



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201813978 A

(43)公開日：中華民國 107 (2018) 年 04 月 16 日

(21)申請案號：106134359

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 10 月 05 日

(51)Int. Cl.：

C07K14/715 (2006.01)

A61K38/16 (2006.01)

C12P21/00 (2006.01)

(30)優先權：2016/10/05

美國

62/404,727

2017/05/24

美國

62/510,417

(71)申請人：美商艾瑟勒朗法瑪公司(美國) ACCELERON PHARMA INC. (US)

美國

(72)發明人：庫瑪 瑞賓卓 KUMAR, RAVINDRA (US)；格林貝格 阿斯亞 GRINBERG, ASYA

(US)；薩科 黛安娜 S SAKO, DIANNE S. (US)；卡斯頓圭 羅斯里納

CASTONGUAY, ROSELYNE (US)

(74)代理人：閻啟泰；林景郁

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：262 項 圖式數：8 共 301 頁

(54)名稱

ALK4：A c t R I I B 異多聚體及其用途

ALK4:ACTRIIB HETEROMULTIMERS AND USES THEREOF

(57)摘要

於某些方面，本文之揭露內容提供包含 ALK4 受體之胞外域和 ActRIIB 之胞外域的可溶性異多聚性多肽複合物。於某些方面，如此可溶性 ALK4：ActRIIB 複合物可用於調節(促進或抑制)組織或細胞(包括(例如)肌肉、骨骼、軟骨、脂肪、神經組織、腫瘤、及/或癌細胞)之生長。於某些方面，如此 ALK4：ActRIIB 複合物可用於改善肌肉形成、骨骼形成、代謝參數、和與此等組織、細胞網路、腎臟、及內分泌系統相關的病症。

In certain aspects, the disclosure provides soluble heteromeric polypeptide complexes comprising an extracellular domain of an ALK4 receptor and an extracellular domain of ActRIIB. In certain aspects, such soluble ALK4:ActRIIB complexes may be used to regulate (promote or inhibit) growth of tissues or cells including, for example, muscle, bone, cartilage, fat, neural tissue, tumors, and/or cancerous cells. In certain aspects, such ALK4:ActRIIB complexes are can be used to improve muscle formation, bone formation, metabolic parameters, and disorders associated with these tissues, cellular networks, kidney, and endocrine systems.

指定代表圖：

ActRIIa
ActRIIb

ILGRSETQEC IFFNANWEKD RTNQTGVKPC YGDEDKRRHC FETWKNISGS
GRGEAETREC IYNNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT

IEIVRQGCWL DDINCYCRFD CVERKDSPEV YFCCCEGNMC NERFSYFPEM
IELVNRGCWL DDFNCDYRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA

EVTQPTSNPV TPKPPT
GGPEVTYEPPTAPT

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

ALK4:ACTRIIB 異多聚體及其用途

ALK4:ACTRIIB HETEROMULTIMERS AND USES THEREOF

相關申請案之交互參照

【0001】 本申請案基於美國臨時申請案編號 62/404,727 (於 2016 年 10 月 5 日提申) 和美國臨時申請案編號 62/510,417 (於 2017 年 5 月 24 日提申) 主張優先權之利益。上述申請案之說明書係以其等之完整內容以引用方式併入本文中。

【技術領域】

【0002】 本申請案係關於包含 ALK4 受體之胞外域和 ActRIIB 之胞外域的可溶性異多聚性多肽複合物和其用途。

【先前技術】

【0003】 轉形生長因子-β (TGF-β) 超家族含有共有共同序列元件和結構模體的各種各樣的生長因子。已知此等蛋白質會在脊椎動物和無脊椎動物兩者中對種類繁多的細胞類型發揮生物功效。此超家族之成員在胚胎發育期間於樣式形成和組織特化執行重要的功能且可影響各種各樣的分化程序，包括脂肪生成、肌肉生成、軟骨生成、心臟生成、造血作用、神經生成、和上皮細胞分化。此族被分成兩個一般譜系支：此超家族更新

近演化出的成員（其包括 TGF-β 家族、活化素、和 nodal）和此超家族之關連性較遙遠的蛋白質之分支（其包括一些 BMP 和 GDF）（Hinck (2012) FEBS Letters 586:1860-1870）。TGF-β 家族成員具有種種的（往往互補的）生物功效。藉由操縱 TGF-β 家族之成員之活性，往往可能可在有機體中造成顯著生理改變。例如，皮埃蒙特（Piedmontese）和比利時藍（Belgian Blue）牛品種帶有造成肌肉質量明顯增加的位於 GDF8（亦稱為肌肉生長抑制素（myostatin））基因的功能喪失型突變（Grobet 等人(1997) Nat Genet 17(1):71-4）。此外，在人類中，GDF8 之不活化型等位基因與肌肉質量之增加及（根據傳聞）異常的力量有關（Schuelke 等人(2004) N Engl J Med 350:2682-8）。

【0004】 於纖維化、肌肉、骨骼、脂肪、和其他組織的改變可藉由增強或抑制由 TGF-β 家族之配體所介導的細胞內傳訊（例如 SMAD 1、2、3、5、及／或 8）達成。因此，存在有對於可調節 TGF-β 超家族之種種配體之活性的藥劑之需要。

【發明內容】

【0005】 如於本文中描述的，已發現 ALK4:ActRIIB 異二聚體蛋白質係 TGF-β 超家族之配體之獨特的拮抗劑，其相較於對應的 ActRIIB 和 ALK4 同二聚體展現不同的配體結合輪廓／選擇性。尤其，例示性 ALK4:ActRIIB 異二聚體相較於任一同二聚體顯示增強的與活化素 B 之結合、保留強力的與活化素 A、GDF8、和 GDF11 之結合（如於使用 ActRIIB 同二聚體時觀察到的）、且展現實質上降低的與 BMP9、BMP10、和 GDF3

之結合。事實上，ALK4:ActRIIB 異二聚體顯示低至無可觀察到的針對 BMP9 的親和力，且此配體與 ActRIIB 同二聚體強力地結合。參見圖 4。此等結果因此顯示 ALK4:ActRIIB 異二聚體相較於 ActRIIB 同二聚體係 TGF-β 超家族之某些配體的更有選擇性的拮抗劑（抑制劑）。因此，ALK4:ActRIIB 異二聚體相較於 ActRIIB 同二聚體於某些其中如此選擇性拮抗作用係有利的應用會更有用。實例包括其中拮抗活化素（例如活化素 A、活化素 B、活化素 AB、活化素 AC）、GDF8、和 GDF11 之一或多者且降低 BMP9、BMP10、和 GDF3 之一或多者之拮抗作用係所欲的之治療應用。

【0006】 此外，ALK4:ActRIIB 異二聚體產生某種與 ActRIIB 同二聚體之生物功效顯著類似的生物功效，儘管此二複合物具有差異的配體選擇性。例如，ALK4:ActRIIB 異二聚體發揮有益的對骨骼肌和骨骼的合成代謝功效以及對脂肪組織的分解代謝功效，且其等與 ActRIIB-Fc 同二聚體之功效非常類似。然而，與 ActRIIB 同二聚體不同，ActRIIB:ALK4 異二聚體僅展現對 BMP9 和 BMP10 的低親和力或與 BMP9 和 BMP10 之暫時性結合且因此對由該等配體介導的程序（諸如血管生成）應具有很小至無的同時抑制。此新穎的選擇性可能係有用的（例如於治療需要對肌肉和骨骼的刺激功效、及／或對脂肪的抑制性功效但不需要改變的血管生成的患者）。此外，ALK4:ActRIIB 異二聚體於腎臟疾病之小鼠模型具有種種的有益功效（特別係於治療或預防腎臟傷害、發炎、和纖維化）。因此，雖然無意受限於特定作用機制，預期到與活化素（例如活化素 A、活化素 B、活化素 AB、和活化素 AC）、GDF8、及／或 GDF11 之至少一或多者結合／抑制其（等）的 ALK4:ActRIIB 異多聚體（以及其變體）會係用於促進有益的對骨骼肌和

骨骼的合成代謝功效、對脂肪組織的分解代謝功效、和有益的對腎臟疾病的功效之有用藥劑。

【0007】 因此，本文之揭露內容（部分）係關於異多聚體複合物（異多聚體），其包含至少一個 ALK4 多肽和至少一個 ActRIIB 多肽（ALK4:ActRIIB 異多聚體）。較佳地，ALK4 多肽包含 ALK4 受體之配體結合域，例如 ALK4 胞外域之部分。類似地，ActRIIB 多肽一般包含 ActRIIB 受體之配體結合域，例如 ActRIIB 胞外域之部分。較佳地，如此 ALK4 和 ActRIIB 多肽（以及所得的其等之異多聚體）係可溶的。較佳地，如此 ALK4 和 ActRIIB 多肽（以及所得的其等之異多聚體）係重組蛋白質。較佳地，如此 ALK4 和 ActRIIB 多肽（以及所得的其等之異多聚體）係經分離的蛋白質。

【0008】 於某些方面，ALK4:ActRIIB 異多聚體包含 ALK4 域，該 ALK4 域包含與於 SEQ ID NO: 9 之胺基酸 24-34 之任一者（例如胺基酸 24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、和 34）起始且於 SEQ ID NO: 9 之胺基酸 101-126 之任一者（例如胺基酸 101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、和 126）結束的多肽至少 70%一致的胺基酸序列。例如，ALK4:ActRIIB 異多聚體可包含與 SEQ ID NO: 9 之胺基酸 34-101 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的胺基酸序列。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體可包含與 SEQ ID NO: 9 之胺基酸 24-126 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 一致的胺基酸序列。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體可包含與 SEQ ID NO: 10 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的 ALK4 胺基酸序列。

【0009】 於其他方面，ALK4:ActRIIB 異多聚體包含 ALK4 域，該 ALK4 域包含與於 SEQ ID NO: 19 之胺基酸 24-34 之任一者（例如胺基酸 24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、和 34）起始且於 SEQ ID NO: 19 之胺基酸 101-126 之任一者（例如胺基酸 101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、和 126）結束的多肽至少 70%一致的胺基酸序列。例如，ALK4:ActRIIB 異多聚體可包含與 SEQ ID NO: 19 之胺基酸 34-101 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的胺基酸序列。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體可包含與 SEQ ID NO: 19 之胺基酸 24-126 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 一致的胺基酸序列。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體可包含與 SEQ ID NO: 20 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的 ALK4 胺基酸序列。

【0010】 於某些方面，ALK4:ActRIIB 異多聚體包含 ActRIIB 域，該

ActRIIB 域包含與於 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 20-29 之任一者（例如胺基酸 20、21、22、23、24、25、26、27、28、和 29）起始並於 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 109-134 之任一者（109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、和 134）結束的多肽至少 70%一致之胺基酸序列。例如，ALK4:ActRIIB 異多聚體可包含與 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 29-109 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致之胺基酸序列。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體可包含與 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 25-131 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致之胺基酸序列。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體可包含與 SEQ ID NO: 2 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致之 ActRIIB 胺基酸序列。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體可包含與 SEQ ID NO: 3 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致之 ActRIIB 胺基酸序列。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體不包含包含位於對應於 SEQ ID NO: 1 之 L79 之位置的酸性胺基酸（例如天然存在的胺基酸 E 或 D 或人工酸性胺基酸）之 ActRIIB 多肽。

【0011】 於其他方面，ALK4:ActRIIB 異多聚體包含 ActRIIB 域，該 ActRIIB 域包含與於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 20-29 之任一者（例如胺基酸

20、21、22、23、24、25、26、27、28、和 29) 起始並於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 109-134 之任一者 (109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、和 134) 結束的多肽至少 70%一致之胺基酸序列。例如，ALK4:ActRIIB 異多聚體可包含與 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 29-109 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致之胺基酸序列。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體可包含與 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 25-131 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致之胺基酸序列。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體可包含與 SEQ ID NO: 5 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致之 ActRIIB 胺基酸序列。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體可包含與 SEQ ID NO: 6 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致之 ActRIIB 胺基酸序列。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體不包含包含位於對應於 SEQ ID NO: 1 之 L79 的位置之酸性胺基酸 (例如天然存在的胺基酸 E 或 D 或人工酸性胺基酸) 之 ActRIIB 多肽。

