[0243]

SEQ ID NO:	描述	序列
	ID NO:16 的氨基酸 20-119) 的人 ActRIIB 可溶性(胞外)加工的多肽序列	
28	人 ActRIIB 前体蛋白序列(R64)	MTAPWVALALLWGSW PGSGRGEAETRECIY NANWELERTNQSLER CEGEQDKRLHCYASWR NSSGTIELVKKGCWLD DFNCYDRQECVATEEN PQVYFCCCEGNFCNER FTHLPEAGGPEVTYEP PPTAPTLTLVLAYSLL PIGLSLIVLLAFWMY RHRKPPYGHVDIHEDP GPPPPSPLVGLKPLQL LEIKARGRFGCVWKAQ LMNDFVAVKIFPLQDK QSWQSEREIFSTPGMK HENLLQFIAAEKRGSN LEVELWLITAFHDKGS LTDYLGKNIITWNELC HVAETMSRGLSYLHED VPWCRGEGHKPSIAHR DFKSKNVLLKSDLTAV LADFGLA VRFEFGKPP GDTHGQVGTTRRYMAPE VLEGAINFQRDAFLRI DMYAMGLVLWELVSRC KAADGPVDEYMLPFEE EIGQHPSLEELQEVVV HKKMRPTIKDHWLKHG GLAQLCVTIEECWDHD AEARLSAGCVEERVSL IRRSVNGTTSDCLVSL VTSVTNVLDLPPKESSI
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)	SGRGEAETRECIYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLD DFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPT

[0244]

SEQ ID NO:	描述	序列
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 TIELVKKGCWLDDFNICYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE 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 TIELVKKGCWLDDFNICYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE 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 TIELVKKGCWLDDFNICYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE A

[0245]

SEQ ID NO:	描述	序列
33	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 突变的人 ActRIIB 可溶性(胞外)加工的多肽序列	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELV KKGCVDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGP EVTYEPPPT
34	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	MDAMKRGLCVLLCGAVFVSPGAAETRECIYYNANWELERTNQSLERC EGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQV YFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTGGGTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPVLDSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYT QKSLSLSPGK*

[0246]

SEQ ID NO:	描述	序列
	有TPA前导序列未加工的ActRIIB-Fc融合蛋白	
35	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突变的加工的ActRIIB-Fc融合蛋白	ETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVK KGCWDDDDFNCYDRQECVATEENPQVVFCCCEGFCNERFTHLPEAGGPEV TYEPPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNAGEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
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)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVVFCCCEGFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPT

[0247]

SEQ ID NO:	描述	序列
	的氨基酸 20-134)	
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)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWDDDFNFCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE 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)	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWDDDFNFCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLTQHQLVNGKEYCKVKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
39	与 Fc 结构域融合的具有 L79D	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSG TIELVKKGCWDDDFNFCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPPELLGG

[0248]

SEQ ID NO:	描述	序列
	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)	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPVLDSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
40	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)	MDAMKRGGLCCVLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYNNANWELERTNQSG LERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVVFCCCEGFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPVLDSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
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(	MDAMKRGGLCCVLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYNNANWELERTNQSG LERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVVFCCCEGFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPTGGGTHTCPPCPAPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

[0249]

SEQ ID NO:	描述	序列
	胞外)加工的多肽序列(SEQ ID NO:16 的氨基酸 20-134)	KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
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	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGT IELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNCNERFTHLPEA GGPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQGGGALWLCLEGAHE
43	具有带 L79D 突变的变异C端序列(公开于WO2007/053775)的人ActRIIB可溶性(胞外)加工的多肽序列	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGT IELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNCNERFTHLPEA GGPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQGGGALWLCLEGAHE
44	用 TGGG 接头与 Fc 结构域融合的具有带 L79D 突	GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGT IELVKKGCWDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNCNERFTHLPEA GGPEGPWASTTIPSGGPEATAAAGDQGGGALWLCLEGAHE TGGGTHTCPPCPAPELLGG

[0250]

SEQ ID NO:	描述	序列
	变的变异C端序列 (公 开 于 WO2007/053775)的人ActRIIB可溶性(胞外)加工的多肽序列	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDSGFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*
45	编 码 SEQ ID NO:24 的核酸序列	ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGCCGA AAC CCGCGAATGT ATTTATTACA ATGCTAATTG GGAACTCGAA CGGACGAACC AATCCGGGCT CGAACGGTGT GAGGGGGAAC AGGATAAACG CCTCCATTGC TATGCGTCGT GGAGGAACTC CTCGGGACG ATTGAACCTG TCAAGAAAGG GTGCTGGGAC GACGATTCA ATTGTTATGA CCGCCAGGAA TGTGTCGCGA CCGAAGAGAA TCCGCAGGTC TATTTCTGTT GTTGCAGGG GAATTTCTGT AATGAACGGT TTACCCACCT CCCCGAAGCC GGCGGGCCCG AGGTGACCTA TGAAACCCCG CCACCCGGTG GTGGAACCTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACCT CCTGGGGGA CCGTCAGTCT TCCCTCTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAACT

[0251]

SEQ ID NO:	描述	序列
		GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCC AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCTCTAT AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAAGAGCC TCTCCCTGTC CCCGGGTAAA TGA
46	包含与 Fc 结构域融合的可溶性胞外域(R64; SEQ ID NO:29)的融合蛋白	SGRGEAETRECIYNNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVVFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGPEVTYEPPTAPTGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPKEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
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) 的可溶性胞外 ActRIIB	SGRGEAETRECIYNNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSG TIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVVFCCCEGNFCNERFTHLPE AGGGTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPVPKEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0252]

序列		
描述	域(R64)的融合蛋白	
SEQ ID NO:		

[0253]

48	全长未加工的前体蛋白 GDF11，即 GDF11 前蛋白质	MVLAAPLLLGFLLLALELRPRGEAAEGP AAAAAAAAAAAAAGVGGERSRPPAPSV APEPDGCPVCVWRQHSRELRLSEIKSQIL SKLRLKEAPNISREVVKQLLPKAPPLQQI LDLHDFQGDALQPEDFLEEDEYHATTET VISMAQETDPAVQTDGSPLCCHFHFSPK VMFTKVLKAQLWVYLRPVPRPATVYLQ ILRLKPLTGEGTAGGGGGGRRHIRIRSLK IELHSRSGHWQSIDFKQVLHSWFRQPQS NWGIEINAFDPSGTDLAVTSLGPGAEG HPFMELRVLENTKRSRRNLGLDCDEHSS ESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYK ANYCSGQCEYMFMMQKYPHTHLVQQAN PRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNDKQQII YGKIPGMVVDRCGCS
49	编码 SEQ ID NO: 48 的核酸序列	ATGGTGCTCGCGGCCCCGCTGCTGCTG GGCTTCCTGCTCCTCGCCCTGGAGCTG CGGCCCCGGGGGGAGGCGGCCGAGGG CCCCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG CGGCGGCGGCAGCGGCGGGGGTCTGGG GGGGAGCGCTCCAGCCGGCCAGCCCC GTCCGTGGCGCCCGAGCCGGACGGCT GCCCCGTGTGCGTTTGGCGGCAGCACA GCCGCGAGCTGCGCCTAGAGAGCATC AAGTCGCAGATCTTGAGCAAAGTGC GCTCAAGGAGGCGCCCAACATCAGCC GCGAGGTGGTGAAGCAGCTGCTGCCC AAGGCGCCGCGCTGCAGCAGATCCT GGACCTACACGACTTCCAGGGCGACG CGCTGCAGCCCGAGGACTTCCTGGAG GAGGACGAGTACCACGCCACCACCGA GACCGTCATTAGCATGGCCCAGGAGAC GGACCCAGCAGTACAGACAGATGGCA GCCCTCTCTGCTGCCATTTTCACTTCAG CCCCAAGGTGATGTTCAAAAGGTACT GAAGGCCAGCTGTGGGTGTACCTACG GCCTGTACCCCGCCCAGCCACAGTCTA CCTGCAGATCTTGCGACTAAAACCCCT AACTGGGGAAGGGACCGCAGGGGGAG GGGGCGGAGGCCGGCGTACATCCGTA TCCGCTCACTGAAGATTGAGCTGCACT CACGCTCAGGCCATTGGCAGAGCATCG ACTTCAAGCAAGTGCTACACAGCTGGT

[0254]

		TCCGCCAGCCACAGAGCAACTGGGGC ATCGAGATCAACGCCTTTGATCCCAGT GGCACAGACCTGGCTGTCACCTCCCTG GGGCCGGGAGCCGAGGGGCTGCATCC ATTCATGGAGCTTCGAGTCCTAGAGAA CACAAAACGTTCCCGGGCGGAACCTGG GTCTGGACTGCGACGAGCACTCAAGC GAGTCCCGCTGCTGCCGATATCCCCTC ACAGTGGACTTTGAGGCTTTCGGCTGG GACTGGATCATCGCACCTAAGCGCTAC AAGGCCAACTACTGCTCCGGCCAGTGC GAGTACATGTTTCATGCAAAAATATCCG CATACCCATTTGGTGCAGCAGGCCAAT CCAAGAGGCTCTGCTGGGCCCTGTTGT ACCCCCACCAAGATGTCCCCAATCAAC ATGCTCTACTTCAATGACAAGCAGCAG ATTATCTACGGCAAGATCCCTGGCATGG TGGTGGATCGCTGTGGCTGCTCT
50	人 GDF11 蛋白的 GDF11 前肽	AEGPAAAAAAAAAAAAAAAAAGVGGERSRP APSVAPEPDGCPVCVWRQHSRELRLESI KSQILSKLRLKEAPNISREVVKQLLPKAP PLQQILDLHDFQGDALQPEDFLEEDEYH ATTETVISMAQETDPAVQTDGSPLCCHF HFSPKVMFTKVLKAQLWVYLRPVPRPA TVYLQILRLKPLTGEGTAGGGGGGRRHI RIRSLKIELHSRSGHWQSIDFKQVLHSWF RQPQSNWGIEINAFDPSGTDLAVTSLGP GAEGLHPFME LRVLN TKRSRR
51	编码 SEQ ID NO: 50 的核酸序列	GCCGAGGGCCCCGCGGCGGCGGCGGC GGCGGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGG GGGTCGGGGGGGAGCGCTCCAGCCGG CCAGCCCCGTCCGTGGCGCCCGAGCC GGACGGCTGCCCCGTGTGCGTTTGGCG GCAGCACAGCCGCGAGCTGCGCCTAG AGAGCATCAAGTCGCAGATCTTGAGCA AACTGCGGCTCAAGGAGGCGCCCAAC ATCAGCCGCGAGGTGGTGAAGCAGCT GCTGCCCAAGGCGCCGCGCTGCAGC AGATCCTGGACCTACACGACTTCCAGG GCGACGCGCTGCAGCCCGAGGACTTC CTGGAGGAGGACGAGTACCACGCCAC CACCGAGACCGTCATTAGCATGGCCCA

[0255]

		GGAGACGGACCCAGCAGTACAGACAG ATGGCAGCCCTCTCTGCTGCCATTTTCA CTTCAGCCCCAAGGTGATGTTACAAA GGTACTGAAGGCCAGCTGTGGGTGTA CCTACGGCCTGTACCCCGCCCAGCCAC AGTCTACCTGCAGATCTTGCGACTAAA ACCCCTAACTGGGGAAGGGACCGCAG GGGGAGGGGGCGGAGGCCGCGTCAC ATCCGTATCCGCTCACTGAAGATTGAG CTGCACTCACGCTCAGGCCATTGGCAG AGCATCGACTTCAAGCAAGTGCTACAC AGCTGGTTCCGCCAGCCACAGAGCAA CTGGGGCATCGAGATCAACGCCTTTGA TCCCAGTGGCACAGACCTGGCTGTCAC CTCCCTGGGGCCGGGAGCCGAGGGGC TGCATCCATTCATGGAGCTTCGAGTCCT AGAGAACACAAAACGTTCCCGGCGG
52	成熟人 GDF11 蛋白	NLGLDCDEHSSESRCRYPLTVDFEAFG WDWILAPKRYKANYCSGQCEYMFQK YPHTHLVQQANPRGSAGPCCTPTKMSPI NMLYFNDKQQIYGKIPGMVVDRCGCS
53	编码 SEQ ID NO: 52 的核酸序列	AACCTGGGTCTGGACTGCGACGAGCA CTCAAGCGAGTCCCGCTGCTGCCGATA TCCCCTCACAGTGGACTTTGAGGCTTT CGGCTGGGACTGGATCATCGCACCTAA GCGCTACAAGGCCAACTACTGCTCCGG CCAGTGCGAGTACATGTTTCATGCAAAA ATATCCGCATACCCATTTGGTGCAGCAG GCCAATCCAAGAGGCTCTGCTGGGCCC TGTTGTACCCCCACCAAGATGTCCCCA ATCAACATGCTCTACTTCAATGACAAG CAGCAGATTATCTACGGCAAGATCCCT GGCATGGTGGTGGATCGCTGTGGCTGC TCT
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

[0256] 8. 等同内容

[0257] 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。

[0258] 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。

[0001]

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> I

<211> 513

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 人ActRIIA前体多肽

<400> I

```
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
```

[0002]

```

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 Gln Thr Ile Gln 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

[0003]

<220>

<223> 人ActRIIA前体

<400> 4

```

atgggagctg ctgcaaaagt ggcgtttgccc gtctttcttta tctctgttgc ttcaggtgct 60
atacttggta gatcagaaac tcaggagtggt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 120
agaaccaate aaactggtgt tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 180
tttgcacact ggaagaatat ttctgttccc attgaaatag tgaacaacag ttgttggctg 240
gatgatata actgctatga caggactgat tggtaganaa aaaaagacag cctgaagta 300
tatttttgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt ttcttattt tccagagatg 360
gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaaag caccctatta caacatcctg 420
ctctattcct tgggtcccact tatgttaatt gcggggattg tcatgtgtgc attttgggtg 480
tacaggcacc acaagatggc ctacctcctt gtacttgttc caactcaaga cccaggacca 540
ccccaccctt ctccattact aggtttgaaa ccactgcagt tattagaagt gaaagcaagg 600
ggaagatttg ttgtgtctg gaaagcccag ttgcttaacg aatatgtggc tgcacaaata 660
tttccaatac aggcacaaac gtcattggca aatgaatacg aagtctacag tttgcttggc 720
atgaagcatg agaacatatt acagttcatt ggtgcagaaa aacgaggcac cagtgttgat 780
gtggatcttt ggtgctatc agcatttcat gaaaagggtt cactatcaga ctttcttaag 840
gcataatgtg tctcttgaa tgaacttgtt catatgcag aaaccttgge tagaggattg 900
gcatacttac atgagatat acctggccta aaagatggcc acaaacctgc catatctcac 960
agggacatca aaagtataaa ttgtctgttg aaaaacaacc tgacagcttg catgtctgac 1020
tttgggttgg ccttaaaatt tgaggctgga aagtcgcag gcgataccca tggacaggtt 1080
ggtaccggga ggtacatggc tccagaggta ttagagggtg ctataaacct cgaaggggat 1140
gcatttttga gcatagatat gtatgcatg ggattagtc tatgggaact ggtctctgc 1200
tgtactgtct cagatggacc tgtatgata tacatgttgc catttgagga ggaatttggc 1260
cagcatccat ctcttgaaga catgcaggaa gttgtgtgct ataaaaaaa gaggcctgtt 1320
ttaagagatt attggcagaa acatgctgga atggcaatgc tctgtgaaac cattgaagaa 1380
tgttgggata acgacgcaga agccaggtta tcagctggat gtgtaggtga aagaattacc 1440
cagatgcaga gactaacaaa tattattacc acagaggaca ttgtaacagt ggtcacaaatg 1500
gtgacaaaatg ttgactttcc tcccaagaa 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

```

atacttggta gatcagaaac tcaggagtggt cttttcttta atgctaattg ggaaaaagac 60
agaaccaate aaactggtgt tgaaccgtgt tatggtgaca aagataaacg gcggcattgt 120
tttgcacact ggaagaatat ttctgttccc attgaaatag tgaacaacag ttgttggctg 180
gatgatata actgctatga caggactgat tggtaganaa aaaaagacag cctgaagta 240
tatttttgtt gctgtgaggg caatatgtgt aatgaaaagt ttcttattt tccagagatg 300
gaagtcacac agcccacttc aaatccagtt acacctaaag cacc 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
20          25          30

```

[0004]

```

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

```

<210> 7
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体 - 与人Fc结构域融合的人ActRIIA的胞外域

```

<400> 7
Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn
   1         5         10        15
Trp Gln Lys Asp Arg Thr Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly
  20        25        30
Asp Lys Asp Lys Arg Arg His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser
  35        40        45
Gly Ser Ile Glu Ile Val Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn
  50        55        60
Cys Tyr Asp Arg Thr Asp Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val
  65        70        75        80
Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr
  85        90        95
Phe Pro Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro
 100        105        110
Lys Pro Pro Thr 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

```

[0005]

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

$\langle 210 \rangle$	8
$\langle 211 \rangle$	21
$\langle 212 \rangle$	PRT
$\langle 213 \rangle$	意蜂

<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

$\langle 210 \rangle$	9
$\langle 211 \rangle$	22
$\langle 212 \rangle$	PRT
$\langle 213 \rangle$	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

$\langle 210 \rangle$	10
$\langle 211 \rangle$	20
$\langle 212 \rangle$	PRT
$\langle 213 \rangle$	未知

<220>
<223> 天然ActRIIA前导

<400> 10
Met Gly 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

〈223〉 合成构建体 - ActRIIA-hFc和ActRIIA-mFc N端序列

<400> II
Ile Leu Gly Arg Ser Glu Thr Gln Glu
1 5

<210>	12
<211>	329
<212>	PRT
<213>	人工序列

合成构建体 - ActRIIA胞外域C端15个氨基酸缺失的ActRIIA-Fe蛋白质

<400> 12
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 Gln Pro Cys Tyr Gly

[0006]

```

      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 Thr 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 Gln 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 Glu 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      320
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      325

```

<210> I3

<211> 369

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体 具有TPA前导序列的未加工的ActRIIA-hFc

<400> I3

```

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

```

[0007]

```

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 Gln 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

```

<210> 14
 <211> 1114
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体 - 编码具有TPA前导序列的未加工的ActR11A-hFc的核酸序列

```

<400> 14
atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcgtt 60
tgcccgcgcg ccgtatact tggtagatca gaaactcagg agtctctttt tttaatgcta 120
attgggaaaa agacagaacc aatcaaaactg gtgttgaacc gtgttatggt gacaaaagata 180
aacggcgcca ttgttttgc tacciggaaga atattctcgg ttcattttaa tagtgaagaa 240
aggttgttgg ctggatgata tcaactgcta tgacaggact gattgtgtag aaaaaaaaga 300
cagccctgaa gtatatctt gttgctgtga gggcaaatatg tgaatgaaa agttttctta 360
ttttccggag atggaagtc caccagccac ttcaaatcca gtacacctt agccaccacc 420
cggtgggtga actcacacat gccacacgtg ccacagacct gaactcttgg ggggaccgtc 480
agtcttcttc ttcccccac aaccacaagg caccctcatg atctcccgga cccctgaggt 540
cacatcgctg gtgttggaag tgagccacga agaccctgag gtaagttaa acttgtaact 600
ggacggcggt gaggtgcata atgccaagac aaagcccgcg gaggagcagt acaacagcac 660
gtacgtgtgt gtcacgttcc tcaccgtctc gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta 720
caagtgcgaag gtctccaaca aagccctccc agtccctccc gagaaaacca tctccaaage 780
caaaaggcag ccccgagAAC cacaggtgtg caaccctgcc ccaccctggg aggagatgac 840
caagaaccag gtacgcttga cctgccttgt caaaggcttc tatcccgagg acatcgccgt 900
ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga 960
ctccgacggc tctctcttcc tctatagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca 1020
ggggaaacgt ttctcatgct ccgtgatgca tgaggtcttg cacaaccact acaagcagaa 1080
gagctctccc ctgtctcggg gtaaatgaga 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ActR11B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 Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Glu
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

```

[0008]

100

105

<210> 16
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>

<223> 人ActRIIB前体蛋白

<400> 16

```

Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala 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 Ala
 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 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 Glu
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

```

[0009]

<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 Glu 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 Glu 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 cgtgtggc cggctctggg 60
cgtggggagg ctgagacacg ggagtgcate tactacaacg ceaactggga gctggagegc 120
accaaccaga gggcctgga gctgtcgaa ggcgagcagg acaagcggt geactgctac 180
gctcctctgg ccaacagctc tggeaccate gactctgtga agaagggtg ctggttagat 240
gaattcaact gctacgatag geaggagtg gtggccactg aggagaacc ccagggtgac 300
ttctgtgtgt gtgaaggcaa ctctgcaac gagegttca ctcatttgcc agaggtggg 360
ggcccgggaag tcacgtacga gccaccccg acagcccca ccctgctcac ggtgtgtgcc 420
tactcactgc tgcctatcgg ggcccttcc ctcctgttcc tctgtgctt ttggatgtac 480
cggcctgcga agccccccta cggctatgtg gacatccatg aggacctgg gctccacca 540
ccatccctc ttgtgggcct gaagccactg cagctgttgg agatcaaggc tcgggggcgc 600
tttggctgtg tctggaagge ccagctcatg aatgaatttg tagctgtcaa gatcttcca 660
ctccaggaca agcagctgtg gcagagtga cgggagatct tcagcacacc tggcatgaag 720
cacgagaacc tgetacagtt cattgtgccc gagaagcgag gctccanct cgaagtagag 780
```

[0010]

```

ctgttgctca tcaaggccctt ccattgacaag ggtccctca eggattacct caaggggaac 840
atcatccat ggaacgaact gtgtcatgta gcagagacga tgtcacgagg cctctcatac 900
ctgcatgagg atgtgccctg gtgccgtggc gagggccaca agccgtctat tccccacagg 960
gactttaaaa gtaagaatgt attgtgaag agcaccfca cagccgtgct ggtgacttt 1020
ggtttgctg ttctgattga gccagggaac cctccagggg acacccacgg acaggtagcc 1080
acgagacggg acatggctcc tgaggtgctc gagggagcca tcaacttcca gagagatgcc 1140
ttctgctgca ttgacatgta tgccatgggg ttggtgctgt gggagcttgt gtctcctgc 1200
aaggtgcag acggaccctg ggatgagtae atgtgccct ttgaggaaga gattggccag 1260
cacccttctg tggaggagct gcaggagggt gtggtgcaca agaagatgag gccaccatt 1320
aaagatcact ggttgaacaa cccgggctg gccacgctt gtgtgacct caggaggtgc 1380
tgggaccatg atgcagagge tctgtgtcc gcggctgtg tggaggagcg ggtgtccctg 1440
attcggagggt cggtaacgg cactacctg gactgtctg ttccctggt gacctctgtc 1500
accaatgtgg acctgccccc taaagagta 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 Gln Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala
1      5      10      15
Asn Trp Glu Leu Gln 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
325    330    335
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340

```

<210> 21

<211> 329

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体 - 包含与Fc结构域融合的其C端15氨基酸缺失的ActRIIB的可溶性胞外域(A64) 的融合蛋白

<400> 21
 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 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
 305 310 315 320
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 22
 <211> 105
 <212> PRT
 <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C端5个氨基酸缺失的氨基酸和具有L79D突变的
 人ActRIIB可溶性(胞外)加工的多肽

<400> 22
 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
 100 105

<210> 23
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0012]

<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 Gln Leu
35     40     45
Val Lys Lys Gly Cys Trp 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 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-Fe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 Gln 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

```

[0013]

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 Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln
50 55 60
Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Glu 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 Glu 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

[0014]

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> 人上序列

<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 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 Gln Ala Gly Gly Pro Gln 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

[0015]

```

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

```

[0016]

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 Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr
 85 90 95
 His Leu Pro Glu Ala
 100

<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 Glu 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> 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
 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
 100

<210> 33
 <211> 107
 <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突变的人ActRIIB可溶性(胞外)加工的多肽序列

<400> 33
 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

[0017]

```

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 Gln Ala Gly
  85          90          95
Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
  100          105

```

<210> 34
 <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-Fe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-Fe融合蛋白

[0018]

<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 Gly Gly 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 Glu
 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 Glu 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
 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> 37
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0019]

<220>

<223> 具有L79D突变的人ActRIIB可溶性(胞外)加工的多肽序列

<400> 37

```

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 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
      115

```

<210> 38

<211> 343

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 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

<400> 38

```

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 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
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
      325           330           335
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      340

```

[0020]

<210> 39
 <211> 343
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 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

<400> 39
 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 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
 Gln 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 Glu 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
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 325 330 335
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340

<210> 40
 <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TPA前导序列的人ActRIIB可溶性(胞外)加工的多肽序列

<400> 40
 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 Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys
 65 70 75 80

[0021]

```

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 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

```

<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 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

```

[0022]

```

225          230          235          240
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Gln 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

```

<210> 42

<211> 141

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有变异C端序列的人ActRIIB可溶性(胞外)加工的多肽序列

<400> 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

```

<210> 43

<211> 141

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 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> 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

```

[0023]

<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 Gln 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 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
 145 150 155 160
 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 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
 225 230 235 240
 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
 305 310 315 320
 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> 具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
 atggatgeaa tgaagagagg gctctgetgt gtctctctgc tgtgtggagc agtctctgtt 60
 tctctctgtt cctctctgtt cctctctgtt atttattaca atgctaatg ggaactegaa 120
 cggacgaacc aatcctgggt cgaacgggtg gagggggaac aggaataac cctctctgtt 180
 tatgctctgt ggaggaact cctctctgtt attgaactgg tcaagaagg gctctctgtt 240
 gaagattca attgttatga cctctctgtt tctctctgtt cgaagagaa tctctctgtt 300
 tatctctgtt gctctctgtt gaattctgtt aatgaacgtt tctctctgtt cctctctgtt 360

[0024]


```

ggcgggcccagggtgacctatgaaccccccccacccgggtgtggaaactcaacatgccca 420
ccgtgccacacactgaactcctgggggggacgtcagttctctctccccccaaaaccc 480
aaggacacccatgatgtcccggaacccctgaggtcacatgctgggtggtggaagtgage 540
cacgaagaccctgagggtcaattcaactggtaactggacgtggaggtgcataatgcc 600
aagacaaagccggggaggagcagttacacagcagctaccgtgtgtgtagcgtctctacc 660
gfctgcacccaggactggctgaatggcaangagtacaaagtgaanggtctcnaacaaagcc 720
ctcccagcccacatcgagaaacacatctccaaagccaaaggcagcccccagaaccacag 780
gtgtacacccctcccccatccggggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgc 840
ctggtaaaagcttttatccacagacatcccggtggagtggagagacaaatgggcagccg 900
gagaacaaactacaagaccacgcctccgtgctggactccgacgtctctctctctctat 960
agcaagctcaacgtggacaaagacaggtggcagcaggggaacgtctctctctatgtctccgtg 1020
atgcattgaggctctgcacaaacactacacgcagaagacccctccctgtccccgggtaaa 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

```

<210> 47
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> 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

[0025]

<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 Gln 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    320
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      15
Glu Leu Arg Pro Arg Gly Glu Ala Ala Glu Gly Pro Ala Ala Ala Ala
20     25     30
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Val Gly Gly Glu Arg Ser
35     40     45
Ser Arg Pro Ala Pro Ser Val Ala Pro Glu Pro Asp Gly Cys Pro Val
50     55     60
Cys Val Trp Arg Gln His Ser Arg Glu Leu Arg Leu Glu Ser Ile Lys
65     70     75     80
Ser Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Lys Glu Ala Pro Asn Ile Ser
85     90     95
Arg Glu Val Val Lys Gln Leu Leu Pro Lys Ala Pro Pro Leu Gln Gln
100    105    110
Ile Leu Asp Leu His Asp Phe Gln Gly Asp Ala Leu Gln Pro Glu Asp
115    120    125
Phe Leu Glu Gln Asp Glu Tyr His Ala Thr Thr Gln Thr Val Ile Ser
130    135    140
Met Ala Gln Gln Thr Asp Pro Ala Val Gln Thr Asp Gly Ser Pro Leu
145    150    155    160
Cys Cys His Phe His Phe Ser Pro Lys Val Met Phe Thr Lys Val Leu

```

[0026]

```

165      170      175
Lys Ala Gln Leu Trp Val Tyr Leu Arg Pro Val Pro Arg Pro Ala Thr
180      185      190
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 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      240
Lys Gln Val Leu His Ser Trp Phe Arg Gln Pro Gln Ser Asn Trp Gly
245      250      255
Ile Gln 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      320
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      400
Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
405

```

<210> 49
 <211> 1221
 <212> DNA
 <213> 未知

<220>
 <223> 全长未加工的前体蛋白GDF11 (GDF11前蛋白质)

```

<400> 49
atggtgctcg cggececgct gctgctgggc ttectgctcc tgccectgga gctgceggccc 60
cggggggagg cggecgaggg ccccgcgcg cggcggcggg cggcggcggg ggccgcagcg 120
gggggggctg ggggggagcg ctccagccgg ccagcccggt ccgltggccc cgagccggac 180
ggctgccccg tgtgcgtttg gggcagcac agcccgagag tgcgcctaga gageatecag 240
tcgcagatct tgagcaaaact gcgcctcaag gaggcgccca acatcagccg cgaggctggg 300
aagcagctgc tgcacaagga gcgcgcgctg cagcagatcc tggacctaca cgacttccag 360
ggcgacgcgc tgcagcccgga ggacttctg gaggaggacg agtaaccacg caccaccgag 420
accgtcaatg gcattgcccc ggagacggac ccagcagtae agacagatgg cagccctctc 480
tgcgtccatt ttacttccag ccccaaggtg atgttcacaa aggtactgaa ggcccagctg 540
tgggtgtacc tacggcctgt accccgccc gccacagtct acctgcagat cttgcgacta 600
aaaccctctaa ctgggggaag gaccgcaggg ggagggggcg gaggcggcg tcacatccgt 660
atccgcctac tgaagattga gctgcactca cgttcaggcc atggcagag catcgacttc 720
aagcaagtgc tacacagctg gtccgcccag ccacagagca actggggcat cgagatcaac 780
gcctttgate ccagtggcac agacctggct gtcacctccc tggggcgggg agccgagggg 840
ctgcattcat tcatggagct tcgagtccta gagaacacaa aacgttccc gggaaccctg 900
ggcttggact gcgacgagca ctcaagcgag tccgctgct gcgatatcc cctcacagt 960
gaatttgagg ctttcggctg ggactggatc atgcacctta agcgtacaa ggccaactac 1020
tgcctcgccc agtgcagatg catgttcatt caaaaatata cgcataccca ttgtgtcgag 1080
caggecaate caagaggctc tgcctggccc tgttgtacce ccaccaagat gtecccaate 1140
aacatgctct actcaatga caagcagcag attatctaag gcaagatccc tggcatgggt 1200
gtggatcgct gttgctgctc 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 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1      5      10      15
Ala Gly Val Gly Gly Glu Arg Ser Ser Arg Pro Ala Pro Ser Val Ala

```

[0027]

```

      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 Gln Asp Phe Leu Gln 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 Gln 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 Gln 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 Gln 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
gccgaggggcc cgcggggggc ggccggggggc gggggggggc cggcagcggc gggggtcggg 60
ggggagcgct ccagccggcc agcccgctcc gtggcgcccg agccggacgg ctgcccgctg 120
tgcgtttggc ggcagcacag ccgcgagctg ccctagaga gcataagtc gcagatcttg 180
agcaaacctgc ggcataagga ggcggcccaac atcagccgcg aggttggtgaa gcagctgctg 240
cccaagggcg cgcgctgca gcagatcttg gacctacacg acttccaggc cgacgcgctg 300
cagcccgagg acttcttgga ggaggacgag taccacgcca ccaccgagac cgtcatttgc 360
atggcccagg agacggaccc agcagtaacg acagatggca gccctctctg ctgccatttt 420
cacttcagcc ccaaggtgat gttcacaaag gtactgaagg cccagctgtg ggtgtacctt 480
cggcctgtac ccgcccagc cacagtctac ctgcagatct tgcgactaaa acccctaact 540
ggggaaggga ccgcaggggg agggggcgga ggcggcgctc acatccgtat ccgctcactg 600
aagattgagc tgcactcagc ctccagccat tggcagagca tcgacttcaa gcaagtgcta 660
cacagctggt tccgcagcc acagagcaac tggggcatcg agatcaacgc ctttgatccc 720
agtggcacag acctggtgtt caccctccctg ggcccgggag ccgaggggct gcattccatt 780
atggagcttc gagtccctaga gaacacaaaa cgttccggcg gg 822

```

<210> 52
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <223> 成熟人GDF11蛋白

```

<400> 52
Asn Leu Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Ser Glu Ser Arg Cys Cys
1      5      10      15
Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile
20     25     30
Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys Glu
35     40     45
Tyr Met Phe Met Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Gln Gln Ala
50     55     60

```

[0028]

```

Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser
65          70          75          80
Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly
85          90          95
Lys Ile Pro Gly Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
100        105

```

<210> 53

<211> 327

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<223> 人GDF11蛋白的GDF11前肽

<400> 53

```

aacctgggtc tggactgcga cgagcactca agcgagtccc getgetgccg atateccctc 60
acagtggact ttgagctttt cggtggggac tggatcatcg caccetaagcg ctacaaggcc 120
aactactgct cgggccagtg cgagtacatg ttcattgcaa aatatccgca taccatttg 180
gtgcagcagg ccaatecaag aggcctctgt gggccctgtt gtacecccaac caagatgtcc 240
ccaatecaac tgcctacttt caatgacaag cagcagatta tctacggcaa gatccctggc 300
atggtggtgg atcgtgtgtg ctgctct
327