【0012】 如於本文中描述的，ALK4:ActRIIB 異多聚體結構包括 (例如) 異二聚體、異三聚體、異四聚體、異五聚體、和更高級的異多聚體複合物。參見，例如圖 6。於某些較佳的實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚

體係異二聚體。

【0013】 於某些方面，ALK4 及／或 ActRIIB 多肽可係融合蛋白質。例如，於一些實施方式中，ALK4 多肽可係包含 ALK4 多肽域和一或多個異源（非 ALK4）多肽域的融合蛋白質（例如 ALK4-Fc 融合蛋白質）。類似地，於一些實施方式中，ActRIIB 多肽可係包含 ActRIIB 多肽域和一或多個異源（非 ActRIIB）多肽域的融合蛋白質（ActRIIB-Fc 融合蛋白質）。

【0014】 於一些實施方式中，ALK4 多肽係包含免疫球蛋白之 Fc 域的融合蛋白質。類似地，於一些實施方式中，ActRIIB 多肽係包含免疫球蛋白之 Fc 域的融合蛋白質。傳統的 Fc 融合蛋白質和抗體係非導向的交互作用對之實例，而各種各樣經工程改造的 Fc 域已被設計成非對稱的交互作用對（Spiess 等人(2015) *Molecular Immunology* 67(2A): 95-106）。因此，於本文中描述的交互作用對之第一成員及／或第二成員可包含免疫球蛋白之恆定域，包括（例如）免疫球蛋白之 Fc 部分。例如，交互作用對之第一成員可包含源自 IgG（IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4）、IgA（IgA1 或 IgA2）、IgE、或 IgM 免疫球蛋白之 Fc 域的胺基酸序列。如此免疫球蛋白域可包含一或多個促進 ALK4:ActRIIB 異多聚體形成的胺基酸修飾（例如刪除、添加、及／或取代）。類似地，交互作用對之第二成員可包含源自 IgG（IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4）、IgA（IgA1 或 IgA2）、IgE、或 IgM 之 Fc 域的胺基酸序列。如此免疫球蛋白域可包含一或多個促進 ALK4:ActRIIB 異多聚體形成的胺基酸修飾（例如刪除、添加、及／或取代）。例如，該交互作用對之第二成員可包含以下者、基本上由以下者所組成、或由以下者所組成：與 SEQ ID NO: 23-37 之任一者至少 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致的胺基酸序列。於一些實施方式中，交互作用對之第一成員和第二成員包含源自相同的免疫球蛋白類型和次型的 Fc 域。於其他實施方式中，交互作用對之第一成員和第二成員包含源自不同的免疫球蛋白類型或次型的 Fc 域。

【0015】 於某些方面，本文之揭露內容係關於包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含一或多個改變該 ALK4-Fc 融合蛋白質之等電點 (pI) 的胺基酸修飾 (例如胺基酸取代、陽離子化、去胺、羧端胺基酸異質性、磷酸化、和糖苷化) 及／或該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含一或多個改變該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾。於一些實施方式中，該一或多個 ALK4-Fc 融合蛋白質中的胺基酸修飾使得該 ALK4-Fc 融合蛋白質和該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質間有增加的 pI 差異。於其他實施方式中，該一或多個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質中的胺基酸修飾使得該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質和該 ALK4-Fc 融合蛋白質間有增加的 pI 差異。於又其他實施方式中，該一或多個 ALK4-Fc 融合蛋白質中的胺基酸修飾使得該 ALK4-Fc 融合蛋白質和該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質間有增加的 pI 差異，且該一或多個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質中的胺基酸修飾使得該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質和該 ALK4-Fc 融合蛋白質間有增加的 pI 差異。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含一或多個改變 pI 達至少 0.1 (例如達至少 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.7、0.8、0.9、1.0、1.3、1.5、1.7、2.0、2.3、2.5、2.7、3.0、3.3、3.5、3.7、或至少達 4.0) 的胺基酸修飾。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含一或多個改變 pI 達至少 0.1 (例如達至少 0.1、0.2、0.3、0.4、

0.5、0.7、0.8、0.9、1.0、1.3、1.5、1.7、2.0、2.3、2.5、2.7、3.0、3.3、3.5、3.7、或至少達 4.0) 的胺基酸修飾。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含一或多個改變 pI 達至少 0.1 (例如達至少 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.7、0.8、0.9、1.0、1.3、1.5、1.7、2.0、2.3、2.5、2.7、3.0、3.3、3.5、3.7、或至少達 4.0) 的胺基酸修飾和該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含一或多個改變 pI 達至少 0.1 (例如達至少 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.7、0.8、0.9、1.0、1.3、1.5、1.7、2.0、2.3、2.5、2.7、3.0、3.3、3.5、3.7、或至少達 4.0) 的胺基酸修飾。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質和該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質具有至少 0.7 的 pI 差異 (例如具有至少 0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、或至少 4.0 或更高的 pI 差異)。

【0016】 於某些方面，本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體包含 ALK4-Fc 融合蛋白質和 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含一或多個提高該 ALK4-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾且該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含一或多個降低該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾。例如，ALK4-Fc 融合蛋白質可藉由以一或多個帶正電的胺基酸 (例如精胺酸 (R)、離胺酸 (K)、或組胺酸 (H)) 取代一或多個中性的或帶負電的胺基酸來修飾。類似地，ActRIIB-Fc 融合蛋白質可藉由以一或多個帶負電的胺基酸 (例如天門冬胺酸 (E) 或麩胺酸 (D)) 取代一或多個電中性或帶正電的胺基酸來修飾。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域係包含一或多個改變該 ALK4-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾

的 IgG1 Fc 域。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 N162 的位置的胺基酸取代；b)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 D179 的位置的胺基酸取代；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 N162 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 D179 的位置的胺基酸取代。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 N162 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (N162R、N162K、或 N162H)；b)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 D179 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D179R、D179K、或 D179H)；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 N162 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (N162R、N162K、或 N162H) 和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 D179 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D179R、D179K、或 D179H)。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 N162 的位置的精胺酸取代 (N162R)；b)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 D179 的位置的精胺酸取代 (D179R)；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 N162 的位置的精胺酸取代 (N162R) 和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 D179 的位置的精胺酸取代 (D179R)。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域係包含一或多個改變該 ALK4-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾的 IgG2 Fc 域。於一些

實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 32 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 N160 的位置的胺基酸取代；b)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 D177 的位置的胺基酸取代；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 N160 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 D177 的位置的胺基酸取代。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 N160 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (N160R、N160K、或 N160H)；b)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 D177 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D177R、D177K、或 D177H)；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 N160 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (N160R、N160K、或 N160H)和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 D177 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D177R、D177K、或 D177H)。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域係包含一或多個改變該 ALK4-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾的 IgG3 Fc 域。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 33 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 S169 的位置的胺基酸取代；b)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 D186 的位置的胺基

酸取代；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 S169 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 D186 的位置的胺基酸取代。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 S169 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (S169R、S169K、或 S169H)；b)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 D186 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D186R、D186K、或 D186H)；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 S169 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (S169R、S169K、或 S169H) 和位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 D186 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D186R、D186K、或 D186H)。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域係包含一或多個改變該 ALK4-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾的 IgG4 Fc 域。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 N166 的位置的胺基酸取代；b)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 D183 的位置的胺基酸取代；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 N166 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 D183 的位置的胺基酸取代。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 N166 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (N166R、N166K、或 N166H)；b)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 D183 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸

取代 (D183R、D183K、或 D183H)；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 N166 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (N166R、N166K、或 N166H) 和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 D183 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D183R、D183K、或 D183H)。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域係包含一或多個改變該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾的 IgG1 Fc 域。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K138 的位置的胺基酸取代；b)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K217 的位置的胺基酸取代；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K138 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K217 的位置的胺基酸取代。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K138 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K138E 或 K138D)；b)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K217 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K217E 或 K217D)；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K138 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K138E 或 K138D) 和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K217 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K217E 或 K217D)。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K138 的位置的麩胺酸取代 (K138E)；b)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K217

的位置的天門冬胺酸取代(K217D);和c)位於對應於SEQ ID NO: 31之K138的位置的麩胺酸取代(K138E)和位於對應於SEQ ID NO: 31之K217的位置的天門冬胺酸取代(K217D)。於一些實施方式中,該ActRIIB-Fc融合蛋白質Fc域係包含一或多個改變該ActRIIB-Fc融合蛋白質之pI的胺基酸修飾的IgG2 Fc域。於一些實施方式中,該ActRIIB-Fc融合蛋白質IgG2 Fc域包含與SEQ ID NO: 32之胺基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。於一些實施方式中,該ActRIIB-Fc融合蛋白質IgG2融合Fc域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代:a)位於對應於SEQ ID NO: 32之K136的位置的胺基酸取代;b)位於對應於SEQ ID NO: 32之K215的位置的胺基酸取代;和c)位於對應於SEQ ID NO: 32之K136的位置的胺基酸取代和位於對應於SEQ ID NO: 32之K215的位置的胺基酸取代。於一些實施方式中,該ActRIIB-Fc融合蛋白質IgG2 Fc域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代:a)位於對應於SEQ ID NO: 32之K136的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代(K136E或K136D);b)位於對應於SEQ ID NO: 32之K215的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代(K215E或K215D);和c)位於對應於SEQ ID NO: 32之K136的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代(K136E或K136D)和位於對應於SEQ ID NO: 32之K215的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代(K215E或K215D)。於一些實施方式中,該ActRIIB-Fc融合蛋白質Fc域係包含一或多個改變該ActRIIB-Fc融合蛋白質之pI的胺基酸修飾的IgG3 Fc域。於一些實施方式中,該ActRIIB-Fc融合蛋白質IgG3 Fc域包含與SEQ ID NO: 33之胺基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。

於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG3 融合 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K145 的位置的胺基酸取代；b)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K224 的位置的胺基酸取代；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K145 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K224 的位置的胺基酸取代。於一些實施方式中，該經修飾的 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K145 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代（K145E 或 K145D）；b)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K224 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代（K224E 或 K224D）；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K145 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代（K145E 或 K145D）和位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K224 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代（K224E 或 K224D）。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域係包含一或多個改變該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾的 IgG4 Fc 域。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。

於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG4 融合 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K142 的位置的胺基酸取代；b)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K221 的位置的胺基酸取代；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K142 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K221 的位置的胺基酸取代。於一些實施方式中，該

ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K142 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K142E 或 K142D)；b)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K221 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代(K221E 或 K221D)；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K142 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K142E 或 K142D) 和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K221 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代(K221E 或 K221D)。

【0017】 於某些方面，本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體包含 ActRIIB-Fc 融合蛋白質和 ALK4-Fc 融合蛋白質，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含一或多個提高該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾且該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含一或多個降低該 ALK-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾。例如，ActRIIB-Fc 融合蛋白質可藉由以一或多個帶正電的胺基酸（例如精胺酸 (R)、離胺酸 (K)、或組胺酸 (H)）取代一或多個中性的或帶負電的胺基酸來修飾。類似地，ALK4-Fc 融合蛋白質可藉由以一或多個帶負電的胺基酸（例如天門冬胺酸 (E) 或麩胺酸 (D)）取代一或多個電中性或帶正電的胺基酸來修飾。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域係包含一或多個改變該 ALK4-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾的 IgG1 Fc 域。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 N162 的位

置的胺基酸取代；b)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 D179 的位置的胺基酸取代；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 N162 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 D179 的位置的胺基酸取代。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 N162 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (N162R、N162K、或 N162H)；b)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 D179 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D179R、D179K、或 D179H)；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 N162 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (N162R、N162K、或 N162H) 和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 D179 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D179R、D179K、或 D179H)。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 N162 的位置的精胺酸取代 (N162R)；b)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 D179 的位置的精胺酸取代 (D179R)；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 N162 的位置的精胺酸取代 (N162R) 和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 D179 的位置的精胺酸取代 (D179R)。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域係包含一或多個改變該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾的 IgG2 Fc 域。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 32 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 N160 的位置的胺基酸

取代；b)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 D177 的位置的胺基酸取代；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 N160 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 D177 的位置的胺基酸取代。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 N160 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (N160R、N160K、或 N160H)；b)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 D177 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D177R、D177K、或 D177H)；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 N160 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (N160R、N160K、或 N160H) 和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 D177 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D177R、D177K、或 D177H)。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域係包含一或多個改變該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾的 IgG3 Fc 域。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 33 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 S169 的位置的胺基酸取代；b)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 D186 的位置的胺基酸取代；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 S169 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 D186 的位置的胺基酸取代。於一些實施方式中，該經修飾的 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 S169 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (S169R、S169K、