```

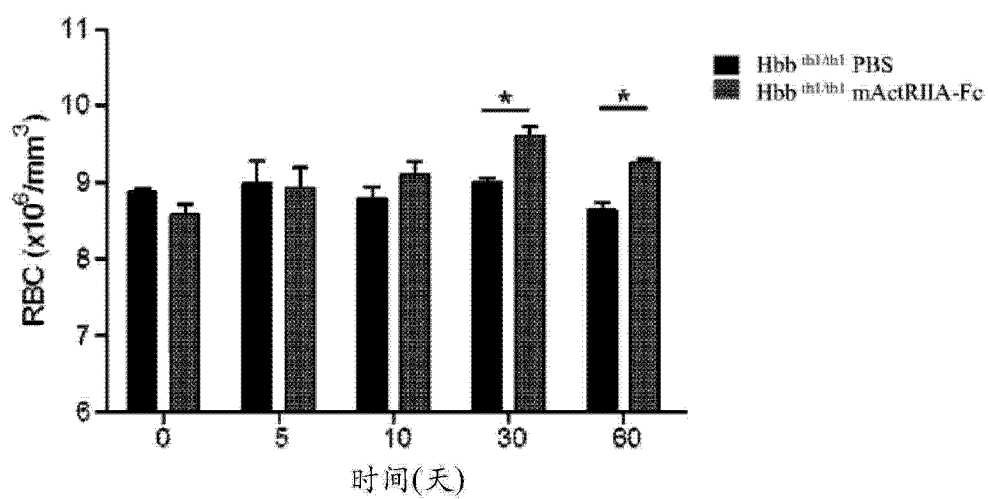


图 1A

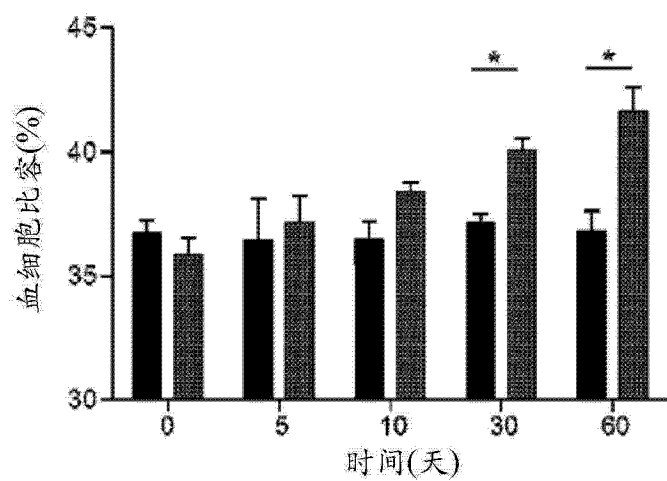


图 1B

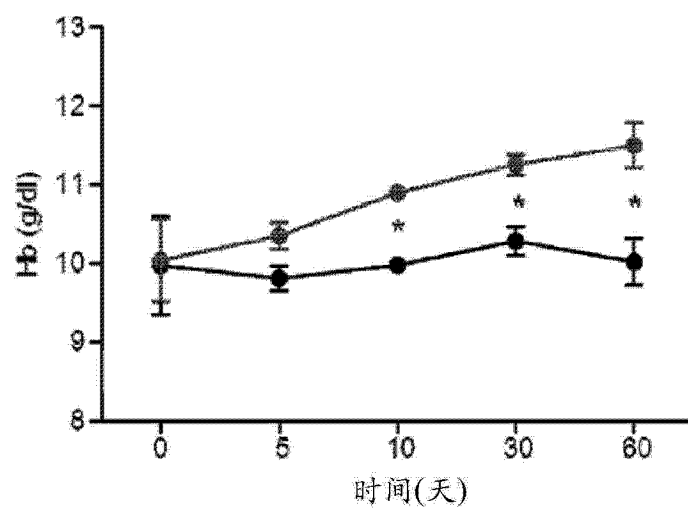


图 1C

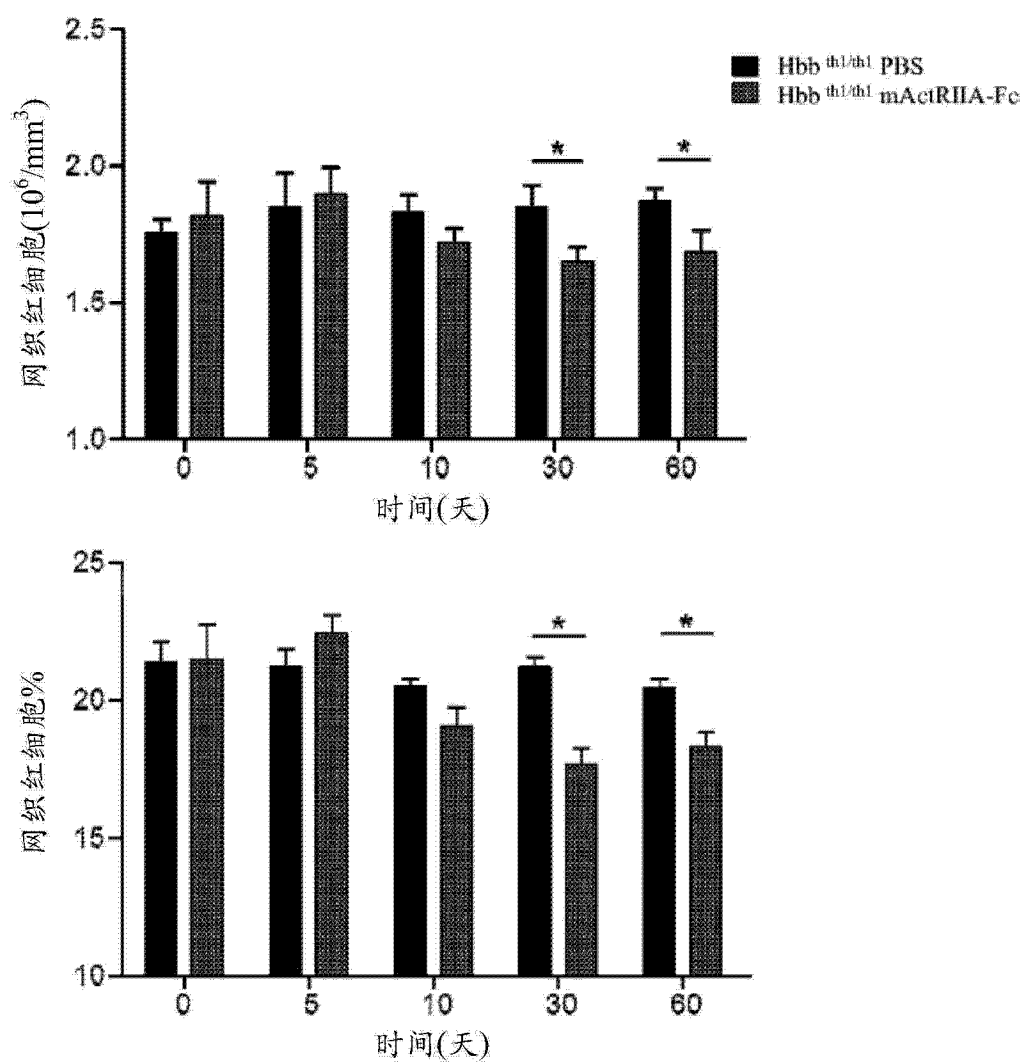


图 1D

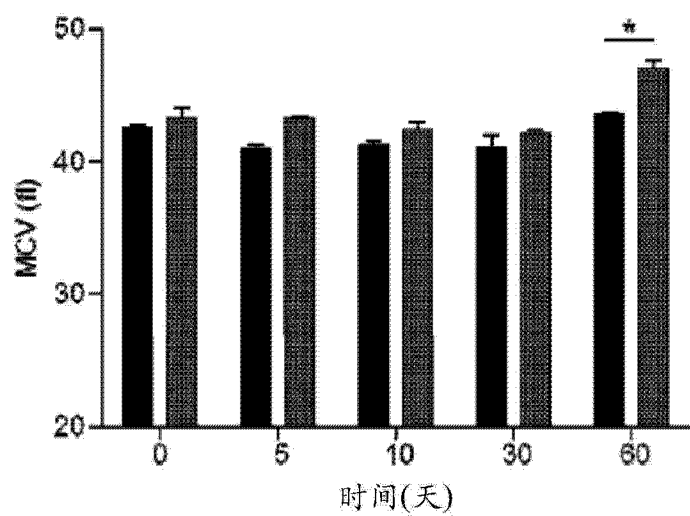


图 1E

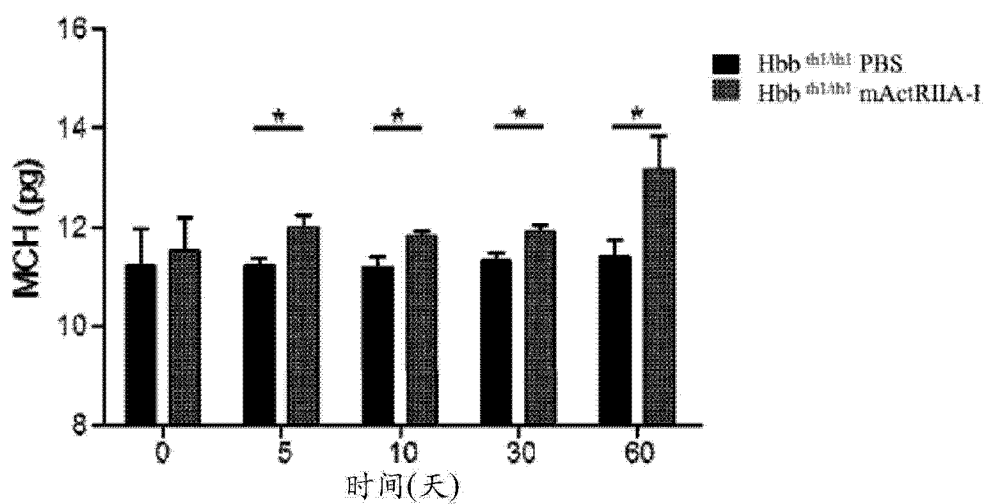


图 1F

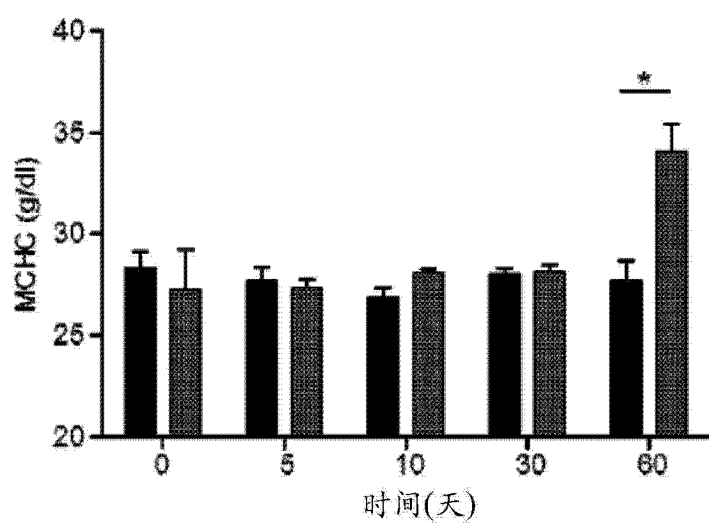


图 1G

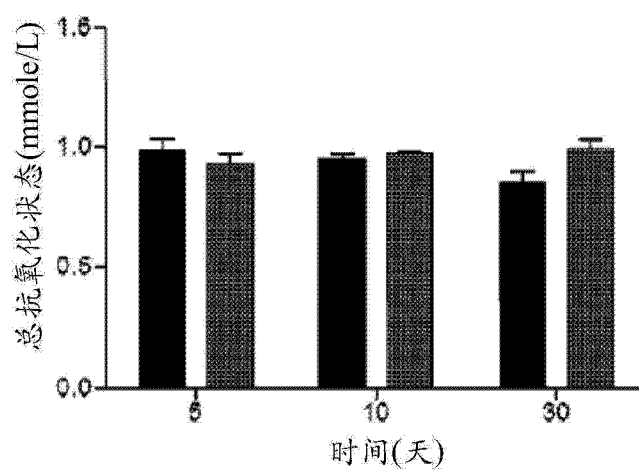


图 1H

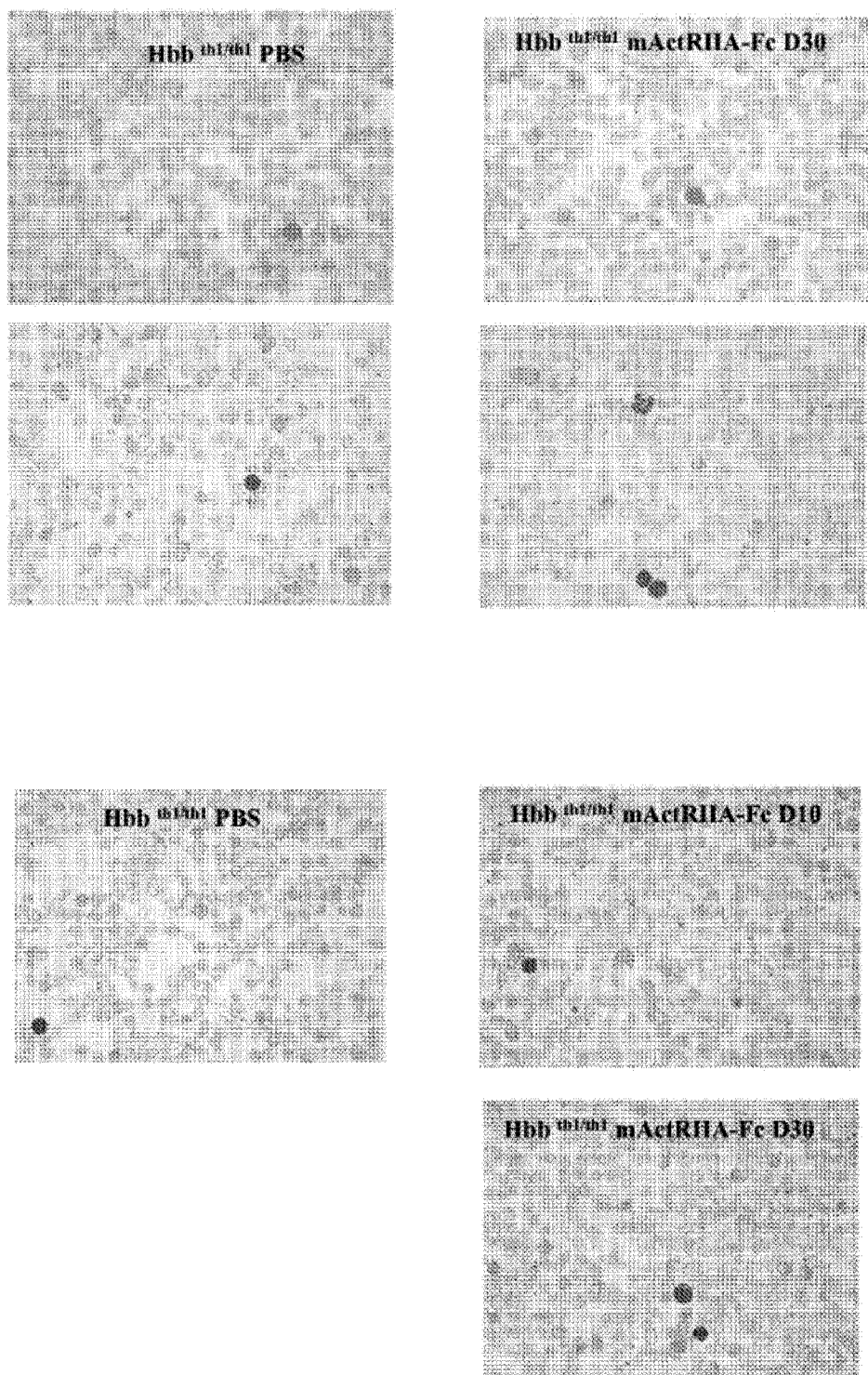


图 11

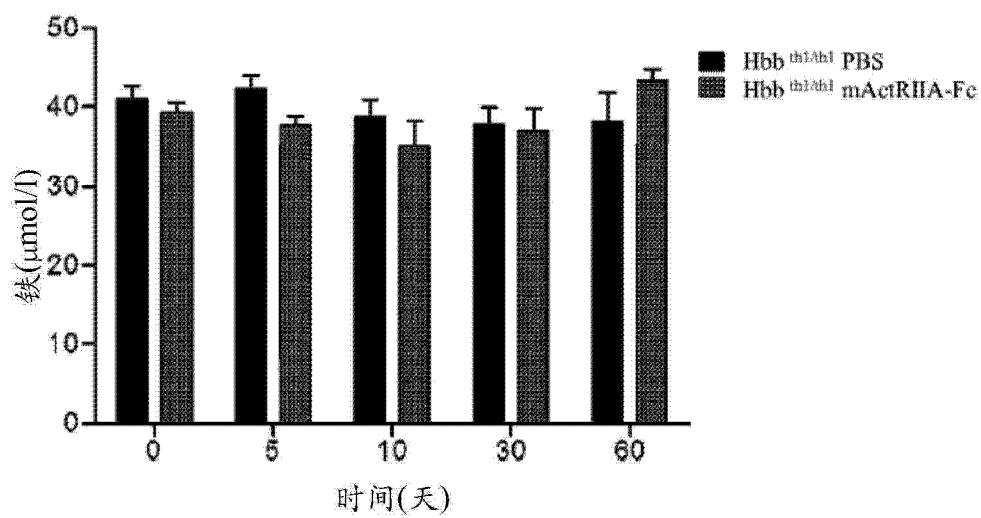


图 1J

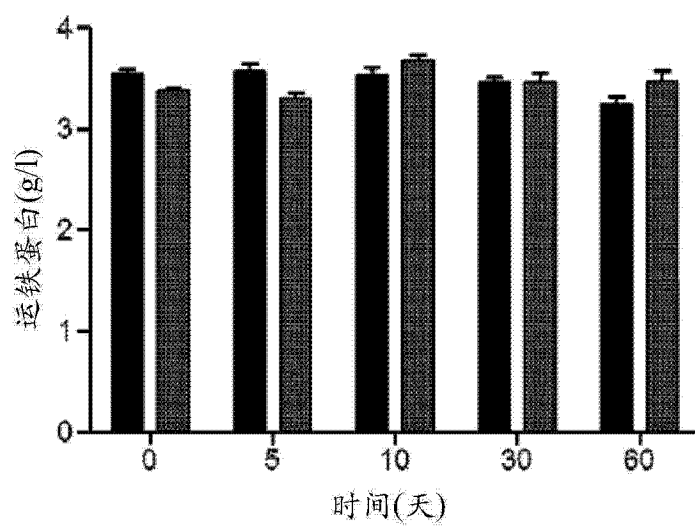


图 1K

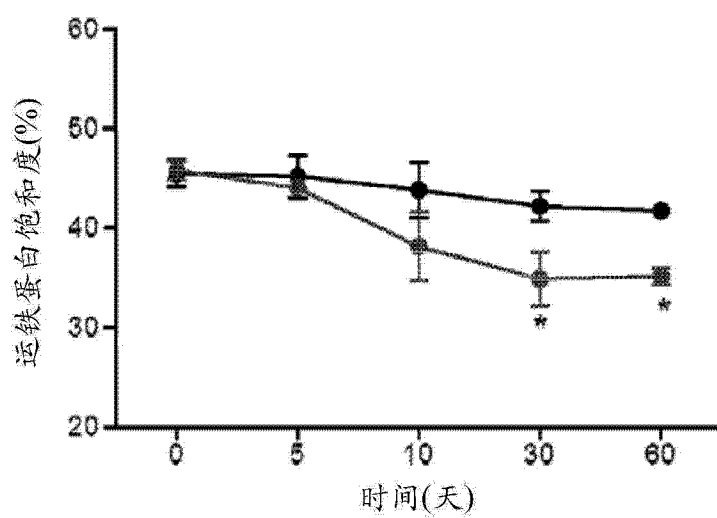


图 1L

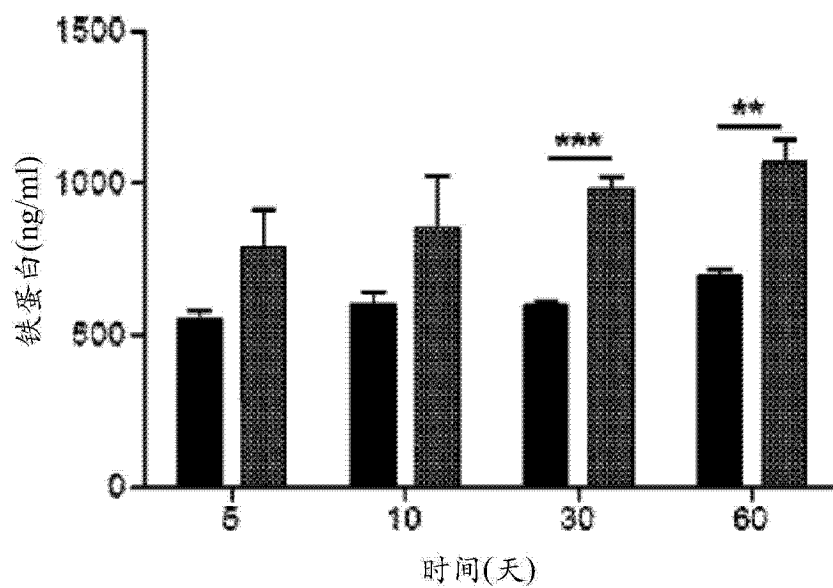


图 1M

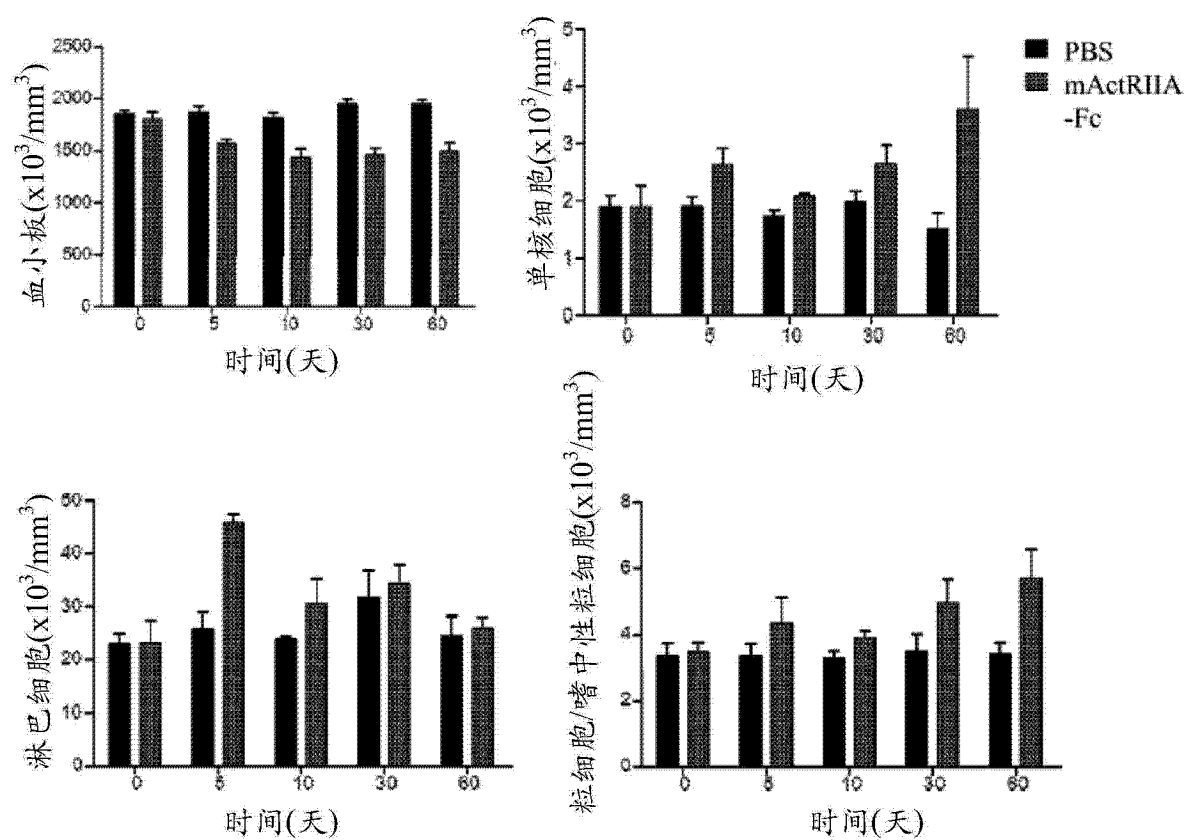


图 1N

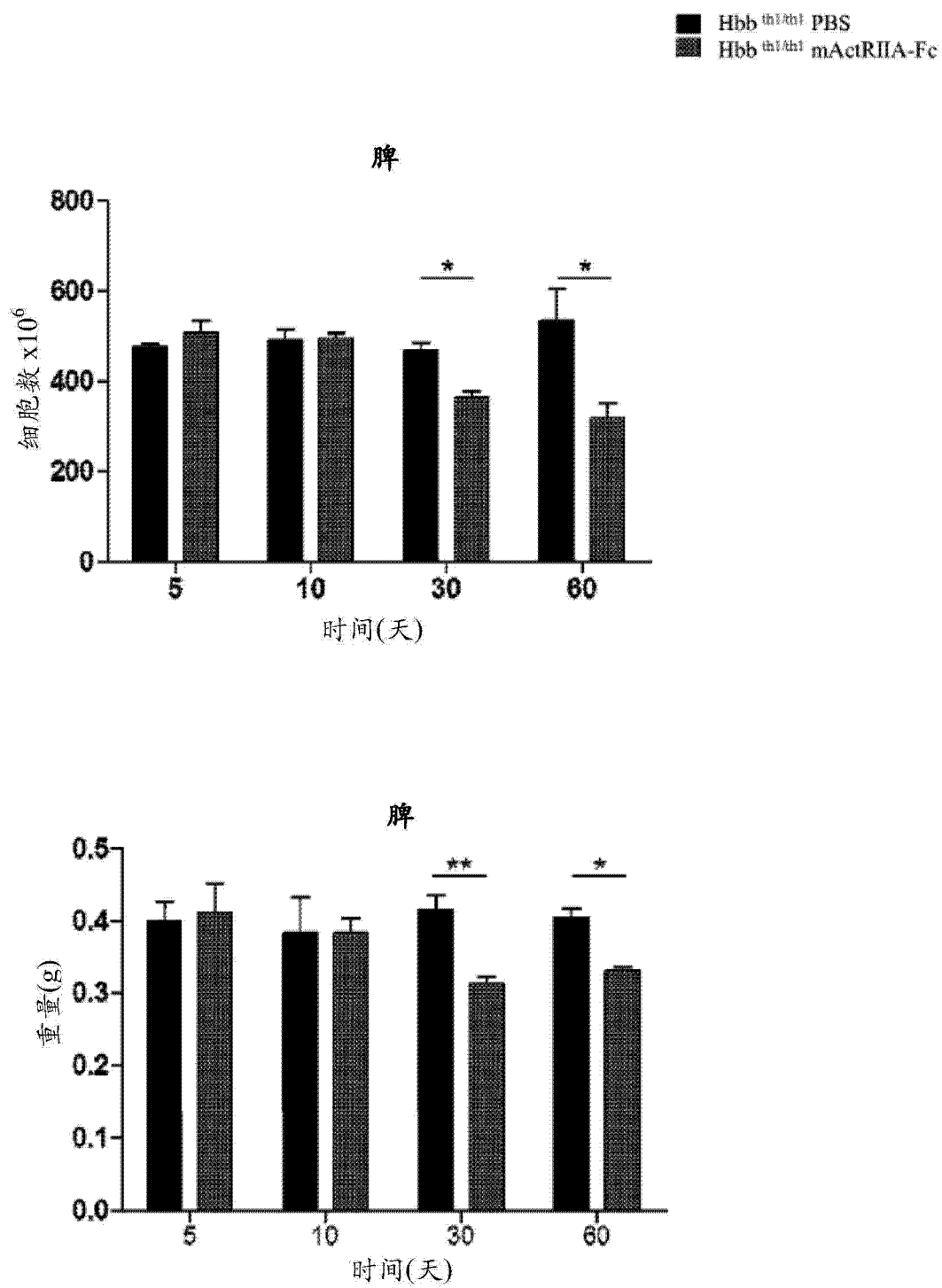


图 10

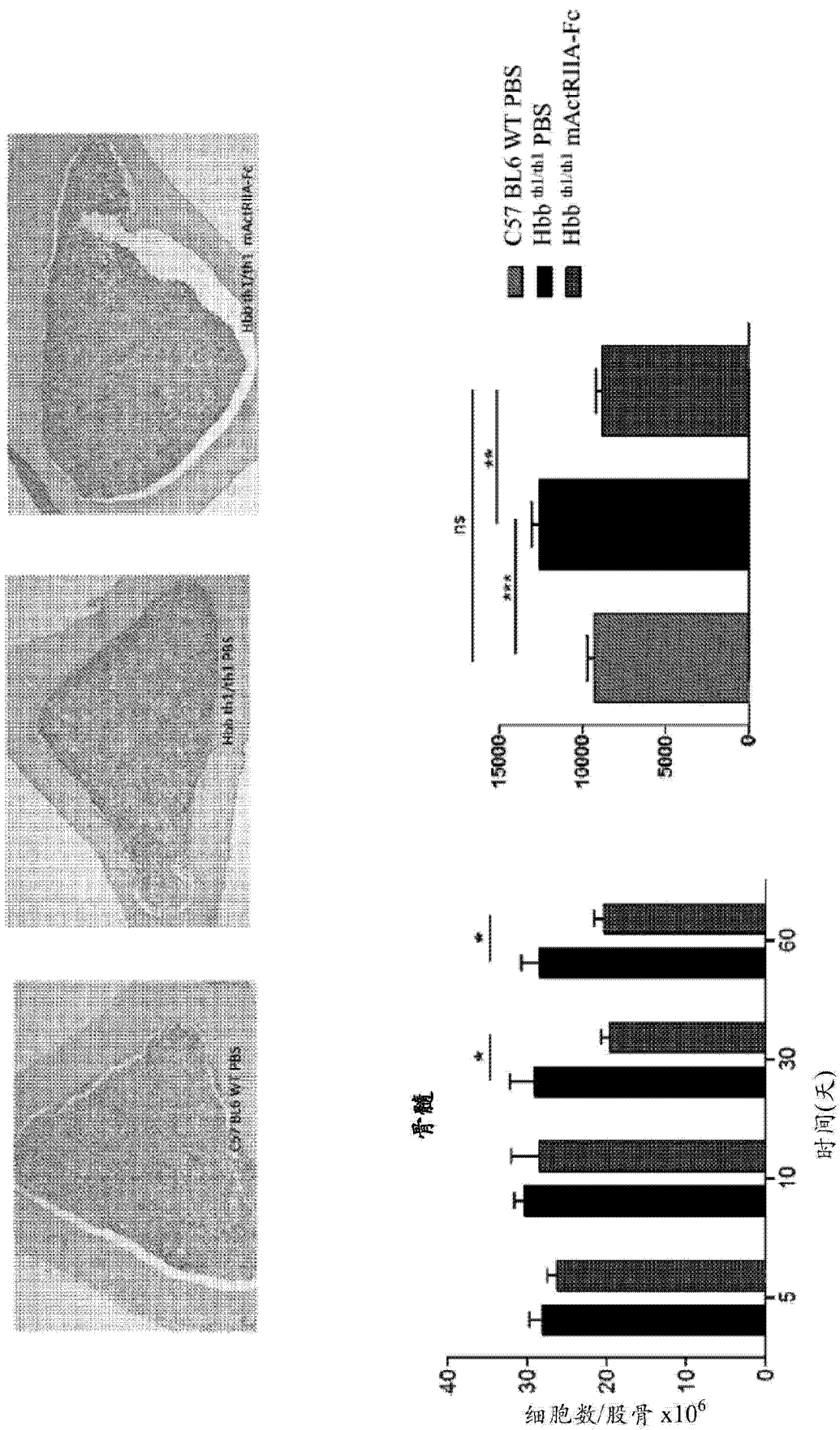


图 1P