或 S169H)；b)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 D186 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D186R、D186K、或 D186H)；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 S169 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (S169R、S169K、或 S169H)和位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 D186 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D186R、D186K、或 D186H)。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域係包含一或多個改變該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾的 IgG4 Fc 域。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 N166 的位置的胺基酸取代；b)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 D183 的位置的胺基酸取代；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 N166 的位置的胺基酸取代和位於 SEQ ID NO: 35 之位置 D183 的胺基酸取代。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 N166 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (N166R、N166K、或 N166H)；b)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 D183 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D183R、D183K、或 D183H)；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 N166 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (N166R、N166K、或 N166H)和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 D183 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D183R、D183K、或 D183H)。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋

白質 Fc 域係包含一或多個改變該 ALK4-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾的 IgG1 Fc 域。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG1 融合 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K138 的位置的胺基酸取代；b)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K217 的位置的胺基酸取代；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K138 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K217 的位置的胺基酸取代。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K138 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K138E 或 K138D)；b)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K217 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K217E 或 K217D)；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K138 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K138E 或 K138D) 和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K217 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K217E 或 K217D)。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K138 的位置的麩胺酸取代 (K138E)；b)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K217 的位置的天門冬胺酸取代 (K217D)；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K138 的位置的麩胺酸取代 (K138E) 和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K217 的位置的天門冬胺酸取代 (K217D)。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域係包含一或多個改變該 ALK4-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾的

IgG2 Fc 域。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 32 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG2 融合 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 K136 的位置的胺基酸取代；b)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 K215 的位置的胺基酸取代；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 K136 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 K215 的位置的胺基酸取代。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 K136 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K136E 或 K136D)；b)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 K215 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K215E 或 K215D)；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 K136 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K136E 或 K136D) 和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 K215 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K215E 或 K215D)。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域係包含一或多個改變該 ALK4-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾的 IgG3 Fc 域。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 33 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG3 融合 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K145 的位置的胺基酸取代；b)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K224 的位置的胺基酸取代；和 c)位於對應於 SEQ

ID NO: 33 之 K145 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K224 的位置的胺基酸取代。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K145 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K145E 或 K145D)；b)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K224 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K224E 或 K224D)；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K145 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K145E 或 K145D) 和位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K224 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K224E 或 K224D)。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域係包含一或多個改變該 ALK4-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾的 IgG4 Fc 域。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG4 融合 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K142 的位置的胺基酸取代；b)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K221 的位置的胺基酸取代；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K142 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K221 的位置的胺基酸取代。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K142 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K142E 或 K142D)；b)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K221 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K221E 或 K221D)；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K142 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代

(K142E 或 K142D) 和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K221 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K221E 或 K221D)。

【0018】 如於本文中描述的，ALK4-Fc 融合蛋白質及／或 ActRIIB-Fc 融合蛋白質可包含一或多個促進異多聚體形成（例如 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體化）的修飾。類似地，ALK4-Fc 融合蛋白質及／或 ActRIIB-Fc 融合蛋白質可包含一或多個抑制同多聚體形成（例如 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 同二聚體化）的修飾。於一些實施方式中，ALK4-Fc 融合蛋白質及／或 ActRIIB-Fc 融合蛋白質可包含一或多個促進異多聚體形成的修飾和包含一或多個抑制同多聚體形成的修飾。例如，於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體包含：a)具有 IgG1 Fc 域的 ALK4-Fc 融合蛋白質，該 IgG1 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 31 之位置 S132 的半胱胺酸取代(S132C)和位於 SEQ ID NO: 31 之位置 T144 的色胺酸取代 (T144W)；和 b)具有 IgG1 Fc 域的 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，該 IgG1 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 31 之位置 Y127 的半胱胺酸取代 (Y127C)、位於 SEQ ID NO: 31 之位置 T144 的絲胺酸取代 (T144S)、位於 SEQ ID NO: 31 之位置 L146 的丙胺酸取代 (L146A)、和位於 SEQ ID NO: 31 之位置 Y185 的纈胺酸取代 (Y185V)。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體包含：a)具有 IgG1 Fc 域的 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，該 IgG1 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 31 之位置 S132 的半胱胺酸取代(S132C)和位於 SEQ ID NO: 31 之位置 T144 的色胺酸取代(T144W)；和 b)具有 IgG1 Fc 域的 ALK4-Fc 融合蛋白質，該 IgG1 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 31 之位置 Y127 的半胱胺酸取代 (Y127C)、位於 SEQ ID NO: 31 之位置 T144 的絲胺酸取代 (T144S)、位於 SEQ ID NO: 31 之位置 L146 的丙胺

酸取代 (L146A)、和位於 SEQ ID NO: 31 之位置 Y185 的纈胺酸取代 (Y185V)。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體包含：a)具有 IgG2 Fc 域的 ALK4-Fc 融合蛋白質，該 IgG2 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 32 之位置 S130 的半胱胺酸取代 (S130C) 和位於 SEQ ID NO: 32 之位置 T142 的色胺酸取代 (T142W)；和 b)具有 IgG2 Fc 域的 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，該 IgG2 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 32 之位置 Y125 的半胱胺酸取代 (Y125C)、位於 SEQ ID NO: 32 之位置 T142 的絲胺酸取代 (T142S)、位於 SEQ ID NO: 32 之位置 L144 的丙胺酸取代 (L144A)、和位於 SEQ ID NO: 32 之位置 Y183 的纈胺酸取代 (Y183V)。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體包含：a)具有 IgG2 Fc 域的 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，該 IgG2 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 32 之位置 S130 的半胱胺酸取代 (S130C) 和位於 SEQ ID NO: 32 之位置 T142 的色胺酸取代 (T142W)；和 b)具有 IgG2 Fc 域的 ALK4-Fc 融合蛋白質，該 IgG2 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 32 之位置 Y125 的半胱胺酸取代 (Y125C)、位於 SEQ ID NO: 32 之位置 T142 的絲胺酸取代 (T142S)、位於 SEQ ID NO: 32 之位置 L144 的丙胺酸取代 (L144A)、和位於 SEQ ID NO: 32 之位置 Y183 的纈胺酸取代 (Y183V)。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體包含：a)具有 IgG3 Fc 域的 ALK4-Fc 融合蛋白質，該 IgG3 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 33 之位置 S139 的半胱胺酸取代 (S139C) 和位於 SEQ ID NO: 33 之位置 T151 的色胺酸取代 (T151W)；和 b)具有 IgG3 Fc 域的 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，該 IgG3 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 33 之位置 Y134 的半胱胺酸取代 (Y134C)、位於 SEQ ID NO: 33 之位置 T151 的絲胺酸取代 (T151S)、位於 SEQ ID NO: 33 之位置 L153 的丙胺酸取代

(L153A)、和位於 SEQ ID NO: 33 之位置 Y192 的纈胺酸取代 (Y192V)。

於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體包含：a)具有 IgG3 Fc 域的 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，該 IgG3 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 33 之位置 S139 的半胱胺酸取代 (S139C) 和位於 SEQ ID NO: 33 之位置 T151 的色胺酸取代 (T151W)；和 b)具有 IgG3 Fc 域的 ALK4-Fc 融合蛋白質，該 IgG3 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 33 之位置 Y134 的半胱胺酸取代 (Y134C)、位於 SEQ ID NO: 33 之位置 T151 的絲胺酸取代 (T151S)、位於 SEQ ID NO: 33 之位置 L153 的丙胺酸取代 (L153A)、和位於 SEQ ID NO: 33 之位置 Y192 的纈胺酸取代 (Y192V)。

於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體包含：

a)具有 IgG4 Fc 域的 ALK4-Fc 融合蛋白質，該 IgG4 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 35 之位置 S136 的半胱胺酸取代 (S136C) 和位於 SEQ ID NO: 35 之位置 T148 的色胺酸取代 (T148W)；和 b)具有 IgG4 Fc 域的 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，該 IgG4 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 35 之位置 Y131 的半胱胺酸取代 (Y131C)、位於 SEQ ID NO: 35 之位置 T148 的絲胺酸取代 (T148S)、位於 SEQ ID NO: 35 之位置 L150 的丙胺酸取代 (L150A)、和位於 SEQ ID NO: 35 之位置 Y189 的纈胺酸取代 (Y189V)。

於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體包含：a)具有 IgG4 Fc 域的 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，該 IgG4 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 35 之位置 S136 的半胱胺酸取代 (S136C) 和位於 SEQ ID NO: 35 之位置 T148 的色胺酸取代 (T148W)；和 b)具有 IgG4 Fc 域的 ALK4-Fc 融合蛋白質，該 IgG4 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 35 之位置 Y131 的半胱胺酸取代 (Y131C)、位於 SEQ ID NO: 35 之位置 T148 的絲胺酸取代 (T148S)、位於 SEQ ID NO: 35 之位置 L150 的丙胺酸取代

(L150A)、和位於 SEQ ID NO: 35 之位置 Y189 的纈胺酸取代 (Y189V)。

【0019】 於某些方面，本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體包含：a)具有 Fc 域的 ALK4-Fc 融合蛋白質，該 Fc 域係與 SEQ ID NO: 66 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的；和 b)具有 Fc 域的 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，該 Fc 域係與 SEQ ID NO: 67 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 66 之 138 的位置的麩胺酸；b)位於對應於 SEQ ID NO: 66 之位置 217 的天門冬胺酸；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 66 之 138 的位置的麩胺酸和位於對應於 SEQ ID NO: 66 之位置 217 的天門冬胺酸。視需要地，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域進一步包含位於對應於 SEQ ID NO: 66 之 132 的位置的半胱胺酸和位於對應於 SEQ ID NO: 66 之 144 的位置的色胺酸。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 67 之 162 的位置的精胺酸；b)位於對應於 SEQ ID NO: 67 之 179 的位置的精胺酸；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 67 之 162 的位置的精胺酸和位於對應於 SEQ ID NO: 67 之 179 的位置的精胺酸。視需要地，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域進一步包含位於對應於 SEQ ID NO: 67 之 127 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 67 之 144 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 67 之 146 的位置的丙胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 67 之 185 的位置的纈胺酸。

【0020】 於某些方面，本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體包含：a)具有 Fc 域的 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，該 Fc 域係與 SEQ ID NO: 66 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的；和 b)具有 Fc 域的 ALK4-Fc 融合蛋白質，該 Fc 域係與 SEQ ID NO: 67 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 66 之 138 的位置的麩胺酸；b)位於對應於 SEQ ID NO: 66 之位置 217 的天門冬胺酸；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 66 之 138 的位置的麩胺酸和位於對應於 SEQ ID NO: 66 之位置 217 的天門冬胺酸。視需要地，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域進一步包含位於對應於 SEQ ID NO: 66 之 132 的位置的半胱胺酸和位於對應於 SEQ ID NO: 66 之 144 的位置的色胺酸。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：a)位於對應於 SEQ ID NO: 67 之 162 的位置的精胺酸；b)位於對應於 SEQ ID NO: 67 之 179 的位置的精胺酸；和 c)位於對應於 SEQ ID NO: 67 之 162 的位置的精胺酸和位於對應於 SEQ ID NO: 67 之 179 的位置的精胺酸。視需要地，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域進一步包含位於對應於 SEQ ID NO: 67 之 127 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 67 之 144 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 67 之 146 的位置的丙胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 67 之 185 的位置的纈胺酸。

【0021】 於某些方面，本文之揭露內容係關於重組 ALK4:ActRIIB 異

多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中：a)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 IgG1 Fc 域，該 IgG1 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 S132 的位置的半胱胺酸 (S132C)、位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 T144 的位置的色胺酸 (T144W)、和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 H213 的位置的酸性胺基酸；和 b)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 IgG1 Fc 域，該 IgG1 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 Y127 的位置的半胱胺酸 (Y127C)、位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 T144 的位置的絲胺酸 (T144S)、位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 L146 的位置的丙胺酸 (L146A)、和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 Y185 的位置的纈胺酸 (Y185V)。於一些實施方式中，其中該位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 H213 的位置的酸性胺基酸係天門冬胺酸。於一些實施方式中，該位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 H213 的位置的酸性胺基酸係麩胺酸。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域係與 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域係與 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的。

【0022】 於某些方面，本文之揭露內容係關於重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中：a)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 IgG1 Fc 域，該 IgG1 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 S132 的位置的半胱胺酸 (S132C)、位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 T144 的位置的色胺酸 (T144W)、和位於對應於

SEQ ID NO: 31 之 H213 的位置的酸性胺基酸；和 b)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 IgG1 Fc 域，該 IgG1 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 Y127 的位置的半胱胺酸 (Y127C)、位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 T144 的位置的絲胺酸 (T144S)、位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 L146 的位置的丙胺酸 (L146A)、和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 Y185 的位置的纈胺酸 (Y185V)。於一些實施方式中，其中該位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 H213 的位置的酸性胺基酸係天門冬胺酸。於一些實施方式中，該位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 H213 的位置的酸性胺基酸係麩胺酸。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域係與 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域係與 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的。於某些方面，本文之揭露內容係關於重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中：

a)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 IgG1 Fc 域，該 IgG1 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 S132 的位置的半胱胺酸 (S132C)、和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 T144 的位置的色胺酸 (T144W)；和 b)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 IgG1 Fc 域，該 IgG1 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 Y127 的位置的半胱胺酸 (Y127C)、位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 T144 的位置的絲胺酸 (T144S)、位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 L146 的位置的丙胺酸 (L146A)、位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 Y185 的位置的纈胺酸 (Y185V)、

和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 H213 的位置的酸性胺基酸。於一些實施方式中，其中該位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 H213 的位置的酸性胺基酸係天門冬胺酸。於一些實施方式中，該位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 H213 的位置的酸性胺基酸係麩胺酸。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域係與 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域係與 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的。於某些方面，本文之揭露內容係關於重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中：a)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 IgG1 Fc 域，該 IgG1 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 S132 的位置的半胱胺酸 (S132C)、和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 T144 的位置的色胺酸 (T144W)；和 b)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 IgG1 Fc 域，該 IgG1 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 Y127 的位置的半胱胺酸 (Y127C)、位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 T144 的位置的絲胺酸 (T144S)、位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 L146 的位置的丙胺酸 (L146A)、和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 Y185 的位置的纈胺酸 (Y185V)、和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 H213 的位置的酸性胺基酸。於一些實施方式中，其中該位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 H213 的位置的酸性胺基酸係天門冬胺酸。於一些實施方式中，該位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 H213 的位置的酸性胺基酸係麩胺酸。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域係與 SEQ ID NO: 31

之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域係與 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的。

【0023】 於某些方面，本文之揭露內容係關於重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中：a)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 IgG2 Fc 域，該 IgG2 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 S130 的位置的半胱胺酸 (S130C)、位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 T142 的位置的色胺酸 (T142W)、和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 H211 的位置的酸性胺基酸；和 b)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 IgG2 Fc 域，該 IgG2 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 Y125 的位置的半胱胺酸 (Y125C)、位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 T142 的位置的絲胺酸 (T142S)、位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 L144 的位置的丙胺酸 (L144A)、和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 Y183 的位置的纈胺酸 (Y183V)。於一些實施方式中，其中該位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 H211 的位置的酸性胺基酸係天門冬胺酸。於一些實施方式中，該位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 H211 的位置的酸性胺基酸係麩胺酸。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域係與 SEQ ID NO: 32 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域係與 SEQ ID NO: 32 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、

92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的。

【0024】 於某些方面，本文之揭露內容係關於重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中：a)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 IgG2 Fc 域，該 IgG2 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 S130 的位置的半胱胺酸 (S130C)、位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 T142 的位置的色胺酸 (T142W)、和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 H211 的位置的酸性胺基酸；和 b)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 IgG2 Fc 域，該 IgG2 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 Y125 的位置的半胱胺酸 (Y125C)、位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 T142 的位置的絲胺酸 (T142S)、位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 L144 的位置的丙胺酸 (L144A)、和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 Y183 的位置的纈胺酸 (Y183V)。於一些實施方式中，其中該位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 H211 的位置的酸性胺基酸係天門冬胺酸。於一些實施方式中，該位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 H211 的位置的酸性胺基酸係麩胺酸。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域係與 SEQ ID NO: 32 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域係與 SEQ ID NO: 32 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的。

【0025】 於某些方面，本文之揭露內容係關於重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中：a)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 IgG2 Fc 域，該 IgG2 Fc 域包

含位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 S130 的位置的半胱胺酸 (S130C)、和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 T142 的位置的色胺酸 (T142W); 和 b) 該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 IgG2 Fc 域, 該 IgG2 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 Y125 的位置的半胱胺酸 (Y125C)、位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 T142 的位置的絲胺酸 (T142S)、位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 L144 的位置的丙胺酸 (L144A)、位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 Y183 的位置的纈胺酸 (Y183V)、和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 H211 的位置的酸性胺基酸。於一些實施方式中, 其中該位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 H211 的位置的酸性胺基酸係天門冬胺酸。於一些實施方式中, 該位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 H211 的位置的酸性胺基酸係麩胺酸。於一些實施方式中, 該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域係與 SEQ ID NO: 32 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的。於一些實施方式中, 該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域係與 SEQ ID NO: 32 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的。

【0026】 於某些方面, 本文之揭露內容係關於重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體, 其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質, 其中: a) 該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 IgG2 Fc 域, 該 IgG2 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 S130 的位置的半胱胺酸 (S130C)、和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 T142 的位置的色胺酸 (T142W); 和 b) 該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 IgG2 Fc 域, 該 IgG2 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 Y125 的位置的半胱胺酸 (Y125C)、位於對應於 SEQ ID NO: 32

之 T142 的位置的絲胺酸 (T142S)、位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 L144 的位置的丙胺酸 (L144A)、位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 Y183 的位置的纈胺酸 (Y183V)、和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 H211 的位置的酸性胺基酸。於一些實施方式中，其中該位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 H211 的位置的酸性胺基酸係天門冬胺酸。於一些實施方式中，該位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 H211 的位置的酸性胺基酸係麩胺酸。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域係與 SEQ ID NO: 32 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域係與 SEQ ID NO: 32 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的。

【0027】 於某些方面，本文之揭露內容係關於重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中：a)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 IgG4 Fc 域，該 IgG4 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 S136 的位置的半胱胺酸 (S136C)、位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 T148 的位置的色胺酸 (T148W)、和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 H217 的位置的酸性胺基酸；和 b)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 IgG4 Fc 域，該 IgG4 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 Y131 的位置的半胱胺酸 (Y131C)、位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 T148 的位置的絲胺酸 (T148S)、位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 L150 的位置的丙胺酸 (L150A)、和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 Y189 的位置的纈胺酸 (Y189V)。於一些實施方式中，其中該位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 H217

的位置的酸性胺基酸係天門冬胺酸。於一些實施方式中，該位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 H217 的位置的酸性胺基酸係麩胺酸。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域係與 SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域係與 SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的。

【0028】 於某些方面，本文之揭露內容係關於重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中：a)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 IgG4 Fc 域，該 IgG4 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 S136 的位置的半胱胺酸 (S136C)、位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 T148 的位置的色胺酸 (T148W)、和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 H217 的位置的酸性胺基酸；和 b)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 IgG4 Fc 域，該 IgG4 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 Y131 的位置的半胱胺酸 (Y131C)、位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 T148 的位置的絲胺酸 (T148S)、位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 L150 的位置的丙胺酸 (L150A)、和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 Y189 的位置的纈胺酸 (Y189V)。於一些實施方式中，其中該位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 H217 的位置的酸性胺基酸係天門冬胺酸。於一些實施方式中，該位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 H217 的位置的酸性胺基酸係麩胺酸。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域係與 SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、

或更高百分比地一致的。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域係與 SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的。

【0029】 於某些方面，本文之揭露內容係關於重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中：a)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 IgG4 Fc 域，該 IgG4 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 S136 的位置的半胱胺酸 (S136C)、和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 T148 的位置的色胺酸 (T148W)；和 b)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 IgG4 Fc 域，該 IgG4 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 Y131 的位置的半胱胺酸(Y131C)、位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 T148 的位置的絲胺酸 (T148S)、位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 L150 的位置的丙胺酸 (L150A)、位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 Y189 的位置的纈胺酸 (Y189V)、和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 H217 的位置的酸性胺基酸。於一些實施方式中，其中該位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 H217 的位置的酸性胺基酸係天門冬胺酸。於一些實施方式中，該位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 H217 的位置的酸性胺基酸係麩胺酸。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域係與 SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域係與 SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的。

【0030】 於某些方面，本文之揭露內容係關於重組 ALK4:ActRIIB 異

多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中：a)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 IgG4 Fc 域，該 IgG4 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 S136 的位置的半胱胺酸 (S136C)、和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 T148 的位置的色胺酸 (T148W)；和 b)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 IgG4 Fc 域，該 IgG4 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 Y131 的位置的半胱胺酸 (Y131C)、位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 T148 的位置的絲胺酸 (T148S)、位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 L150 的位置的丙胺酸 (L150A)、位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 Y189 的位置的纈胺酸 (Y189V)、和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 H217 的位置的酸性胺基酸。於一些實施方式中，其中該位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 H217 的位置的酸性胺基酸係天門冬胺酸。於一些實施方式中，該位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 H217 的位置的酸性胺基酸係麩胺酸。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域係與 SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域係與 SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的。

【0031】 視需要地，ALK4 多肽係與一或多個異源域直接連結（融合），或可將介入序列（諸如連接子）置於該 ALK4 多肽之胺基酸序列和該一或多個異源域（例如免疫球蛋白之 Fc 域）間。類似地，該 ActRIIB 多肽可與一或多個異源域直接連結（融合），或可將介入序列（諸如連接子）置於該 ActRIIB 多肽之胺基酸序列和該一或多個異源域（例如免疫球蛋白之

Fc 域) 間。連接子可對應於位於 ActRIIB 或 ALK4 之胞外域之 C 末端端的大約 15 個胺基酸非結構化區域(「尾部」)、或其可係相對上無二級結構的介於 5 和 15、20、30、50、100 或更多個胺基酸的人工序列。連接子可富含甘胺酸和脯胺酸殘基且可(例如)含有蘇胺酸/絲胺酸和甘胺酸之重複序列。連接子之實例包括(但不限於)序列 TGGG (SEQ ID NO: 17)、SGGG (SEQ ID NO: 18)、TGGGG (SEQ ID NO: 15)、SGGGG (SEQ ID NO: 16)、GGGGS (SEQ ID NO: 58)、GGGG (SEQ ID NO: 14)、和 GGG (SEQ ID NO: 13)。

【0032】 於某些方面,本文之揭露內容係關於重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體,其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質,其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含與 SEQ ID NO: 76 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%的胺基酸序列,且其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含與 SEQ ID NO: 72 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%的胺基酸序列。於一些實施方式中,該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含一或多個選自以下者的胺基酸:a)位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 234 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 251 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 253 的位置的丙胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 292 的位置的纈胺酸;b)位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 269 的位置的帶正電的胺基酸;c)位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 D286 的位置的帶正電的胺基酸;d)位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 269

的位置的帶正電的胺基酸和位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 286 的位置的帶正電的胺基酸；e)位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 234 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 251 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 253 的位置的丙胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 292 的位置的纈胺酸（Y292V）、和位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 269 的位置的帶正電的胺基酸；f)位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 234 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 251 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 253 的位置的丙胺酸、位於 SEQ ID NO: 76 之位置 292 的纈胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 286 的位置的帶正電的胺基酸；和 g)位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 234 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 251 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 253 的位置的丙胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 292 的位置的纈胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 269 的位置的帶正電的胺基酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 286 的位置的帶正電的胺基酸。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含一或多個選自以下者的胺基酸：a)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 250 的位置的半胱胺酸、和位於 SEQ ID NO: 72 之位置 262 的色胺酸；b)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 256 的位置的帶負電的胺基酸；c)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 335 的位置的帶負電的胺基酸；d)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 256 的位置的帶負電的胺基酸和位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 335 的位置的帶負電的胺基酸；e)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 250 的位置的半胱胺酸、位於 SEQ ID NO: 72 之位置 262 的色胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 256 的位置的帶負電的胺基酸；f)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 250 的位置