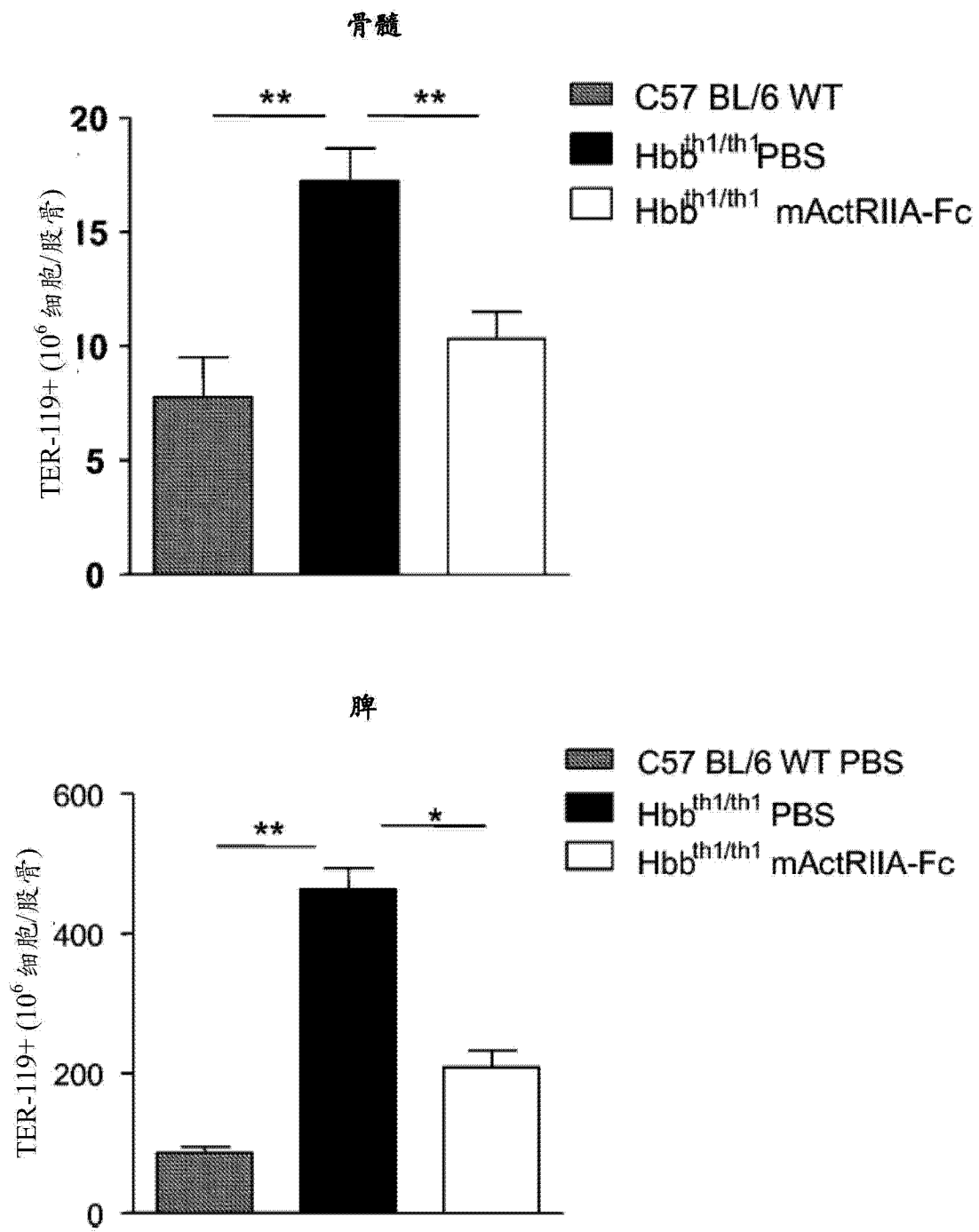


图 1Q

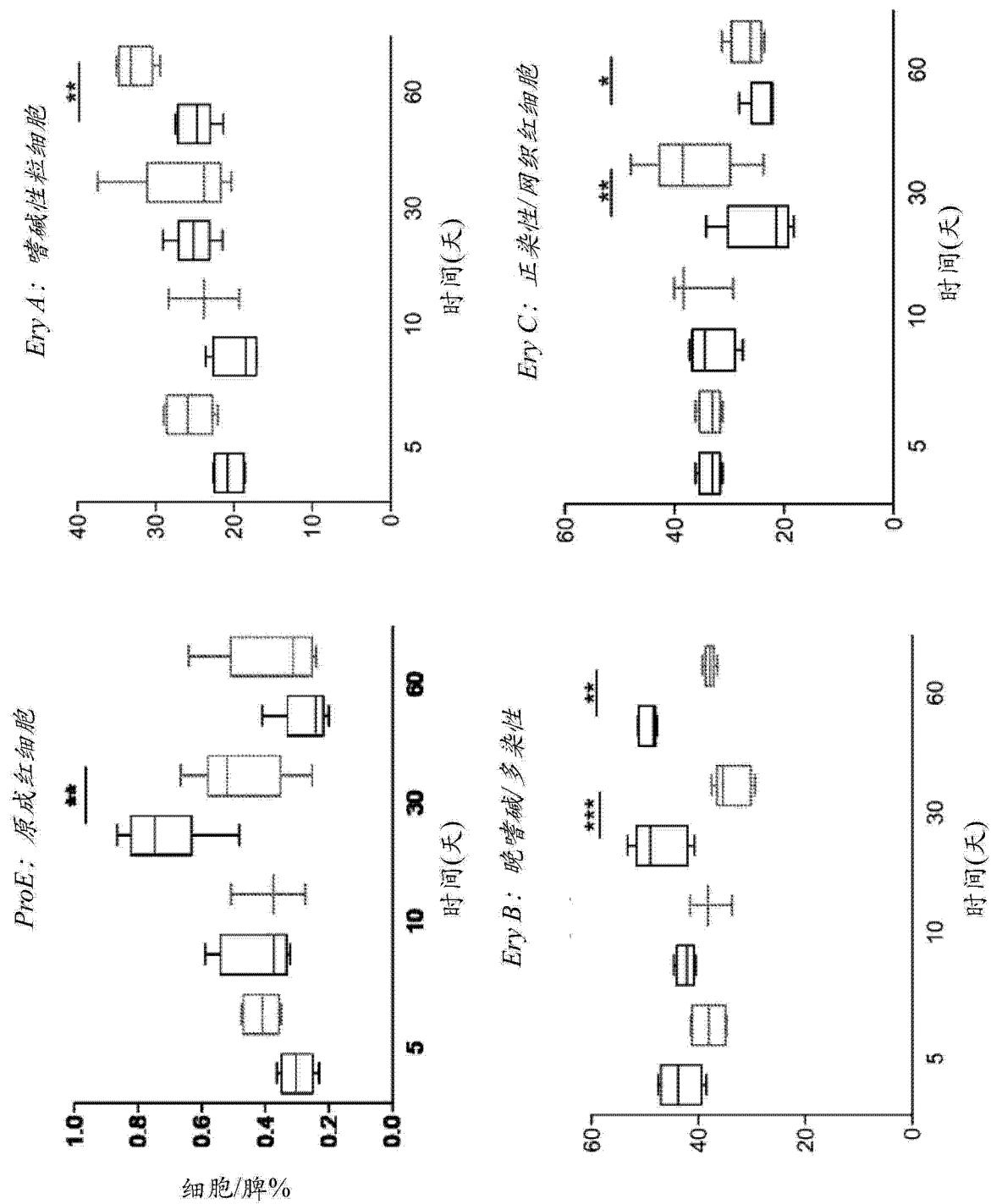


图 2A

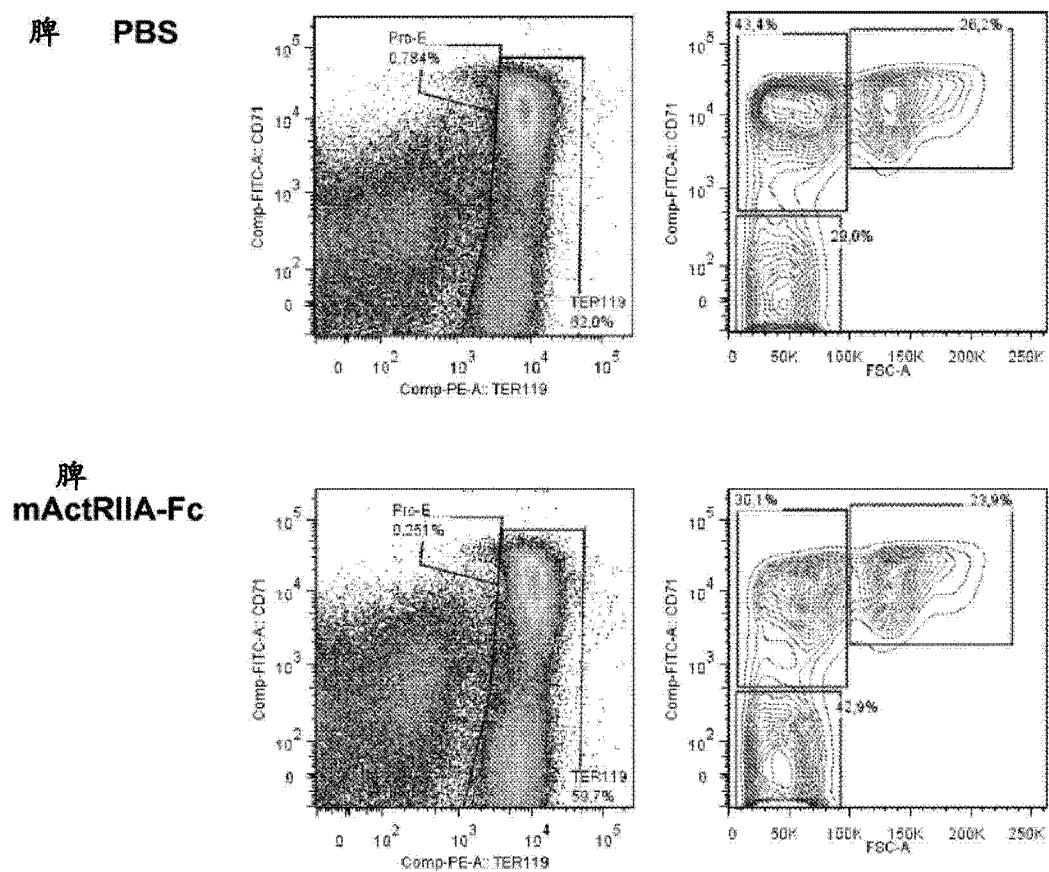


图 2A 续

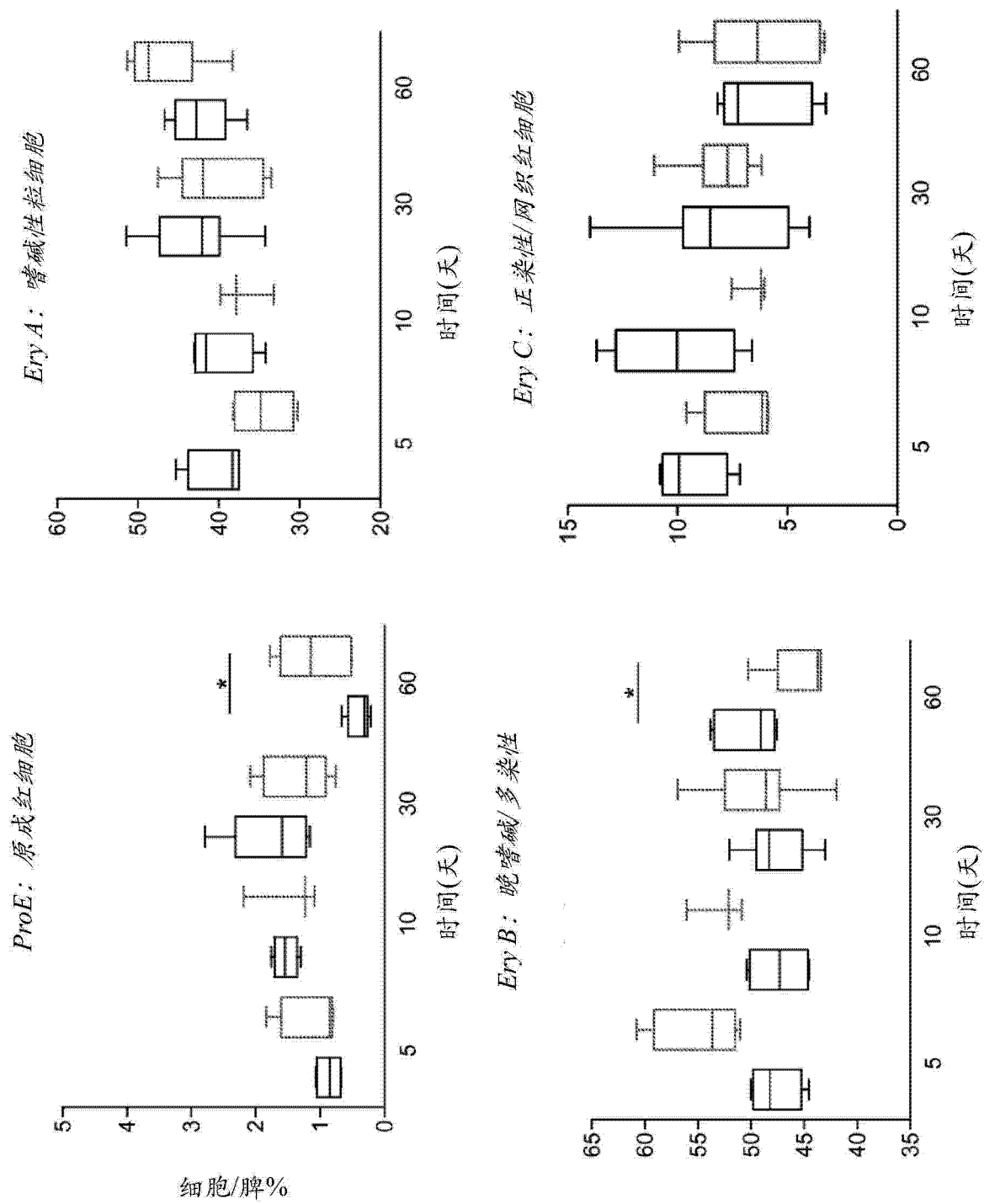


图 2B

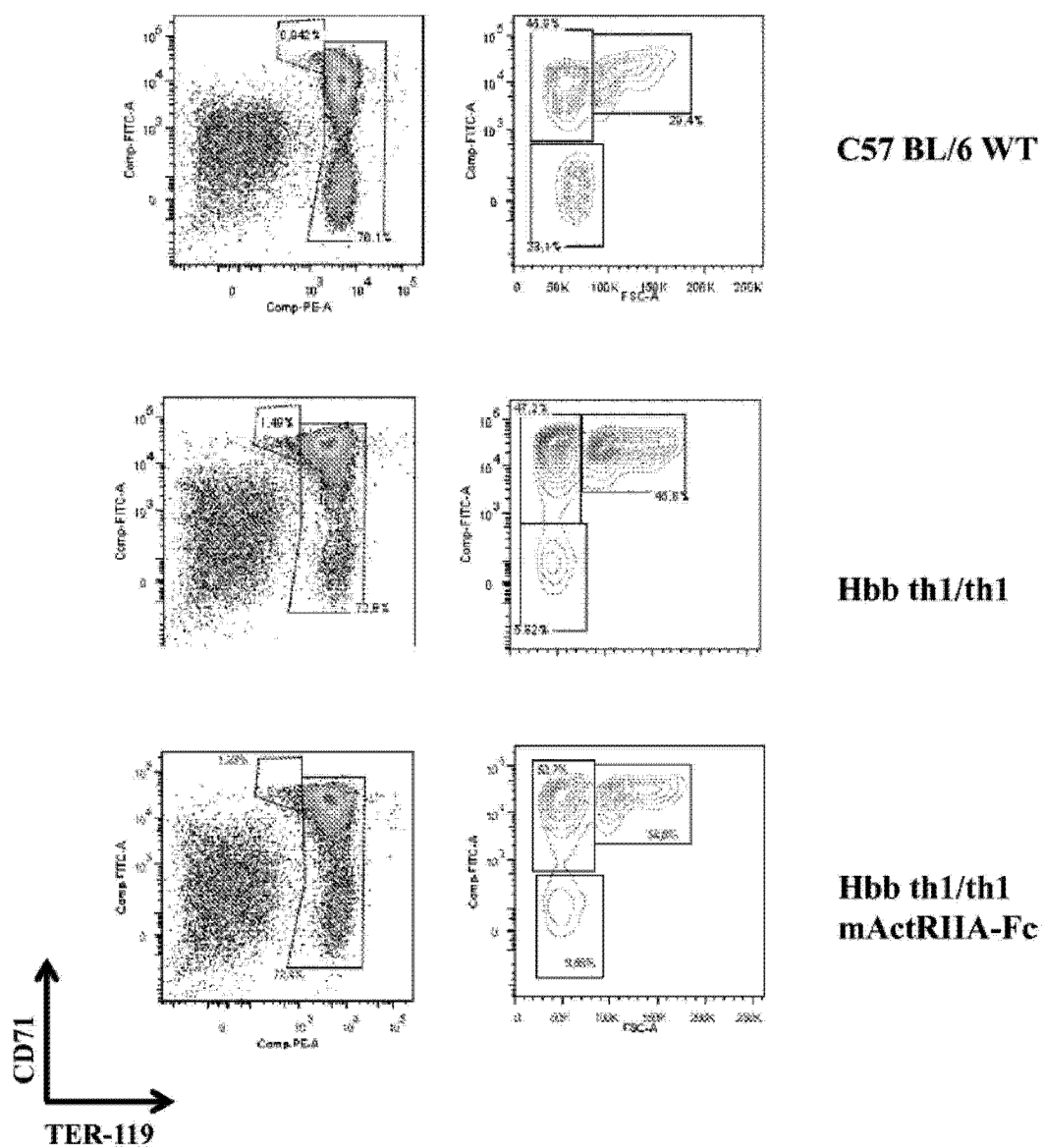


图 2B 续

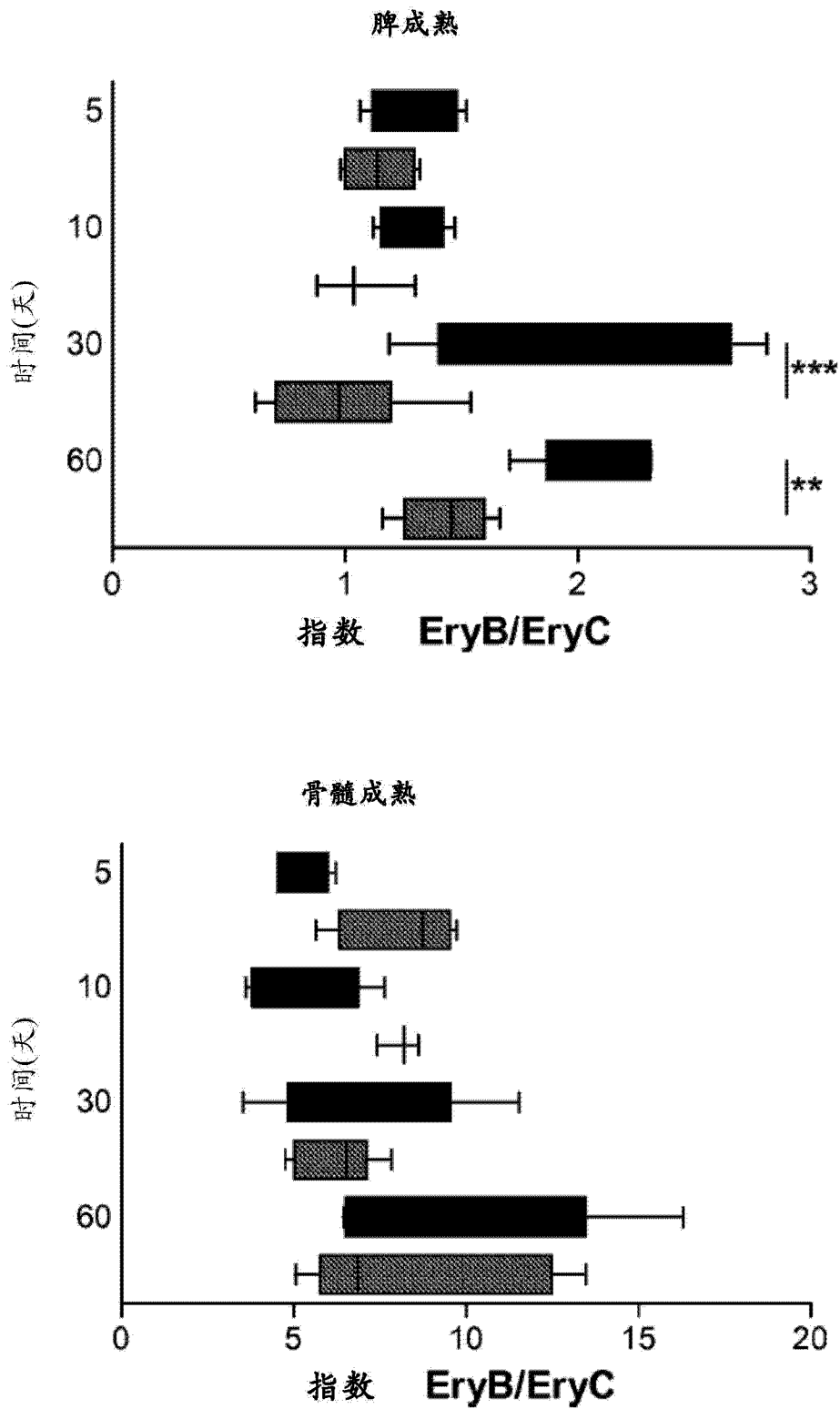


图 2C

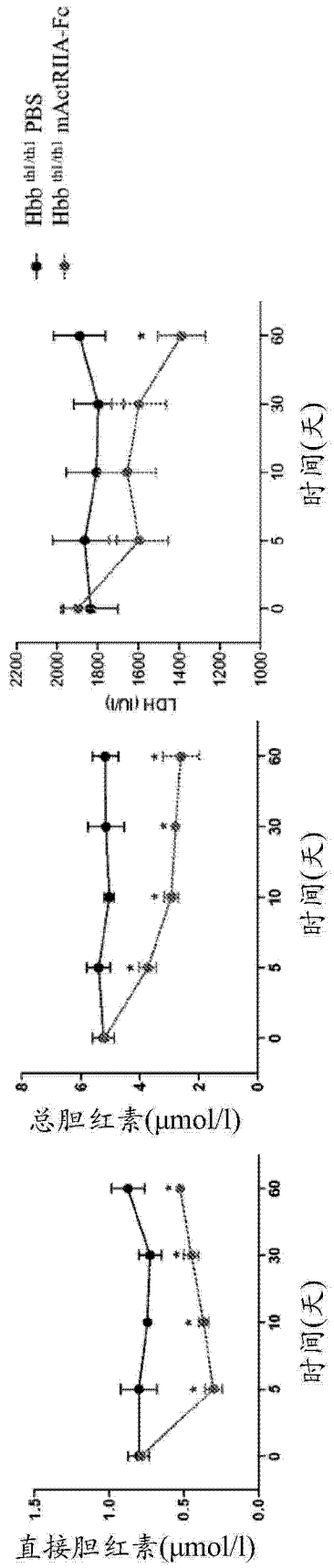


图 2D

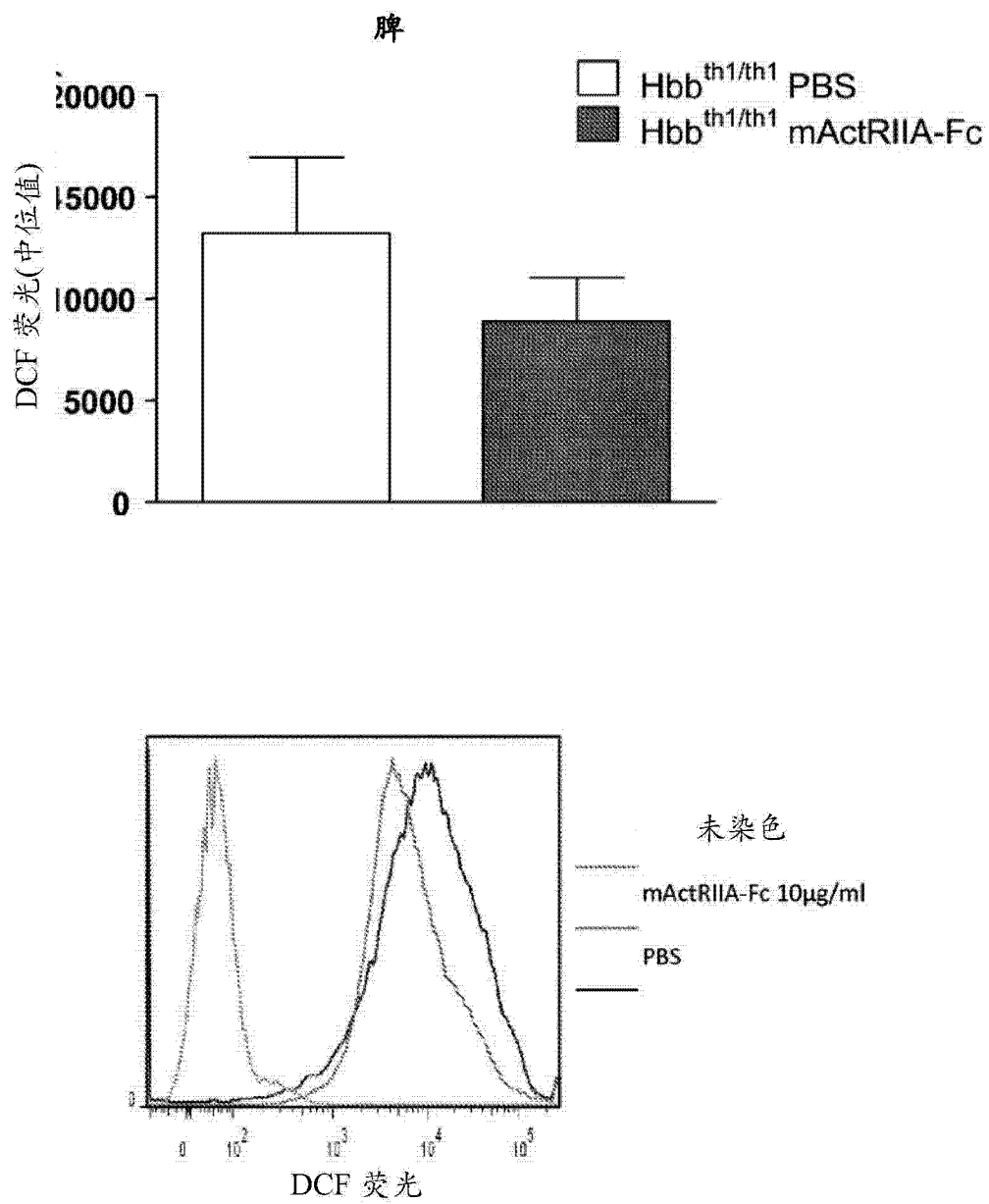


图 2E