的半胱胺酸、位於 SEQ ID NO: 72 之位置 262 的色胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 335 的位置的帶負電的胺基酸；和 g) 位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 250 的位置的半胱胺酸、位於 SEQ ID NO: 72 之位置 262 的色胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 256 的位置的帶負電的胺基酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 335 的位置的帶負電的胺基酸。於一些實施方式中，該帶正電的胺基酸殘基係經修飾的或天然存在的（例如 R、K、或 H）胺基酸。於一些實施方式中，該帶正電的胺基酸殘基係 R。於一些實施方式中，該帶負電的胺基酸殘基係經修飾的或天然存在的（例如 D 或 E）胺基酸。於一些實施方式中，該帶負電的胺基酸殘基係 D。於一些實施方式中，該帶負電的胺基酸殘基係 E。

【0033】 於某些方面，本文之揭露內容係關於重組 ALK4-Fc 融合蛋白質，其包含與 SEQ ID NO: 76 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 的胺基酸序列。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸：a) 位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 234 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 251 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 253 的位置的丙胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 292 的位置的纈胺酸；b) 位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 269 的位置的帶正電的胺基酸；c) 位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 286 的位置的帶正電的胺基酸；d) 位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 269 的位置的帶正電的胺基酸和位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 286 的位置的帶正電的胺基酸；e) 位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 234 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID

NO: 76 之 251 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 253 的位置的丙胺酸、位於 SEQ ID NO: 76 之位置 292 的纈胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 269 的位置的帶正電的胺基酸；f)位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 234 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 251 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 253 的位置的丙胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 292 的位置的纈胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 286 的位置的帶正電的胺基酸；和 g)位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 234 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 251 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 253 的位置的丙胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 292 的位置的纈胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 269 的位置的帶正電的胺基酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 286 的位置的帶正電的胺基酸。於一些實施方式中，該帶正電的胺基酸殘基係經修飾的或天然存在的（例如 R、K、或 H）胺基酸。於一些實施方式中，該帶正電的胺基酸殘基係 R。

【0034】 於某些方面，本文之揭露內容係關於重組 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其包含與 SEQ ID NO: 72 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%的胺基酸序列。於一些實施方式中，該融合蛋白質包含一或多個選自以下者的胺基酸：a)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 250 的位置的半胱胺酸和位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 262 的位置的色胺酸；b)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 256 的位置的帶負電的胺基酸；c)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 335 的位置的帶負電的胺基酸；d)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 256 的位置的帶負電的胺基酸和位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 335 的位

置的帶負電的胺基酸；e)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 250 的位置的半胱胺酸、位於 SEQ ID NO: 72 之位置 262 的色胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 256 的位置的帶負電的胺基酸；f)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 250 的位置的半胱胺酸、位於 SEQ ID NO: 72 之位置 262 的色胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 335 的位置的帶負電的胺基酸；和 g)位於對應於 SEQ ID NO: 7 之 250 的位置的半胱胺酸、位於 SEQ ID NO: 72 之位置 262 的色胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 256 的位置的帶負電的胺基酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 335 的位置的帶負電的胺基酸。於一些實施方式中，該帶負電的胺基酸殘基係經修飾的或天然存在的（例如 D 或 E）胺基酸。於一些實施方式中，該帶負電的胺基酸殘基係 D。於一些實施方式中，該帶負電的胺基酸殘基係 E。

【0035】 於某些方面，本文之揭露內容係關於重組 ALK4-Fc 融合蛋白質，其包含與 SEQ ID NO: 74 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%的胺基酸序列。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸：a)位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 258 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 275 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 277 的位置的丙胺酸、和位於 SEQ ID NO: 74 之位置 316 的纈胺酸；b)位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 293 的位置的帶正電的胺基酸；c)位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 310 的位置的帶正電的胺基酸；d)位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 293 的位置的帶正電的胺基酸和位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 310 的位置的帶正電的胺基酸；e)位於對應於

SEQ ID NO: 74 之 258 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 275 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 277 的位置的丙胺酸、位於 SEQ ID NO: 74 之位置 316 的纈胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 293 的位置的帶正電的胺基酸；f)位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 258 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 275 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 277 的位置的丙胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 316 的位置的纈胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 310 的位置的帶正電的胺基酸 g)位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 258 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 275 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 277 的位置的丙胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 316 的位置的纈胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 293 的位置的帶正電的胺基酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 310 的位置的帶正電的胺基酸。於一些實施方式中，該帶正電的胺基酸殘基係經修飾的或天然存在的（例如 R、K、或 H）胺基酸。於一些實施方式中，該帶正電的胺基酸殘基係 R。

【0036】 於某些方面，本文之揭露內容係關於重組 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其包含與 SEQ ID NO: 70 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%的胺基酸序列。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸：a)位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 275 的位置的半胱胺酸和位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 287 的位置的色胺酸；b)位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 281 的位置的帶負電的胺基酸；c)位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 360 的位置的帶負電的胺基酸；d)位於

對應於 SEQ ID NO: 70 之 281 的位置的帶負電的胺基酸和位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 360 的位置的帶負電的胺基酸；e)位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 275 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 287 的位置的色胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 281 的位置的帶負電的胺基酸；f)位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 275 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 287 的位置的色胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 360 的位置的帶負電的胺基酸；和 g)位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 275 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 287 的位置的色胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 281 的位置的帶負電的胺基酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 360 的位置的帶負電的胺基酸。於一些實施方式中，該帶負電的胺基酸殘基係經修飾的或天然存在的（例如 D 或 E）胺基酸。於一些實施方式中，該帶負電的胺基酸殘基係 D。於一些實施方式中，該帶負電的胺基酸殘基係 E。

【0037】 於某些方面，本文之揭露內容係關於重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含與 SEQ ID NO: 48 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%的胺基酸序列，且其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含與 SEQ ID NO: 80 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%的胺基酸序列。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 48 之

234 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 48 之 251 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 48 之 253 的位置的丙胺酸、和位於 SEQ ID NO: 48 之位置 292 的纈胺酸。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 80 之 250 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 80 之 262 的位置的色胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 80 之 331 的位置的精胺酸。

【0038】 於某些方面，本文之揭露內容係關於重組 ALK4-Fc 融合蛋白質，其包含與 SEQ ID NO: 48 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%的胺基酸序列。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 48 之 234 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 48 之 251 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 48 之 253 的位置的丙胺酸、和位於 SEQ ID NO: 48 之位置 292 的纈胺酸。

【0039】 於某些方面，本文之揭露內容係關於重組 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其包含與 SEQ ID NO: 80 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%的胺基酸序列。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 80 之 250 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 80 之 262 的位置的色胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 80 之 331 的位置的精胺酸。

【0040】 於某些方面，本文之揭露內容係關於重組 ALK4-Fc 融合蛋白質，其包含與 SEQ ID NO: 47 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、

86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%的胺基酸序列。於一些實施方式中，該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 47 之 258 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 47 之 275 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 47 之 277 的位置的丙胺酸、和位於 SEQ ID NO: 47 之位置 316 的纈胺酸。

【0041】 於某些方面，本文之揭露內容係關於重組 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其包含與 SEQ ID NO: 78 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%的胺基酸序列。於一些實施方式中，該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 78 之 275 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 78 之 287 的位置的色胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 78 之 356 的位置的精胺酸。

【0042】 視需要地，ALK4 及／或 ActRIIB 多肽包含一或多個選自以下者的經修飾的胺基酸殘基：醣苷化胺基酸、PEG 化胺基酸、法尼基化（Farnesylated）胺基酸、乙醯化胺基酸、生物素化胺基酸、與脂質部分共軛的胺基酸、和與有機衍生化劑共軛的胺基酸。ALK4 及／或 ActRIIB 多肽可包含至少一個 N-連接的糖，且可包括二個、三個或更多個 N-連接的糖。如此多肽亦可包含 O-連接的糖。ALK4 及／或 ActRIIB 多肽可於各種各樣以適於患者使用的方式醣苷化該蛋白質的細胞株（包括經工程改造的昆蟲或酵母菌細胞、和哺乳動物細胞，諸如 COS 細胞、CHO 細胞、HEK 細胞和 NSO 細胞）中產生。於一些實施方式中，ALK4 及／或 ActRIIB 多肽係經醣苷化且具有可自中國倉鼠卵巢細胞株獲得的醣苷化模式。較佳地，本

文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體複合物於哺乳動物（例如小鼠或人類）中展現至少 4、6、12、24、36、48、或 72 小時的血清半生期。視需要地，ALK4:ActRIIB 異多聚體於哺乳動物（例如小鼠或人類）中可展現至少 6、8、10、12、14、20、25、或 30 日的血清半生期。

【0043】 於某些方面，本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體與一或多個 TGF-β 超家族配體結合。視需要地，ALK4:ActRIIB 異多聚體以小於或等於 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、或 10^{-12} M 的 K_D 與此等配體之一或多者結合。例如，於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與活化素 B 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與活化素 A 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與活化素 AB 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與活化素 C 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與活化素 AC 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與活化素 BC 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與活化素 BC 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與活化素 BE 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與 GDF11 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與 GDF8 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與 BMP6 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與 GDF3 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與 BMP10 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體不（或不實質上）與 BMP9 結合（例如以大於或等於 10^{-8} 或 10^{-7} 的 K_D 結合）。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體相較於對應的 ActRIIB 同多聚體以較強的親和力與活化素 B 結合。

於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體相較於對應的 ActRIIB 同多聚體以較弱的親和力與 GDF3 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體相較於對應的 ActRIIB 同多聚體以較弱的親和力與 BMP10 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體相較於對應的 ActRIIB 同多聚體以較弱的親和力與 BMP9 結合。

【0044】 一般而言，本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體拮抗（抑制）至少一種 TGF- β 超家族配體之一或多種活性，且如此活性之改變可使用種種所屬技術領域中已知的分析（包括（例如）諸如該等於本文中描述的基於細胞的分析）測量。於某些方面，ALK4:ActRIIB 異多聚體可用於在（例如）基於細胞的分析中抑制由一或多種 TGF β 超家族配體介導的傳訊（例如 Smad 2/3 及／或 Smad 1/5/8 傳訊）。例如，於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中抑制活化素傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中抑制活化素傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中抑制活化素 A 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中抑制活化素 B 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中抑制活化素 AB 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中抑制活化素 C 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中抑制活化素 AC 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中抑制活化素 BC 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中抑制活化素 E 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞

的分析中抑制活化素 AE 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中抑制活化素 CE 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中抑制 GDF11 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中抑制 GDF8 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中抑制 BMP6 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中抑制 GDF3 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中抑制 BMP10 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中不抑制（或不實質上地抑制）BMP9 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中係活化素 B 傳訊之較強的抑制劑。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中係 GDF3 傳訊之較弱的抑制劑。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中係 BMP10 傳訊之較弱的抑制劑。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中係 BMP9 傳訊之較弱的抑制劑。

【0045】 於本文中描述的 ALK4:ActRIIB 異多聚體之任何者可被調配成醫藥製劑（組成物）。於一些實施方式中，醫藥製劑包含醫藥上可接受的載劑。於一些實施方式中，醫藥製劑會係無熱原的（意謂無熱原至管理用於治療用途的產品之品質的法規所要求的程度）。醫藥製劑亦可包括一或多種其他的化合物，諸如用於治療於本文中描述的病症／病況的化合物。一般而言，ALK4:ActRIIB 異多聚體醫藥製劑實質上不含 ALK4 及／或 ActRIIB 同多聚體。例如，於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體醫藥製劑包

含低於約 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、或低於約 1% ALK4 同多聚體。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體醫藥製劑包含低於約 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、或低於約 1% ActRIIB 同多聚體。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體醫藥製劑包含低於約 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、或低於約 1% ALK4 同多聚體和少於約 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、或低於約 1% ActRIIB 同多聚體。

【0046】 於某些方面，本文之揭露內容提供編碼如於本文中描述的 ActRIIB 多肽的核酸。例如，ActRIIB 核酸可包含與 SEQ ID NO: 7 之 73-396 之序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的核酸或於嚴苛條件下與 SEQ ID NO: 7 之核苷酸 73-396 之互補物雜交者。如此核酸可係包含 SEQ ID NO: 8 之序列者。於一些實施方式中，ActRIIB 核酸包含與 SEQ ID NO: 71 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的核苷酸序列。於一些實施方式中，ActRIIB 核酸包含與 SEQ ID NO: 73 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的核苷酸序列。於一些實施方式中，ActRIIB 核酸包含與 SEQ ID NO: 79 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的核苷酸序列。於一些實施方式中，ActRIIB 核酸包含與 SEQ ID NO: 81 至少 70%、75%、80%、85%、86%、

87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的核苷酸序列。

【0047】 於某些方面，本文之揭露內容提供編碼如於本文中描述的 ActRIIB 多肽的核酸。例如，ALK4 核酸可包含以下者、基本上由以下者所組成、或由以下者所組成：與 SEQ ID NO: 11 之 70-378 之序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的核酸或於嚴苛條件下與 SEQ ID NO: 11 之核苷酸 70-378 之互補物雜交者。於一些實施方式中，ALK4 核酸包含與 SEQ ID NO: 75 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的核苷酸序列。於一些實施方式中，ALK4 核酸包含與 SEQ ID NO: 77 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的核苷酸序列。於一些實施方式中，ALK4 核酸包含與 SEQ ID NO: 82 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的核苷酸序列。於一些實施方式中，ALK4 核酸包含與 SEQ ID NO: 83 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的核苷酸序列。

【0048】 於某些方面，本文之揭露內容提供包含 ALK4 多肽之編碼序列和 ActRIIB 多肽之編碼序列的核酸序列。例如，於一些實施方式中，本文之揭露內容之核酸 a)包含與 SEQ ID NO: 71、73、79、和 77 之任一者

至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的核苷酸序列、和 b)包含以下者、基本上由以下者所組成、或由以下者所組成：與 SEQ ID NO: 75、77、82、和 83 之任一者至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的核苷酸序列。

【0049】 較佳地，ALK4 及／或 ActRIIB 核酸係經分離的及／或重組的核酸。於本文中揭露的核酸可與用於表現的啟動子可操作地連接。本文之揭露內容進一步提供包含如此 ALK4 及／或 ActRIIB 多核苷酸的載體以及包含如此 ALK4 及／或 ActRIIB 多核苷酸以及包含如此 ALK4 及／或 ActRIIB 多核苷酸的載體的細胞（例如 CHO 細胞），較佳係自人類或其他脊椎動物物種分離的細胞。

【0050】 於某些方面，ALK4 多肽及／或 ActRIIB 多肽可在哺乳動物細胞株中表現，該細胞株視需要係介導 ActRIIB 或 ALK4 蛋白質之適當天然糖苷化以降低患者中不利的免疫反應之可能性（包括獸醫學患者之可能性）的細胞株。已成功地使用人類和 CHO 細胞株，且預期到其他普通哺乳動物表現載體會係有用的。因此，本文之揭露內容提供包含於本文中揭露的核酸之任何者的經培養的細胞。如此細胞可係哺乳動物細胞，包括 CHO 細胞、NSO 細胞、HEK 細胞和 COS 細胞。可基於意欲的患者之物種選擇其他細胞。其他細胞係於本文中揭露。經培養的細胞應被理解成意謂維持於實驗室或其他人工條件（例如冷凍、或於培養基中）中且非活有機體之部分的細胞。

【0051】 於某些方面，本文之揭露內容提供用於製造於本文中描述的 ALK4 和 ActRIIB 多肽之任何者的方法以及包含如此多肽的 ALK4:ActRIIB 異多聚體複合物。如此方法可包括在適合的細胞（例如 CHO 細胞或 COS 細胞）中表現於本文中揭露的核酸之任何者。例如，於一些實施方式中，製造包含 ALK4 多肽和 ActRIIB 多肽的異多聚體的方法包含：在適合表現 ALK4 多肽和 ActRIIB 多肽的條件下培養細胞，其中該細胞包含 ALK4 多核苷酸和 ActRIIB 多核苷酸；視需要地回收所表現的異多聚體。供選擇地，製造包含 ALK4 多肽和 ActRIIB 多肽的異多聚體的方法可包含：a)在適合表現 ALK4 多肽的條件下培養第一細胞，其中該第一細胞包含 ALK4 多核苷酸；b)回收所表現的 ALK4 多肽；c)在適合表現 ActRIIB 多肽的條件下培養第二細胞，其中該第二細胞包含 ActRIIB 多核苷酸；d)回收所表現的 ActRIIB 多肽；e)在適合 ALK4:ActRIIB 異多聚體形成的條件下組合所回收的 ALK4 多肽和所回收的 ActRIIB 多肽；視需要地回收該 ALK4:ActRIIB 異多聚體。於某些實施方式中，ALK4 及／或 ActRIIB 多肽係使用 TPA 前導序列（例如 SEQ ID NO: 38）表現。於某些實施方式中，ALK4 及／或 ActRIIB 多肽係於 CHO 細胞中表現。於本文中描述的 ALK4 和 ActRIIB 多肽（以及其等之蛋白質複合物）可以粗流份、部分純化的流份、或高度純化的流份（使用廣為人知的用於自細胞培養獲得蛋白質的技術之任何者）回收。一般而言，如此方法導致實質上不含 ALK4 及／或 ActRIIB 同多聚體的 ALK4:ActRIIB 異多聚體。例如，於一些實施方式中，用於生產 ALK4:ActRIIB 異多聚體的方法導致低於約 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、或低於約 1% ALK4 同多聚體。於一些實施方式中，用於生產 ALK4:ActRIIB

異多聚體的方法導致低於約 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、或低於約 1% ActRIIB 同多聚體。於一些實施方式中，用於生產 ALK4:ActRIIB 異多聚體的方法導致低於約 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、或低於約 1% ALK4 同多聚體和低於約 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、或低於約 1% ActRIIB 同多聚體。

【0052】 本文之揭露內容進一步提供用於治療或預防種種與（例如）肌肉、骨骼、脂肪、紅血球、和其他組織相關的與 ALK4:ActRIIB 相關的疾病和病況的方法和 ALK4:ActRIIB 異多聚體。如此疾病和病症包括（但不限於）與肌肉流失或肌肉生長不足有關的病症（例如肌肉萎縮；肌肉營養不良、包括 Duchenne 氏肌肉營養不良、Becker 氏肌肉營養不良、和臉肩胛肱骨肌肉營養不良；肌肉萎縮性脊髓側索硬化症；散發性包涵體肌炎、遺傳性包涵體肌炎、和惡病質）和與非所欲的獲重相關的病症（例如肥胖、第 2 型糖尿病或非胰島素依賴型糖尿病（NIDDM）、心血管疾病、高血壓、骨關節炎、中風、呼吸問題、和膽囊疾病）。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體可用於在需要其的對象中降低體脂肪含量或降低體脂肪含量增加之速率。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體可用於在患者中降低膽固醇及／或三酸甘油酯水平。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體可用於治療或預防纖維化或與纖維化相關的病症或病況（例如腎衰竭、慢性腎病、囊腫性纖維化、和骨髓纖維化）。

【0053】 本文之揭露內容進一步提供用於治療或預防種種與（例如）腎臟相關的與 ALK4:ActRIIB 相關的疾病和病況的方法和 ALK4:ActRIIB 異多聚體。如此疾病或病況包括（例如）慢性腎臟疾病或衰竭、急性腎臟疾

病或衰竭、具有第 1 期腎臟疾病的患者、具有第 2 期腎臟疾病的患者、具有第 3 期腎臟疾病的患者、具有第 4 期腎臟疾病的患者、具有第 5 期腎臟疾病的患者、非糖尿病性腎臟疾病、腎小球性腎炎、間質性腎炎、糖尿病性腎臟疾病、糖尿病性腎病、腎小球硬化、快速進展性腎小球性腎炎、腎纖維化、Alport 氏症候群、IDDM 腎炎、環間膜增生性腎小球性腎炎、膜增生性腎小球性腎炎、新月形腎小球性腎炎、腎間質纖維化、局灶性節段性腎小球硬化、膜性腎病、微小改變疾病、少免疫快速進展性腎小球性腎炎、IgA 腎病、多囊性腎臟疾病、Dent 氏病、腎半胱胺酸積蓄症（nephrocytinosis）、Heymann 氏腎炎、體染色體顯性（成人型）多囊性腎臟疾病、體染色體隱性（幼兒型）多囊性腎臟疾病、急性腎臟損傷、腎病症候群、腎缺血、足細胞疾病或病症、蛋白尿、腎小球疾病、膜性腎小球性腎炎、局灶性節段性腎小球性腎炎、子癇前症、子癇、腎臟病灶、膠原血管病、良性直立性（姿勢性）蛋白尿、IgM 腎病、膜性腎病、類肉瘤病、糖尿病、導因於藥物的腎臟傷害、Fabry 氏病、胺基酸尿、Fanconi 氏症候群、高血壓性腎硬化、間質性腎炎、鐮形血球貧血症、血紅素尿、肌球蛋白尿、華格納氏肉芽病、第 1 型肝糖蓄積病、慢性腎臟疾病、慢性腎衰竭、低腎小球濾過率（GFR）、腎血管硬化、狼瘡性腎炎、ANCA 陽性少免疫新月形腎小球性腎炎、慢性同種異體移植腎病、腎毒性、腎的毒性、腎臟壞死、腎臟傷害、腎小球和腎小管損傷、腎臟功能異常、腎炎症候群、急性腎衰竭、慢性腎衰竭、近端小管功能異常、急性腎臟移植排斥、慢性腎臟移植排斥、非 IgA 環間膜增生性腎小球性腎炎、感染後腎小球性腎炎、以任何方式涉及腎的脈管炎、任何遺傳性腎病、任何間質性腎炎、腎移植失

敗、腎臟癌、與其他病況（例如高血壓、糖尿病、和自體免疫疾病）相關的腎臟疾病、Dent 氏病、腎半胱胺酸積蓄症、Heymann 氏腎炎、原發性腎臟疾病、塌陷性腎小球病變、密度沈積病、與冷凝球蛋白血症相關的腎小球性腎炎、Henoch-Schonlein 二氏病、感染後腎小球性腎炎、細菌性心內膜炎、顯微多發性血管炎、Churg-Strauss 二氏症候群、抗 GBM 抗體介導性腎小球性腎炎、類澱粉變性、單株免疫球蛋白沉積病、原纖維性腎小球性腎炎、免疫觸突樣（immunotactoid）腎小球病變、缺血性腎小管損傷、給藥誘發性腎小管-間質性腎炎、毒性腎小管-間質性腎炎、感染性腎小管-間質性腎炎、細菌性腎盂腎炎、導因於多瘤病毒感染或 HIV 感染的病毒感染性腎小管-間質性腎炎、代謝誘發性腎小管-間質性疾病、混合型結締組織疾病、管型腎病、導因於尿酸鹽或草酸鹽或藥物誘發性結晶沉積的結晶性腎病、急性細胞性腎小管-間質性同種異體移植排斥、導因於淋巴瘤或移植後淋巴增生性疾病的腫瘤浸潤性疾病、腎臟之閉鎖性疾病、血管病、栓塞性微血管病、腎血管硬化、動脈硬化梗塞疾病、混合型結締組織疾病、結節性多動脈炎、鈣調磷酸酶（calcineurin）抑制劑誘發性血管病、急性細胞性血管同種異體移植排斥、急性體液性同種異體移植排斥、早期腎功能衰退（ERFD）、末期腎病（ESRD）、腎靜脈栓塞、急性腎小管壞死、腎阻塞、急性間質性腎炎、已建立的慢性腎臟疾病、腎動脈狹窄、缺血性腎病、尿毒症、藥物和毒素誘發性慢性腎小管間質性腎炎、反流性腎病、腎結石、Goodpasture 氏症候群、正球性正血色性貧血、腎貧血、糖尿病慢性腎臟疾病、與 IgG4 相關的疾病、von Hippel-Lindau 二氏症候群、結節性硬化、腎消耗病（Nephronophthisis）、腎髓質囊性病、腎細胞癌、腺癌、腎胚細胞瘤、