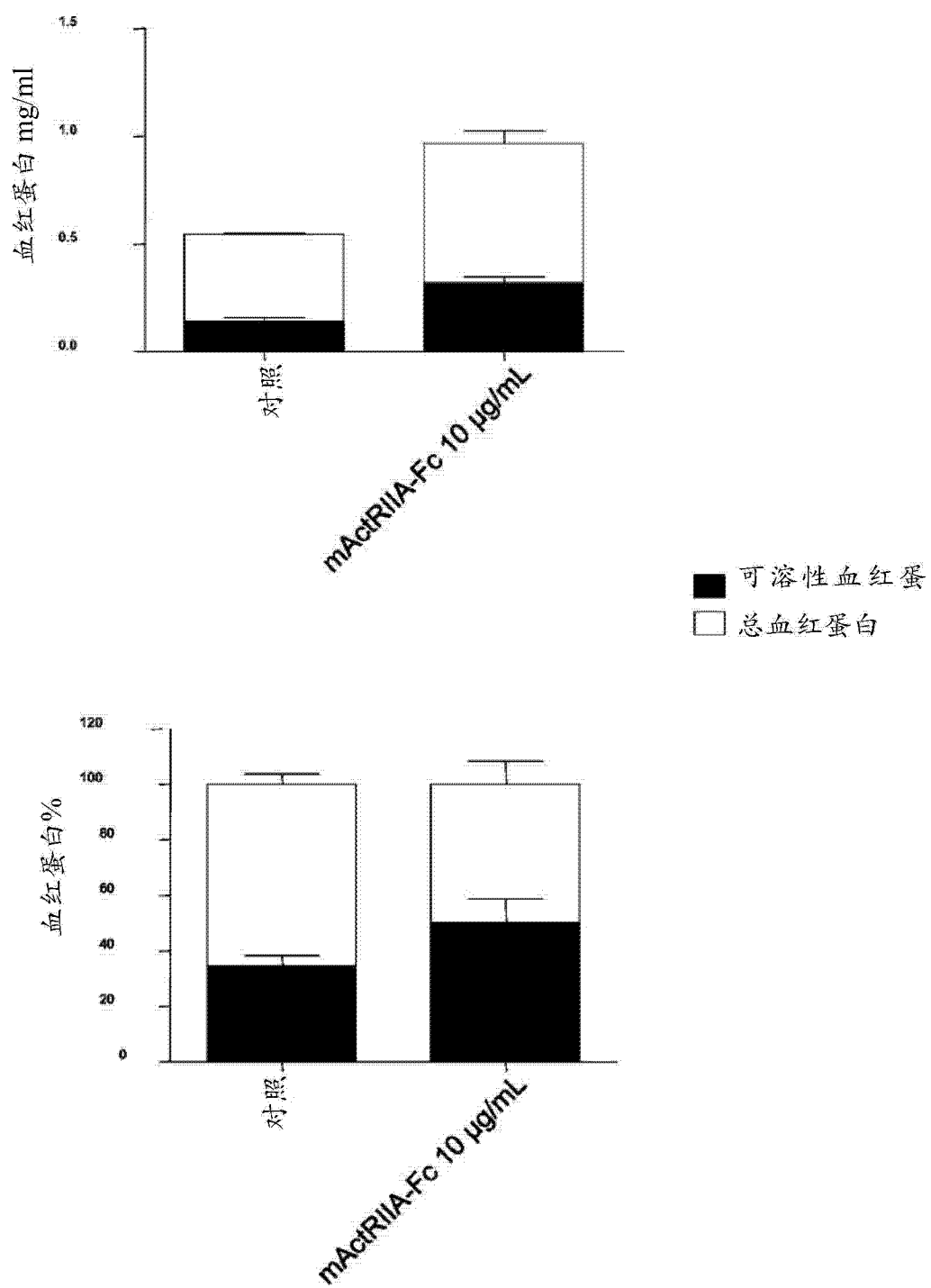


图 2F

骨髓

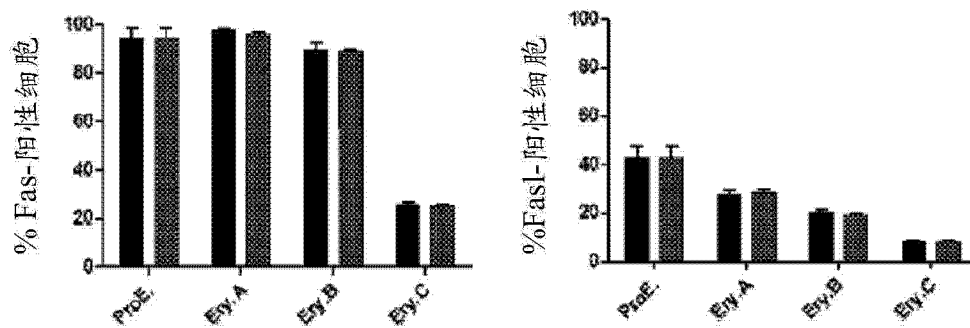


图 3A

脾

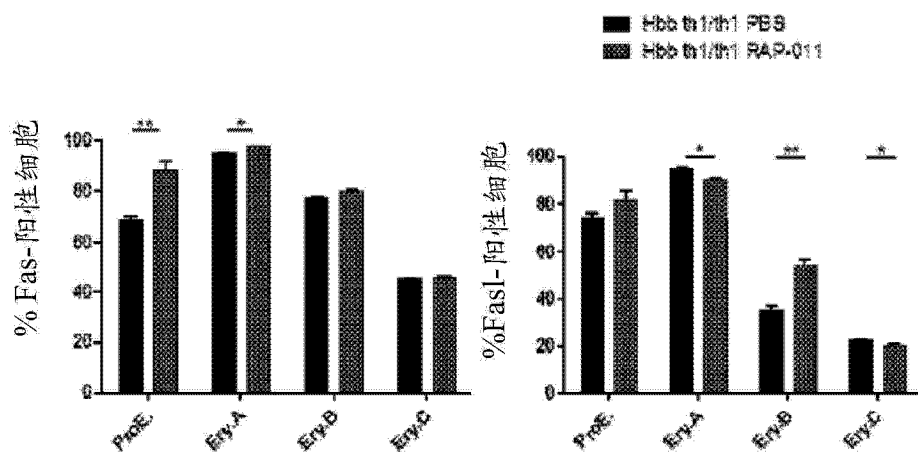


图 3B

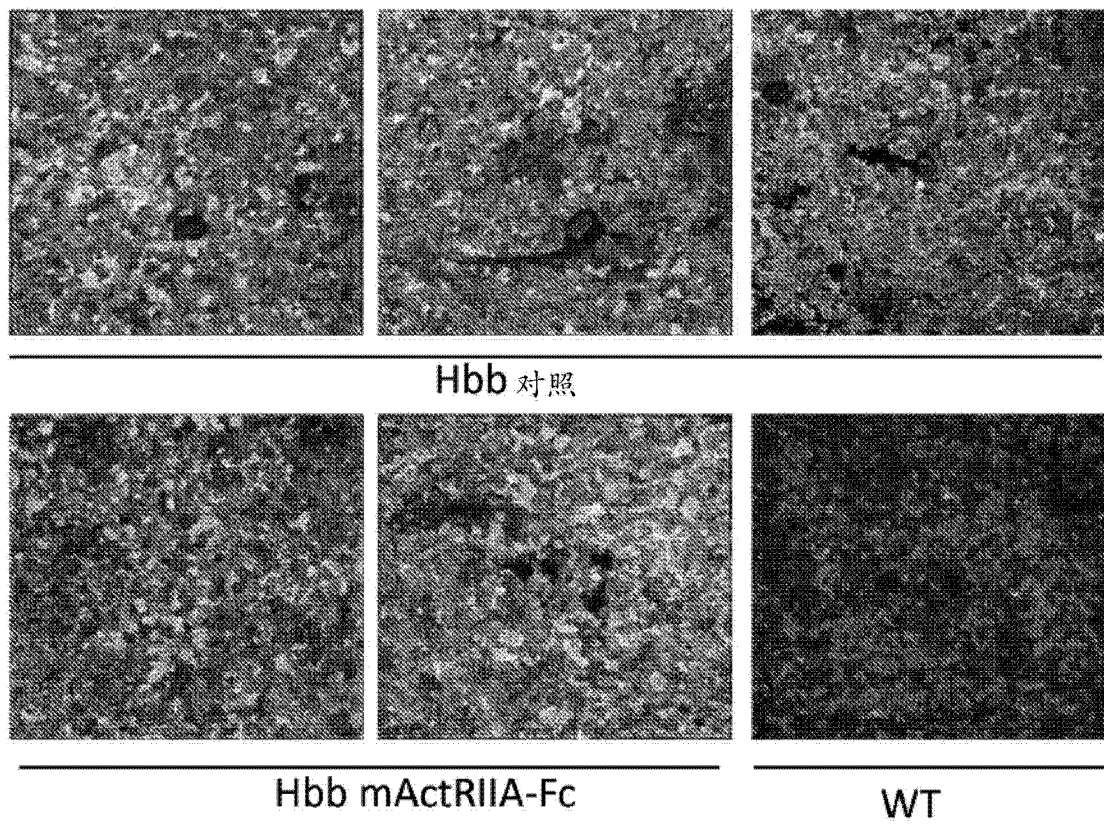


图 3C

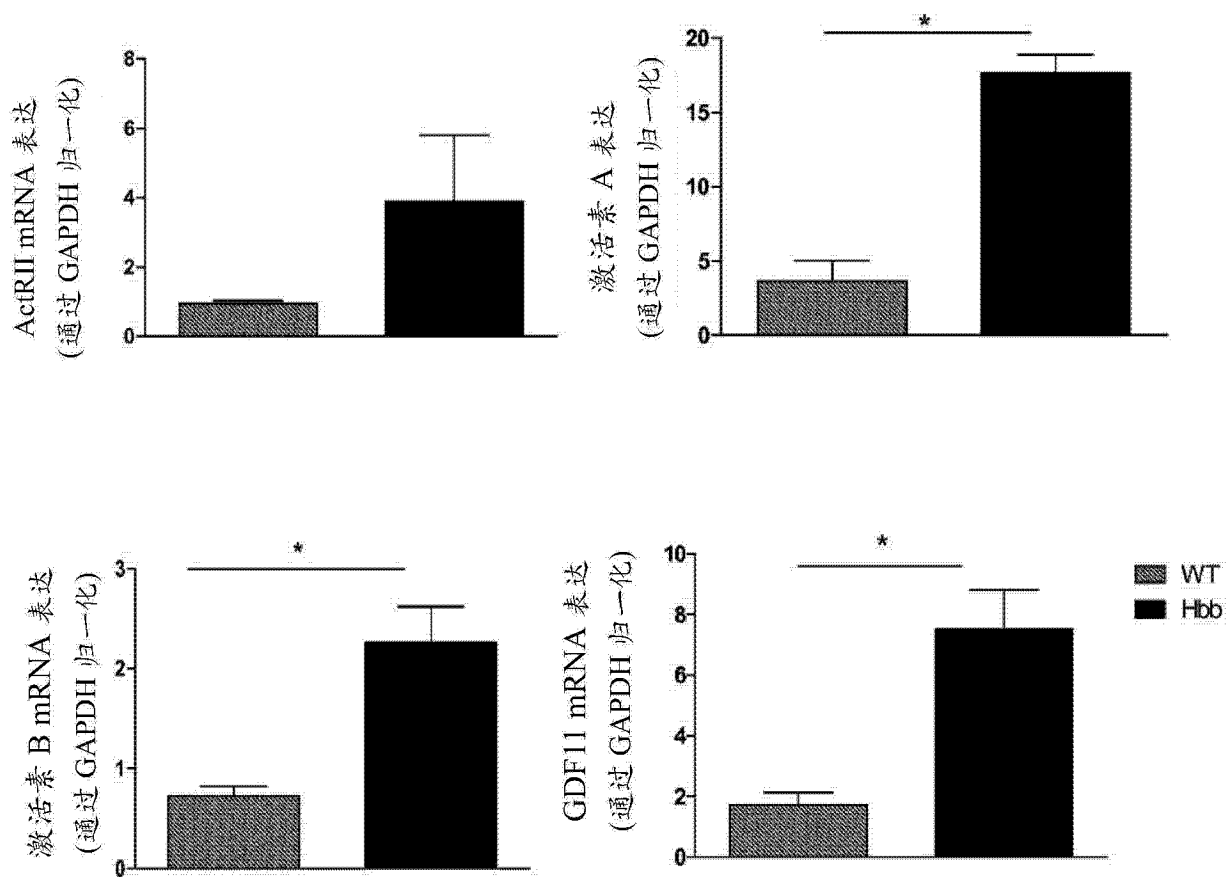


图 4A

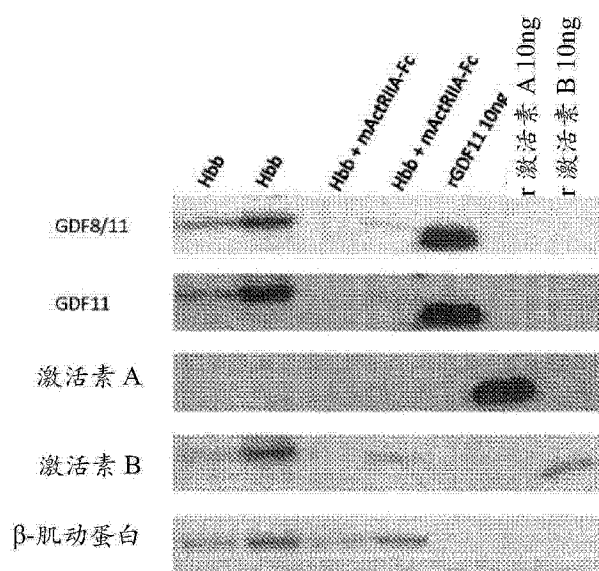


图 4B

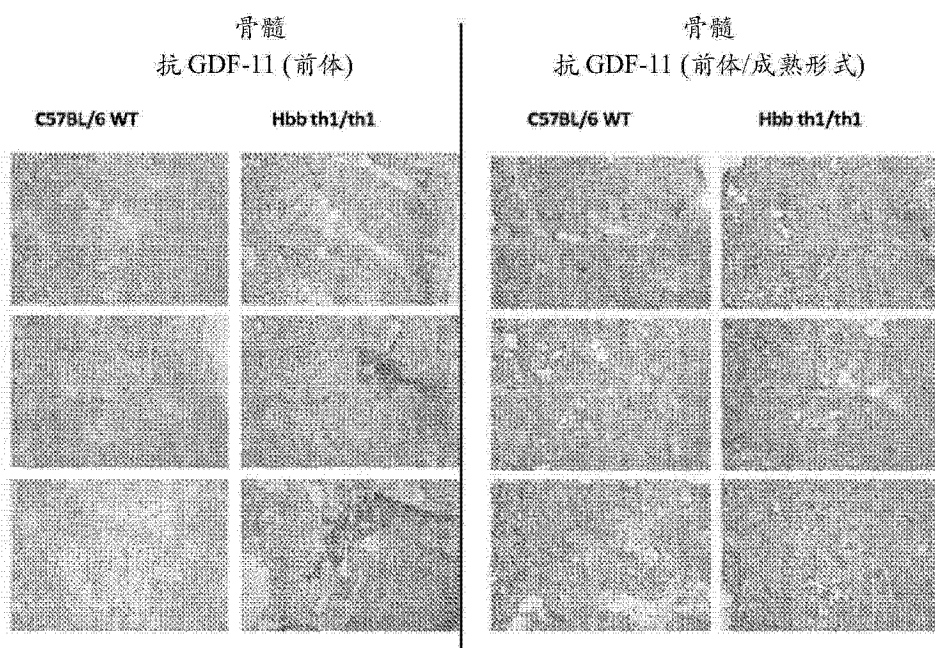


图 4C

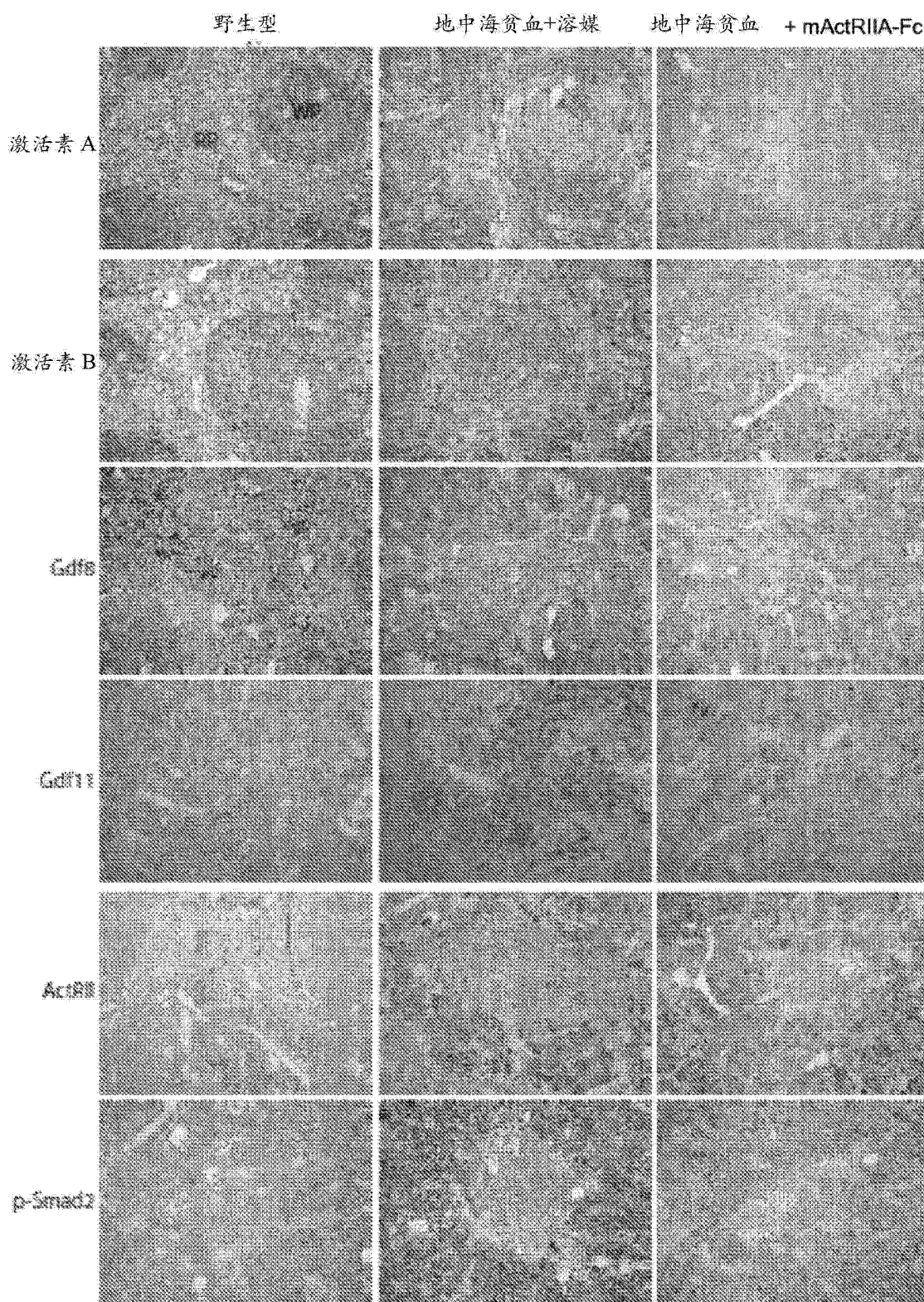


图 5A

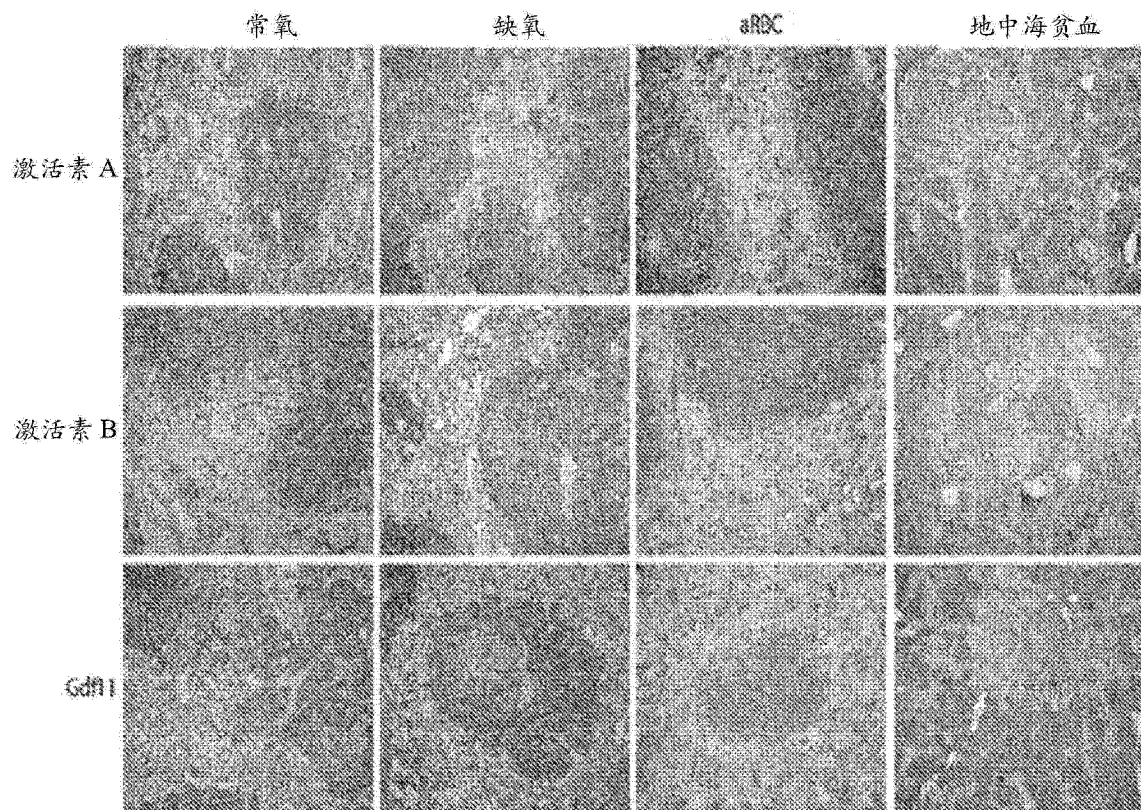


图 5B

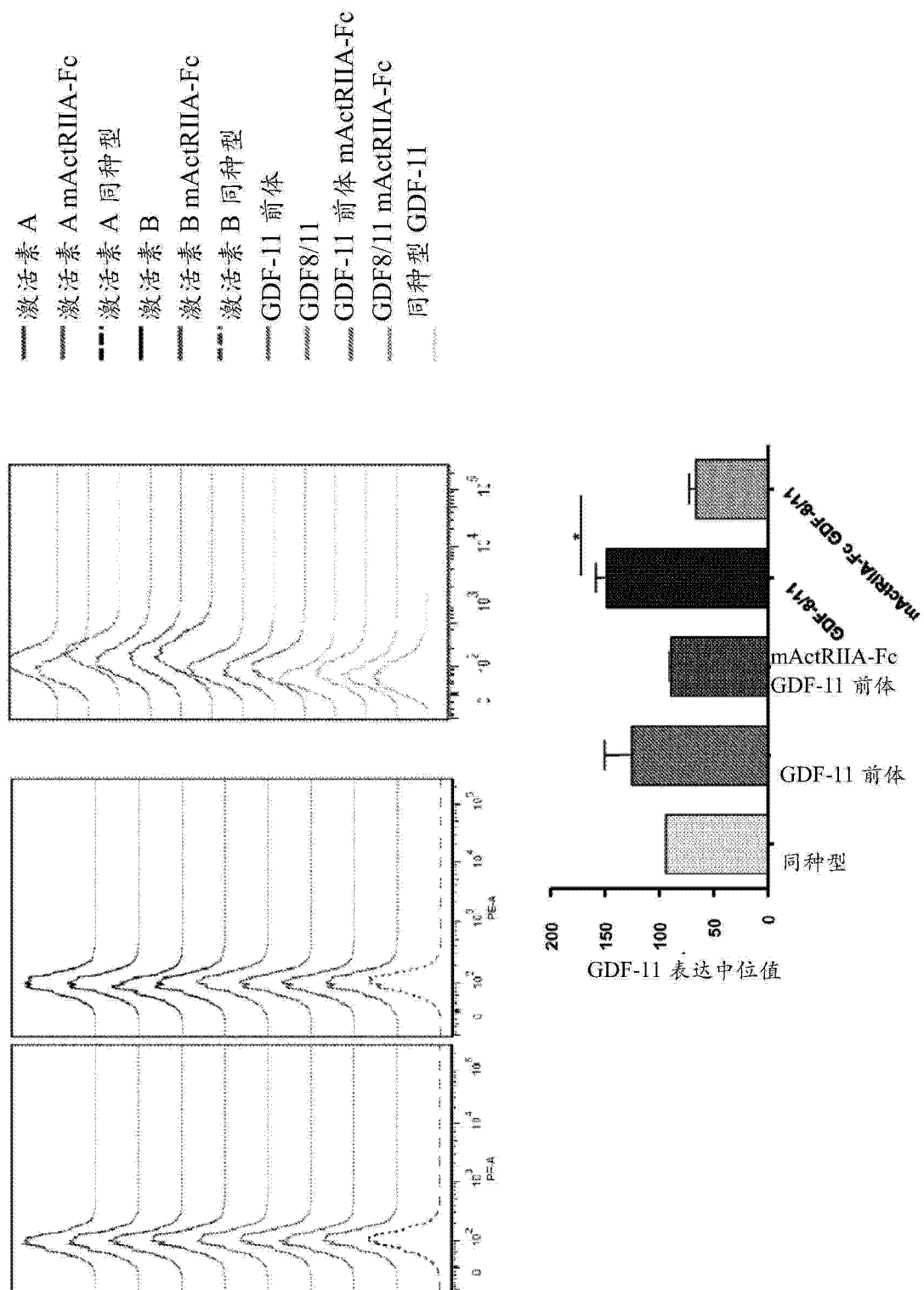


图 5C

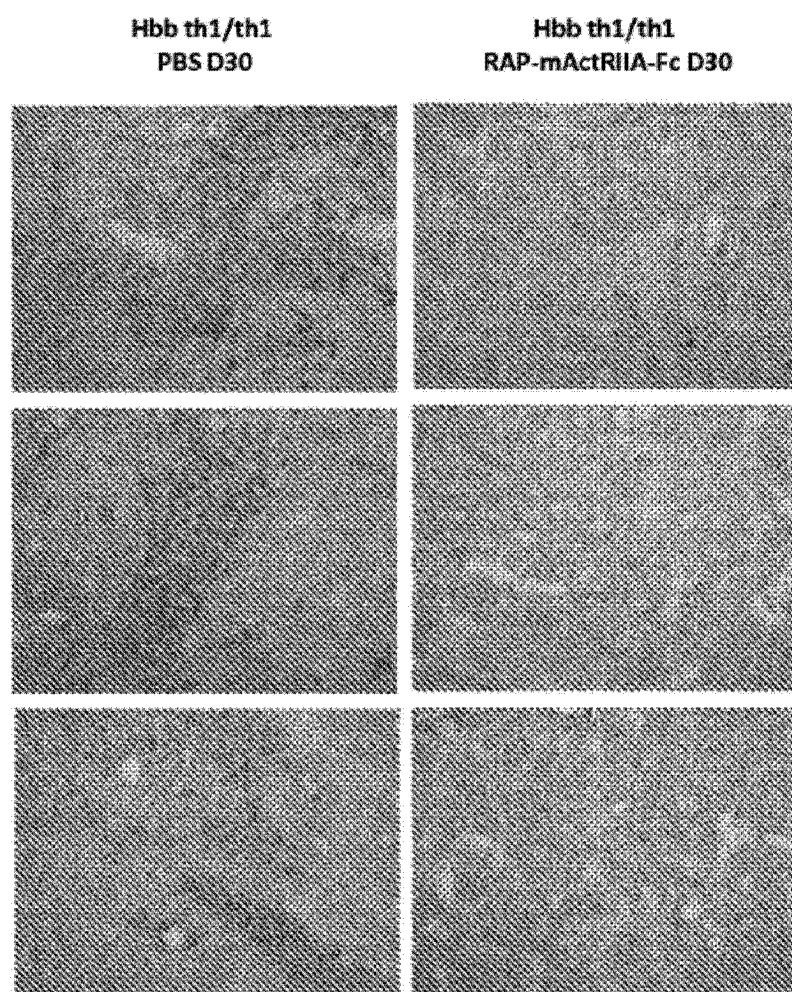


图 5D

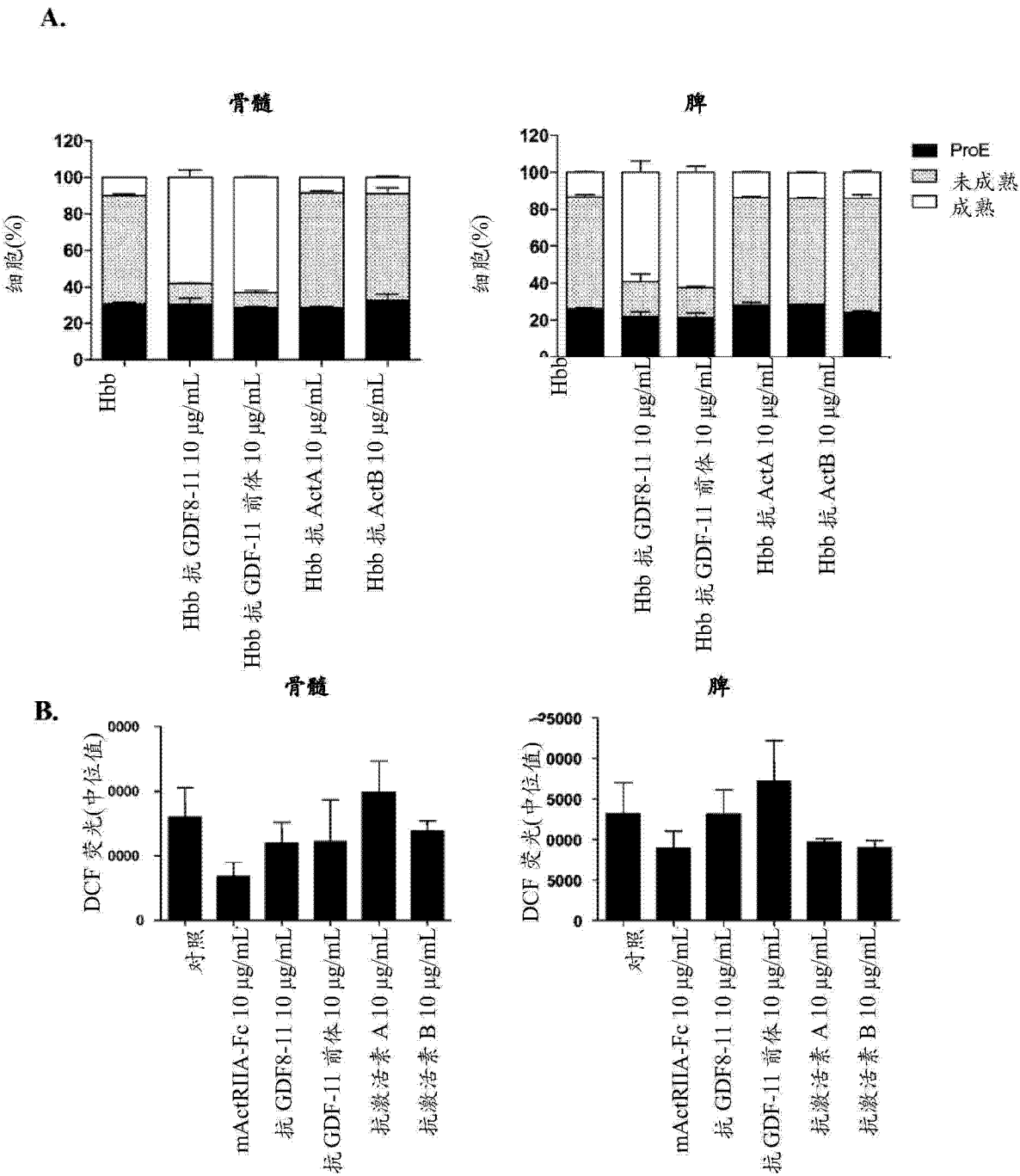
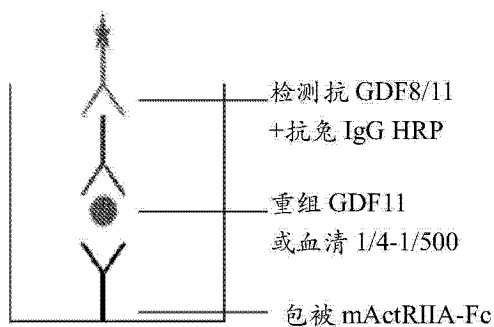


图 6

A.



B.

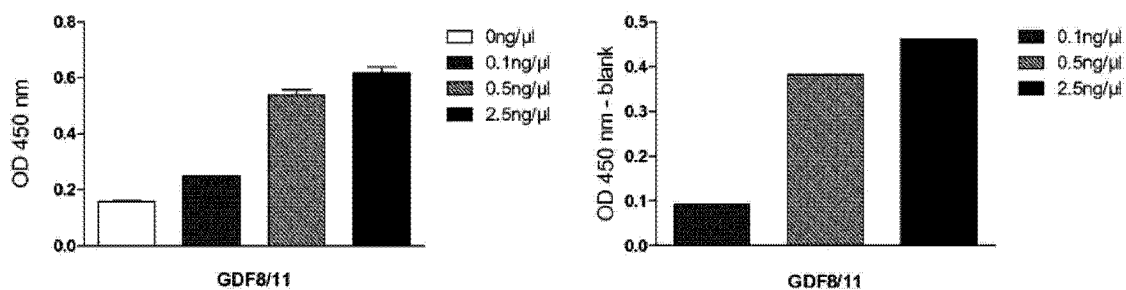


图 7

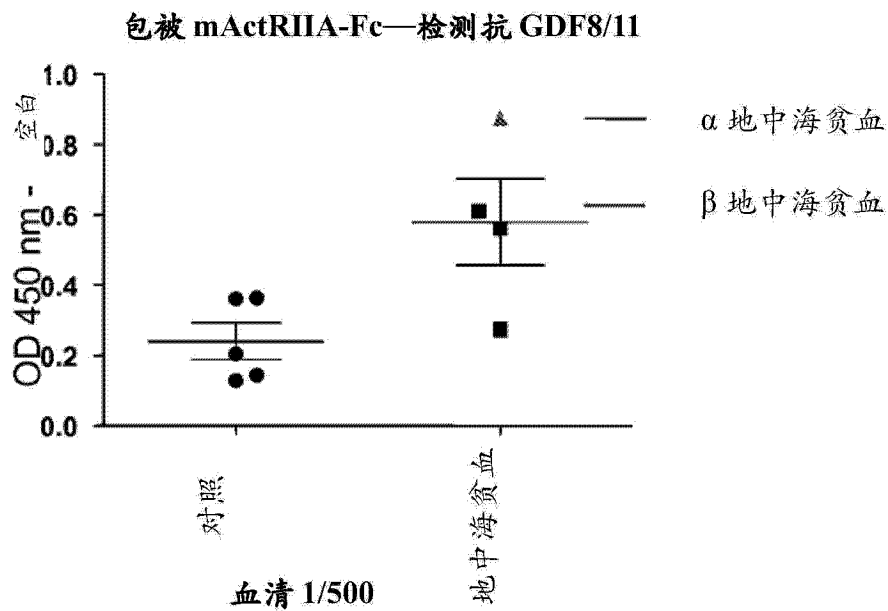


图 8

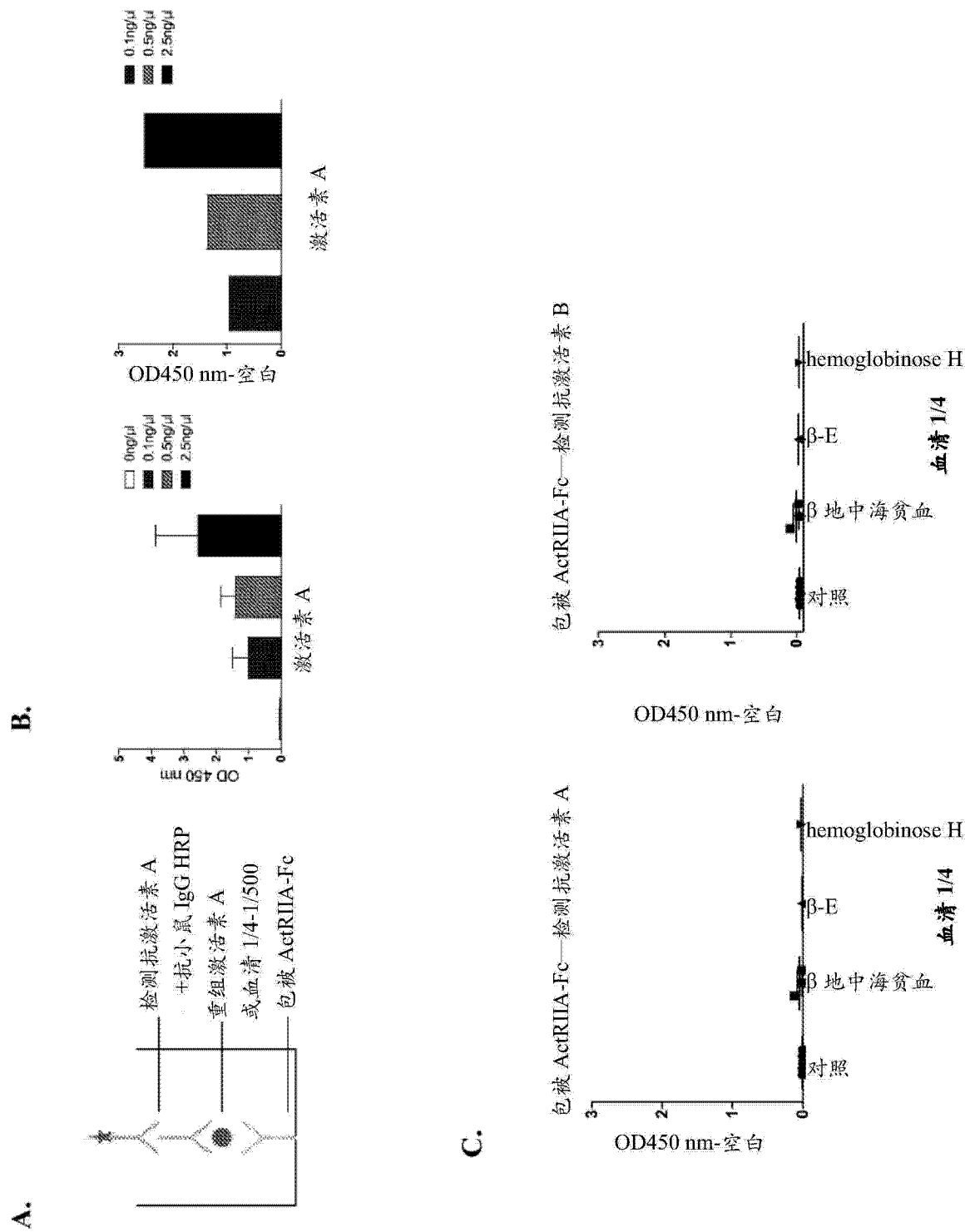
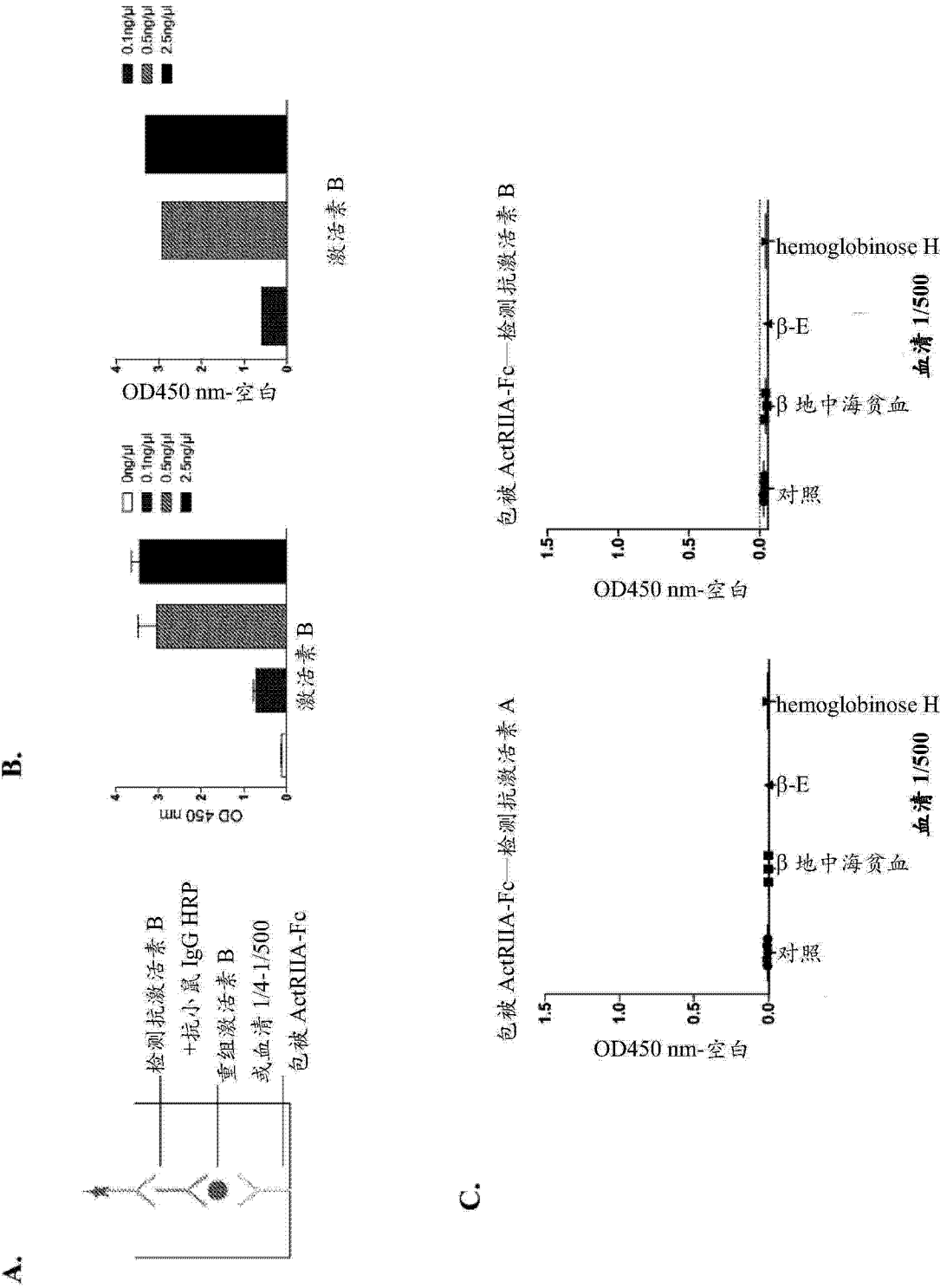