淋巴瘤、白血病、唾液酸化不足 (hyposialylation) 病症、慢性環孢素腎病、腎再灌注損傷、腎發育不良、氮血症、兩側動脈阻塞、急性尿酸腎病、低血容、急性兩側阻塞性尿路病變、高血鈣性腎病、溶血性尿毒性症候群、急性尿滯留、惡性腎硬化、分娩後腎小球硬化、硬皮症、非 Goodpasture 氏抗 GBM 疾病、顯微結節性多動脈炎、過敏性肉芽腫病、急性輻射腎炎、鏈球菌後腎小球性腎炎、Waldenstrom 氏巨球蛋白血症、鎮痛劑腎病、動靜脈瘻管、動靜脈移植物、透析、腎臟異位、髓質海綿腎、腎性骨營養不良、單腎、水腎、微白蛋白尿、尿毒症、血尿、高脂血症、低白蛋白血症、脂尿症、酸中毒、和高血鉀症。於一些實施方式中，本文之揭露內容進一步提供用於延遲或預防自第 1 期進展至第 2 期腎臟疾病、自第 2 期進展至第 3 期腎臟疾病、自第 3 期進展至第 4 期腎臟疾病、或自第 4 期進展至第 5 期腎臟疾病的方法和 ALK4:ActRIIB 拮抗劑。於一些實施方式中，本文之揭露內容進一步提供用於預防或降低腎臟發炎的方法和 ALK4:ActRIIB 異多聚體。於一些實施方式中，本文之揭露內容進一步提供用於預防或降低腎臟傷害的方法和 ALK4:ActRIIB 異多聚體。於一些實施方式中，本文之揭露內容進一步提供用於預防或降低腎臟纖維化的方法和 ALK4:ActRIIB 異多聚體。

【圖式簡單說明】

【0054】 圖 1 顯示人類 ActRIIA 之胞外域 (SEQ ID NO: 49) 和人類 ActRIIB 之胞外域 (SEQ ID NO: 2) 之排比，於本文中演繹 (基於多個 ActRIIB 和 ActRIIA 結晶結構的綜合分析) 的直接接觸配體的殘基係以框指出。

【0055】 圖 2 顯示種種脊椎動物 ActRIIB 前驅蛋白質(不含其等之細胞內域)(分別為 SEQ ID NO: 50-55)人類 ActRIIA 前驅蛋白質(不含其細胞內域)(SEQ ID NO: 56)、和共通 ActRII 前驅蛋白質 (SEQ ID NO: 57)之多重序列排比。

【0056】 圖 3 顯示使用 Clustal 2.1 來自人類 IgG 同型的 Fc 域之多重序列排比。鉸鏈區域係以虛線底線指出。雙重底線指出在 IgG1 Fc 中經工程改造以促進非對稱鏈配對的位置和其他同型 IgG2、IgG3 和 IgG4 之相對應的位置之實例。

【0057】 圖 4 顯示 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體蛋白質複合物相較於 ActRIIB-Fc 同二聚體和 ALK4-Fc 同二聚體比較性配體結合數據。對於各蛋白質複合物，配體係按 k_{off} (與配體傳訊抑制良好地相關的動力學常數)排列並按結合親和力以遞降次序列出(最緊密結合的配體係於頂部列出)。於左邊，黃色、紅色、綠色、和藍色線指出解離速率常數之大小。黑色實線指出相較於同二聚體與異二聚體之結合增強或未改變的配體，而紅色虛線指出相較於同二聚體結合實質上降低者。如所顯示的，該 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體相較於同二聚體之任一者顯示增強的與活化素 B 之結合，保留強力的與活化素 A、GDF8、和 GDF11 之結合(如使用 ActRIIB-Fc 同二聚體時觀察到的)、和展現實質上降低的與 BMP9、BMP10、和 GDF3 之結合。與 ActRIIB-Fc 同二聚體類似，該異二聚體保留中等水平的與 BMP6 之結合。

【0058】 圖 5 顯示源自種種脊椎動物物種的 ALK4 胞外域之多重序列排比 (SEQ ID NO: 59-65)。

【0059】 圖 6A-6D 顯示包含 ALK4 多肽和 ActRIIB 多肽的異多聚性蛋白質複合物之圖解實例。

【0060】 於所圖解的實施方式中，該 ALK4 多肽（從左到右）係融合多肽之包含交互作用對之第一成員（「C1」）的部分，且該 ActRIIB 多肽係融合多肽之包含交互作用對之第二成員（「C2」）的部分。適合的交互作用對包括（例如）重鏈及／或輕鏈免疫球蛋白交互作用對、截短、和其變體，諸如該等於本文中描述者（例如 Spiess 等人(2015) *Molecular Immunology* 67(2A): 95-106）。於各融合多肽中，連接子可被置於該 ALK4 或 ActRIIB 多肽和該交互作用對之相對應的成員間。該交互作用對之第一和第二成員可係非導向的，意謂該對之成員可彼此連結或自我連結而無實質上的偏好，且其等可具有相同或不同的胺基酸序列。參見圖 6A。供選擇地，該交互作用對可係導向的（非對稱的）對，意謂該對之成員優先彼此連結而非自我連結。參見圖 6B。可預想到更高級的複合物。參見圖 6C 和 6D。

【0061】 圖 7 顯示如由如於本文中描述的 A-204 報導基因分析測定的比較性 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體/ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 同二聚體 IC₅₀ 數據。ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體類似於 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體地抑制活化素 A、活化素 B、GDF8、和 GDF11 傳訊途徑。然而，BMP9 和 BMP10 傳訊途徑之 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體抑制相較於 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體顯著降低。此等數據顯示 ALK4:ActRIIB 異二聚體相較於相對應的 ActRIIB:ActRIIB 同二聚體係活化素 A、活化素 B、GDF8、和 GDF11 之更具選擇性的拮抗劑。

【0062】 圖 8A-8C 顯示來自接受單側輸尿管阻塞（UUO）的小鼠腎

臟的纖維變性基因 (Colla1、纖維接合素、PAI-1、CTGF、和 α -SMA)、發炎基因 (TNF-阿爾法、和 MCP1)、細胞介素基因 (TGF-貝他 1、GF-貝他 2、TGF-貝他 3、和活化素 A)、腎臟損傷基因 (NGAL)、低氧可誘發性因子 1-阿爾法 (HIF1a)、和活化素 A 受體 (Acvr2A) 之基因表現輪廓。使用來自對側未經手術的腎臟之樣本作為對照組 (Ctrl)。於手術後第 17 日獲得基因表現輪廓。於手術後第 3、7、10、和 14 日投予小鼠 PBS 或 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 同二聚體。(\$)表示於第 17 日在僅僅投予 PBS 的小鼠中的 UUO 腎臟間的統計差異，相較於於 17 日在投予 ALK7-Fc:ActRIIB-Fc 同二聚體的小鼠中的 UUO 腎臟。(@)表示未偵測到轉錄物。

【實施方式】

1.概觀

【0063】 部分地，本文之揭露內容係關於包含 TGF β 超家族第 I 型受體多肽和 TGF β 超家族第 II 型受體多肽的異多聚體、其用途、和製造如此異多聚體的方法。參見，例如圖 6。於某些較佳的實施方式中，異多聚體包含 TGF β 超家族第 I 型受體多肽之胞外域和 TGF β 超家族第 II 型受體多肽之胞外域。尤其，本文之揭露內容提供包含 ALK4 多肽和 ActRIIB 多肽的異多聚體。較佳地，如此 ALK4 多肽包含 ALK4 受體之配體結合域且如此 ActRIIB 多肽包含 ActRIIB 受體之配體結合域。於某些較佳的實施方式中，本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體相較於相對應的同多聚體樣本 (例如 ALK4:ActRIIB 異二聚體相較於 ActRIIB:ActRIIB 同二聚體或 ALK4:ALK4 同二聚體)具有經改變的 TGF β 超家族配體結合輪廓／專一性。

【0064】 TGF- β 超家族包含超過 30 種被分泌的因子，包括 TGF- β 、活化素、nodal、骨成形性蛋白質 (BMP)、生長和分化因子 (GDF)、和抗密拉氏管激素 (AMH) (Weiss 等人(2013) *Developmental Biology*, 2(1): 47-63)。此超家族之成員（其等於脊椎動物和無脊椎動物中皆找到）係於種種的組織中到處表現且貫穿動物之終生於發育之早期階段期間起作用。確實，TGF- β 超家族蛋白質係幹細胞自我更新、原腸胚形成、分化、器官形態發生、和成人組織恒定之關鍵介質。與此遍在活性一致，偏離的 TGF- β 超家族傳訊與廣大範圍的人類病理（包括（例如）自體免疫疾病、心血管疾病、纖維變性疾病、和癌症）有關連。

【0065】 TGF- β 超家族之配體共有相同的二聚結構，其中一個單體之中心 3-1/2 圈螺旋塞在由另一單體之 β 股形成的凹表面上。TGF- β 超家族成員之大部分被分子間二硫鍵進一步穩定化。此二硫鍵橫越由二個其他的二硫鍵形成的環，產生已被命名為「半胱胺酸結」模體者 (Lin 等人(2006) *Reproduction* 132: 179-190；和 Hinck 等人(2012) *FEBS Letters* 586: 1860-1870)。

【0066】 TGF- β 超家族傳訊係由第 I 型和第 II 型絲胺酸／蘇胺酸激酶受體之異多聚性複合物介導，其等於配體刺激後磷酸化並活化下游 SMAD 蛋白質（例如 SMAD 蛋白質 1、2、3、5、和 8）(Massagué (2000) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:169-178)。此等第 I 型和第 II 型受體係跨膜蛋白質，其等由以下者構成：具有富半胱胺酸區域的配體結合性胞外域、跨膜域、和具有所預期的絲胺酸／蘇胺酸激酶專一性的細胞質域。一般而言，第 I 型受體介導細胞內的傳訊而第 II 型受體對於結合 TGF- β 超家族配體而言

係所需的。第 I 型和 II 受體於配體結合後形成穩定的複合物，導致第 I 型受體被第 II 型受體之磷酸化。

【0067】 TGF- β 家族可基於其等所結合的第 I 型受體和其等所活化的 Smad 蛋白質分成二個譜系學分支。一者係更新近演化出的分支，其包括（例如）TGF- β 、活化素、GDF8、GDF9、GDF11、BMP3 和 nodal，其等透過活化 Smads 2 和 3 的第 I 型受體傳訊（Hinck (2012) FEBS Letters 586:1860-1870）。另一個分支包含此超家族之關連性較遙遠的蛋白質且包括（例如）BMP2、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF1、GDF5、GDF6、和 GDF7，其等透過 Smad 1、5、和 8 發訊。

【0068】 活化素係 TGF- β 超家族之成員且最初被發現係促濾泡素之分泌之調節子，但隨後其種種的生殖和非生殖角色之特徵已被界定。存在有三種主要的活化素形式（A、B、和 AB），其等係兩種密切相關的 β 子單元之同／異二聚體（分別係 $\beta_A\beta_A$ 、 $\beta_B\beta_B$ 、和 $\beta_A\beta_B$ ）。人類基因組亦編碼活化素 C 和活化素 E（其等主要係於肝臟中表現）且含有 β_C 或 β_E 的異二聚體形式亦係已知的。於 TGF- β 超家族中，活化素係獨特且多功能的因子，其可於卵巢和胎盤的細胞中刺激激素生產、支持神經元細胞生存、取決於細胞類型陰性或陽性地影響細胞週期進展、和誘發中胚層分化（至少於兩棲動物胚胎）（DePaolo 等人(1991) Proc Soc Exp Biol Med. 198:500-512; Dyson 等人(1997) Curr Biol. 7:81-84；和 Woodruff (1998) Biochem Pharmacol. 55:953-963）。於數種組織中，活化素傳訊被其相關異二聚體抑制素拮抗。例如，於促濾泡素（FSH）自腦下垂體的分泌之調節，活化素促進 FSH 合

成和分泌，而抑制素降低 FSH 合成和分泌。其他可調節活化素生物活性及／或與活化素結合的蛋白質包括抑濾泡素 (FS)、與抑濾泡素相關的蛋白質 (FSRP，亦以 FLRG 或 FSTL3 為人所知)、和 α_2 巨球蛋白。