图 9



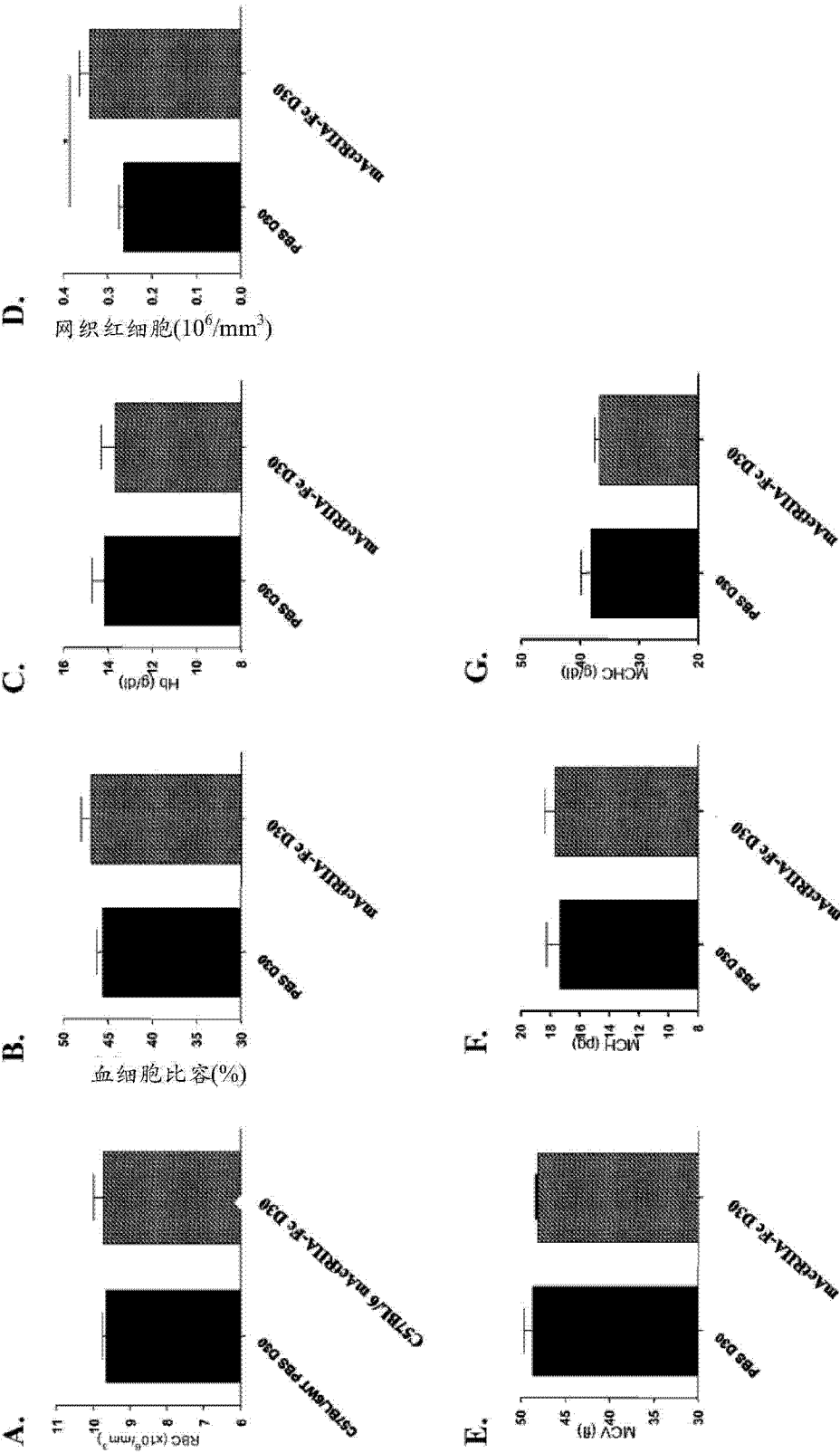


图 11

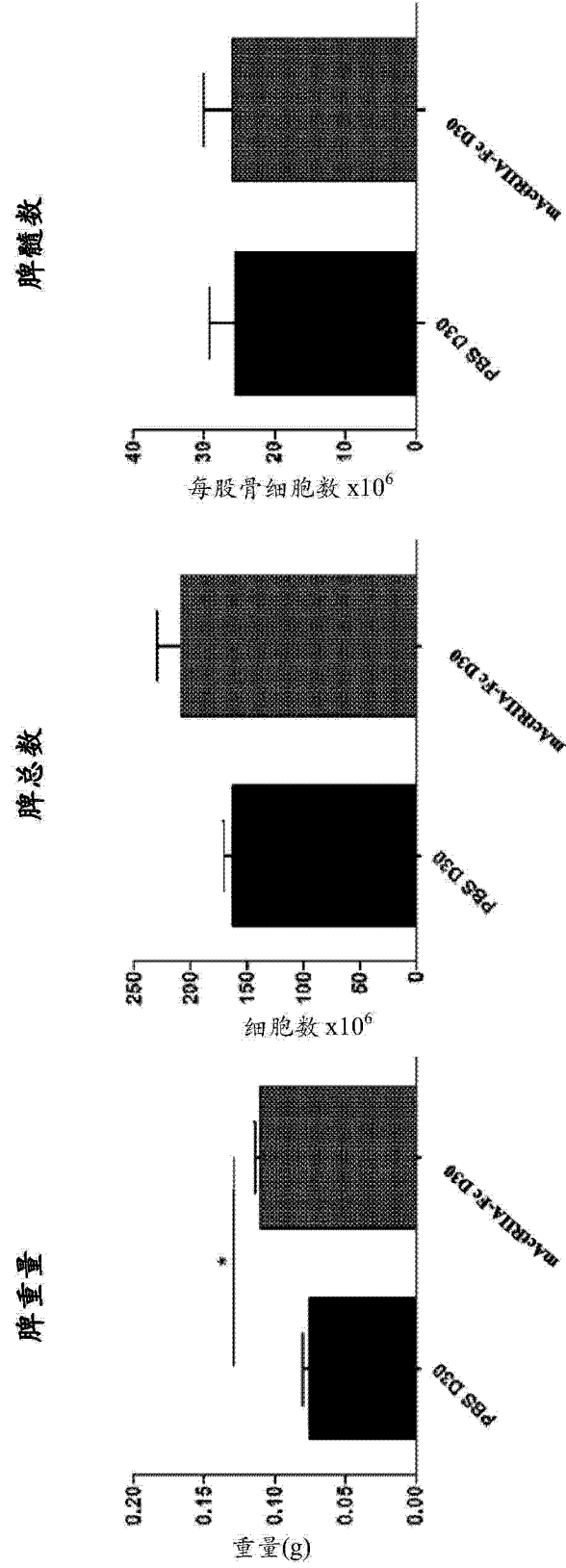


图 12

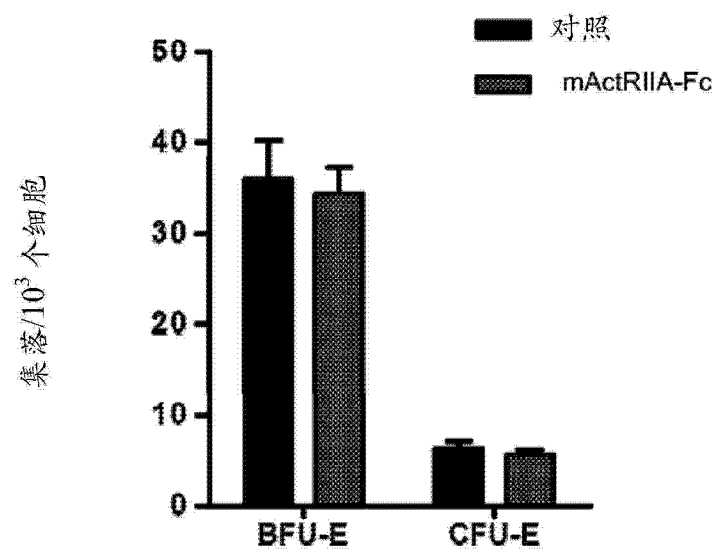


图 13A

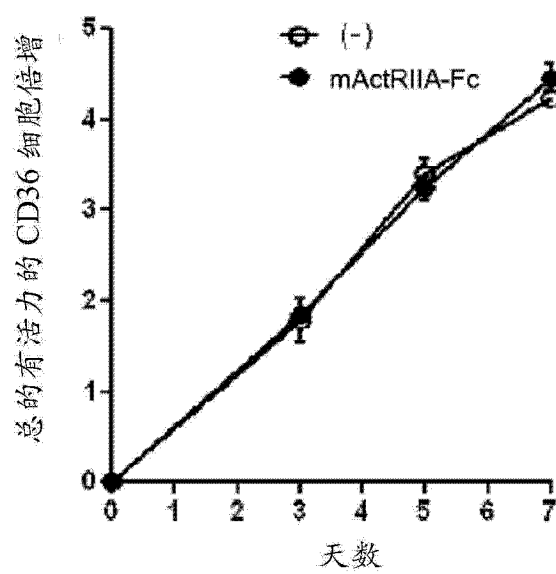


图 13B

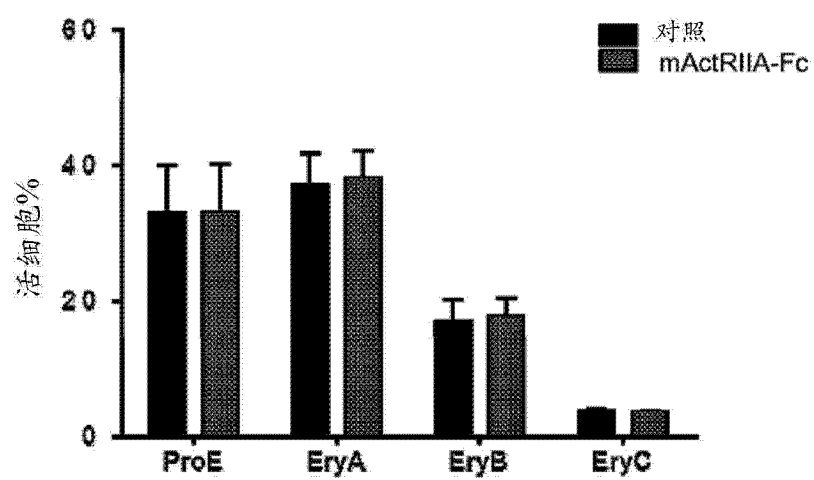


图 13C

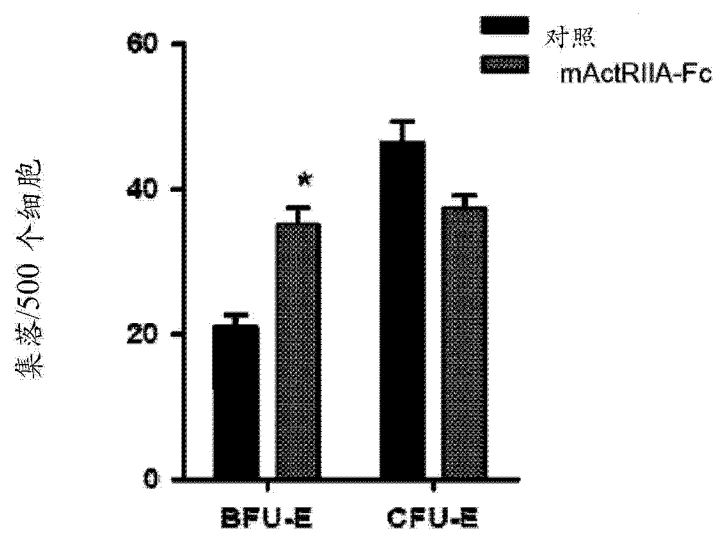


图 13D

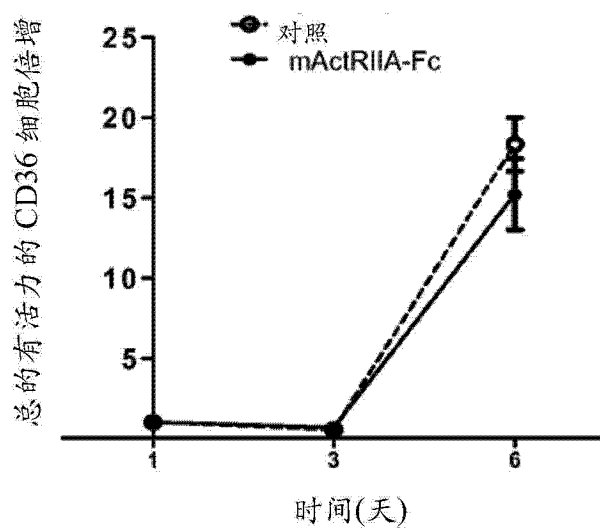


图 13E

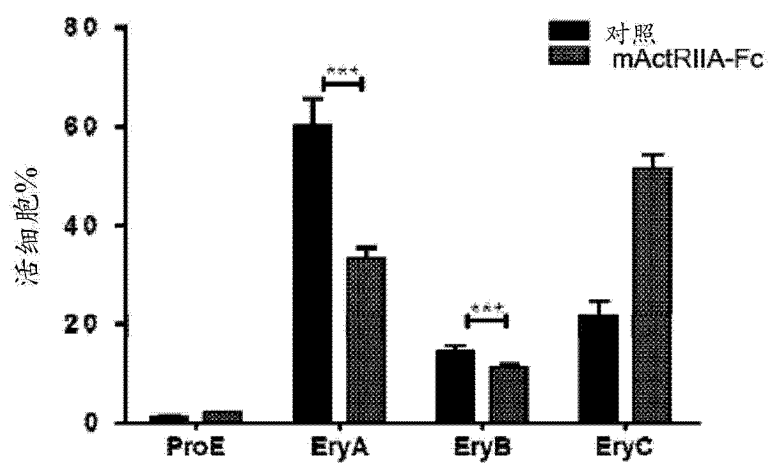


图 13F

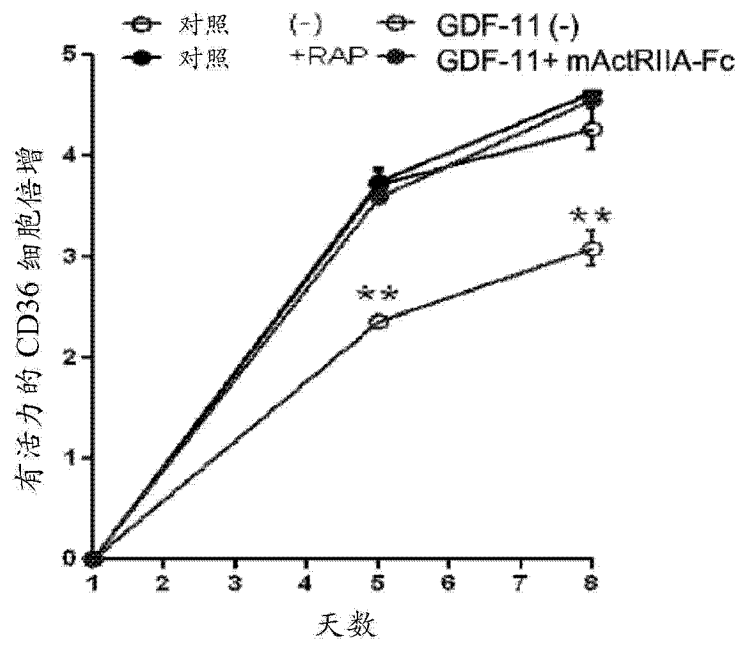


图 13G

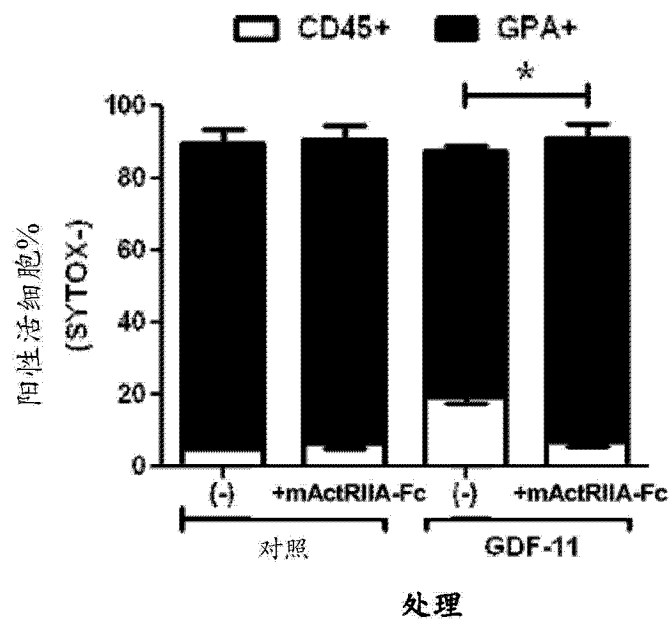


图 13H