【0069】 如於本文中描述的，與「活化素 A」結合的藥劑係與 β_A 子單元專一性結合的藥劑，無論是於經分離的 β_A 子單元之背景中或作為二聚複合物（例如 $\beta_A\beta_A$ 同二聚體或 $\beta_A\beta_B$ 異二聚體）。於異二聚體複合物（例如 $\beta_A\beta_B$ 異二聚體）之例子中，與「活化素 A」結合的藥劑對存在於 β_A 子單元內的表位有專一性，但不與存在於該複合物之非 β_A 子單元（例如該複合物之 β_B 子單元）內的表位結合。類似地，於本文中揭露的拮抗（抑制）「活化素 A」的藥劑係抑制一或多種由 β_A 子單元介導的活性的藥劑，無論是於經分離的 β_A 子單元之背景中或作為二聚複合物（例如 $\beta_A\beta_A$ 同二聚體或 $\beta_A\beta_B$ 異二聚體）。於 $\beta_A\beta_B$ 異二聚體之例子中，抑制「活化素 A」的藥劑係專一性地抑制一或多種 β_A 子單元之活性但不抑制該複合物之非 β_A 子單元（例如該複合物之 β_B 子單元）之活性的藥劑。此原則亦適用於與「活化素 B」、「活化素 C」、和「活化素 E」結合及／或抑制其等的藥劑。於本文中揭露的拮抗「活化素 AB」的藥劑係抑制一或多種由 β_A 子單元介導的活性和一或多種由 β_B 子單元介導的活性的藥劑。相同的原則亦適用於與「活化素 AC」、「活化素 BC」、「活化素 AE」、和「活化素 BE」結合及／或抑制其等的藥劑。

【0070】 BMP 和 GDF 一起形成共有 TGF- β 超家族之特徵折疊的半胱胺酸結細胞介素之家族 (Rider 等人(2010) Biochem J., 429(1):1-12)。此家族包括（例如）BMP2、BMP4、BMP6、BMP7、BMP2a、BMP3、BMP3b

(亦以 GDF10 為人所知)、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8、BMP8a、BMP8b、BMP9 (亦以 GDF2 為人所知)、BMP10、BMP11 (亦以 GDF11 為人所知)、BMP12 (亦以 GDF7 為人所知)、BMP13 (亦以 GDF6 為人所知)、BMP14 (亦以 GDF5 為人所知)、BMP15、GDF1、GDF3 (亦以 VGR2 為人所知)、GDF8 (亦以肌肉生長抑制素為人所知)、GDF9、GDF15、和 decapentaplegic。除了誘發骨骼形成的能力 (此賦予 BMP 其等之名字) 以外, BMP/GDF 於廣大範圍的組織之發育中顯示形態演發性活性。BMP/GDF 同和異二聚體與第 I 型和第 II 型受體二聚體之組合交互作用以產生多種可能的傳訊複合物, 導致 SMAD 轉錄因子之兩個競爭組之一之活化。BMP/GDF 具有高度專一性和局部的功能。此等係以一些方式 (包括 BMP/GDF 表現之發育限制) 和透過數種以高親和力與該細胞介素結合的特定 BMP 拮抗蛋白質之分泌來調節。奇異地, 一些此等拮抗劑類似於 TGF-β 其他超家族配體。

【0071】 生長和分化因子-8 (GDF8) 亦以肌肉生長抑制素為人所知。GDF8 係骨骼肌質量之負向調節子且於發育中的和成人的骨骼肌中高度表現。基因轉殖小鼠中的 GDF8 無效突變之特徵在於骨骼肌之明顯肥大和增生 (McPherron 等人 Nature (1997) 387:83-90)。類似的骨骼肌質量之增加於牛和 (顯著地) 人類中的 GDF8 之天然存在的突變係明顯的 (Ashmore 等人 (1974) Growth, 38:501-507; Swatland 和 Kieffer, J. Anim. Sci. (1994) 38:752-757; McPherron 和 Lee, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94:12457-12461; Kambadur 等人 Genome Res. (1997) 7:910-915; 和 Schuelke 等人 (2004) N Engl J Med, 350:2682-8)。研究亦已顯示在人類中與 HIV 感染

相關的肌肉消耗伴隨著 GDF8 蛋白質表現之增加 (Gonzalez-Cadavid 等人, PNAS (1998) 95:14938-43)。此外, GDF8 可調節肌肉專一性酵素 (例如肌酸激酶) 之生產並調節肌胚細胞增殖 (國際專利申請案公開編號 WO 00/43781)。GDF8 原胜肽可非共價地與成熟的 GDF8 域二聚體結合, 使其生物活性失活 (Miyazono 等人(1988) J. Biol. Chem., 263: 6407-6415; Wakefield 等人(1988) J. Biol. Chem., 263; 7646-7654; 和 Brown 等人(1990) Growth Factors, 3: 35-43)。其他與 GDF8 或結構上相關的蛋白質結合並抑制其等之生物活性的蛋白質包括抑濾泡素和 (潛在地) 與抑濾泡素相關的蛋白質 (Gamer 等人(1999) Dev. Biol., 208: 222-232)。

【0072】 GDF11 (亦以 BMP11 為人所知) 係於小鼠發育期間在尾芽、肢芽、上頷弧和下頷弧、和背根節表現的分泌性蛋白質 (McPherron 等人 (1999) Nat. Genet., 22: 260-264; 和 Nakashima 等人(1999) Mech. Dev., 80: 185-189)。GDF11 於塑形中胚層和神經組織中扮演獨特的角色 (Gamer 等人(1999) Dev Biol., 208:222-32)。已顯示 GDF11 在發育中的小雞之肢體係軟骨生成和肌肉生成之負向調節子 (Gamer 等人(2001) Dev Biol., 229:407-20)。GDF11 於肌肉之表現亦暗示其於調節肌肉生長與 GDF8 類似的角色。此外, GDF11 在腦中的表現暗示 GDF11 亦可具有與神經系統之功能有關的活性。有意思地, 已發現 GDF11 在嗅覺上皮抑制神經生成 (Wu 等人(2003) Neuron., 37:197-207)。因此, 抑制子 GDF11 於諸如肌肉疾病和神經退化性疾病 (例如肌肉萎縮性脊髓側索硬化症) 的疾病之治療可具有試管內和活體內應用。

【0073】 如於本文中描述的, 比較性結合數據顯示 ALK4:ActRIIB 異

二聚體相較於相對應的 ActRIIB 或 ALK4 同二聚體之任一者具有改變的結合輪廓（配體選擇性）。尤其，該 ALK4:ActRIIB 異二聚體相較於同二聚體之任一者顯示增強的與活化素 B 之結合，且保留強力的與活化素 A、GDF8、和 GDF11 之結合，如使用 ActRIIB 同二聚體觀察到的。然而，該 ALK4:ActRIIB 異二聚體相較於該 ActRIIB 同二聚體展現實質上降低的與 BMP9、BMP10、和 GDF3 之結合。尤其，對於該 ALK4:ActRIIB 異二聚體，BMP9 顯示低或無可觀察到的親和力，然而此配體與 ActRIIB 同二聚體強力地結合。

【0074】 此等結果因此顯示 ALK4:ActRIIB 異二聚體相較於 ActRIIB 同二聚體係活化素 A、活化素 B、GDF8、和 GDF11 之更具選擇性的拮抗劑。因此，ALK4:ActRIIB 異二聚體於某些如此選擇性的拮抗作用係有利的應用中相較於 ActRIIB 同二聚體會係更有用的。實例包括保留活化素（例如活化素 A、活化素 B、活化素 AC、活化素 AB）、GDF8、和 GDF11 之一或多者之拮抗作用但最小化 BMP9、BMP10、和 BMP6 之一或多者之拮抗作用係所欲的治療應用。

【0075】 此外，如於本文中描述的，ALK4:ActRIIB 異二聚體對骨骼肌和骨骼發揮有益的合成代謝功效以及對脂肪的組織發揮分解代謝功效，與 ActRIIB 同二聚體者非常類似。然而，不像 ActRIIB 同二聚體，ActRIIB:ALK4 異二聚體僅對 BMP9 和 BMP10 展現低親和力或僅與 BMP9 和 BMP10 暫時結合且因此會對由該等配體介導的程序（諸如血管生成）具有極小至無同時抑制。此新穎的選擇性於（例如）治療需要對（例如）肌肉和骨骼的刺激性的功效和對脂肪的抑制性的功效但不需要改變的血管生成的

患者會係有用的。

【0076】 在此說明書中使用的術語於本文之揭露內容之背景內和於其中各個術語被使用的特定前後文中一般具有其等於所屬技術領域中的普通意義。某些術語係於本說明書之以下或其他處討論以於描述本文之揭露內容之組成物和方法 and 如何製造和使用其等方面提供實施者另外的指引。一術語之任何使用之範圍或意義基於該術語於其中使用的前後文會係明顯的。

【0077】 術語「異聚體」或「異多聚體」係包含至少第一多肽鏈和第二多肽鏈的複合物，其中該第二多肽鏈於胺基酸序列方面與該第一多肽鏈差異達至少一個胺基酸殘基。該異聚體可包含由該第一和第二多肽鏈形成的「異二聚體」或可形成其中存在除了該第一和第二多肽鏈以外的一或多個多肽鏈的更高級的結構。異多聚體之例示性結構包括異二聚體、異三聚體、異四聚體和進一步的寡聚結構。異二聚體於本文中被命名為 X:Y 或相等地命名為 X-Y，其中 X 代表第一多肽鏈且 Y 代表第二多肽鏈。更高級的異聚體和寡聚結構於本文中係以相對應的方式命名。於某些實施方式中，異多聚體係重組的（例如一或多個多肽組份可係重組蛋白質）、經分離的及／或經純化的。

【0078】 「同源的」（以其所有的語法形式和拼法變化）係論及具有「共同演化來源」的二個蛋白質（包括來自相同的有機體物種之超家族的蛋白質、以及來自不同的有機體之物種的同源蛋白質）間的關係。如此蛋白質（和其等之編碼核酸）具有序列同源性，如由其等之序列類似性（無論是於百分比一致性方面或由特定殘基或模體和保守性位置之存在）所反

映的。然而，於一般使用中和於本申請案中，當以諸如「高度」的副詞修飾時，術語「同源的」可係論及序列類似性且可或可非係關於共同演化來源。

【0079】 術語「序列類似性」(以其所有的語法形式)係論及可或可不共有共同演化來源的核酸或胺基酸序列間的一致性或對應性之程度。

【0080】 相較於參考多肽(或核苷酸)序列的「百分比(%)序列一致性」被定義成於排比序列和導入空隙(若需要)以達成最大百分比序列一致性且不將任何保守性取代視為序列一致性之部分後，候選序列中與參考多肽(核苷酸)序列中的胺基酸殘基(或核酸)一致的胺基酸殘基(或核酸)之百分比。用於確定百分比胺基酸序列一致性之目的的排比可利用所屬技術領域中的技術(例如使用公眾可得的電腦軟體，諸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR) 軟體)內的種種方式達成。所屬技術領域中具有通常知識者可判定用於排比序列的適當參數，包括任何達成橫跨所比較的序列之全長的最大排比所需的演算法。然而，為了此等目的，%胺基酸(核酸)序列一致性值係使用序列比較電腦程式 ALIGN-2 產生。ALIGN-2 序列比較電腦程式係 Genentech, Inc.設計，且原始碼已隨使用者文件提交華盛頓 D.C., 20559 美國著作權局並以美國著作權註冊編號 TXU510087 註冊。ALIGN-2 程式係公眾可得自加州南舊金山 Genentech, Inc.，或可自原始碼編程。ALIGN-2 程式應於 UNIX 作業系統(包括數位 UNIX V4.0D)上編程以供使用。所有序列比較參數皆由 ALIGN-2 程式設定且不變化。

【0081】 「促效」(以其所有的語法形式)係論及活化蛋白質及／或

基因（例如藉由活化或擴大該蛋白質之基因表現或藉由誘發不活化型蛋白質進入活化態）或增加蛋白質及／或基因之活性的程序。

【0082】 「拮抗」（以其所有的語法形式）係論及抑制蛋白質及／或基因（例如藉由抑制或降低該蛋白質之基因表現或藉由誘發活性蛋白質進入不活化態）或降低蛋白質及／或基因之活性的程序。

【0083】 於本說明書和申請專利範圍通篇中連結數值使用的術語「約」和「大約」表示準確度之區間，其對於所屬技術領域中具有通常知識者而言係熟悉的且可接受的。一般而言，如此準確度之區間係 $\pm 10\%$ 。供選擇地，且特別係在生物系統中，術語「約」和「大約」可意謂於給定值之較佳 ≤ 5 倍且更佳 ≤ 2 -倍的數量級內的值。

【0084】 於本文中揭露的數字範圍包含限定該等範圍的數字。

【0085】 術語「一(a)」和「一(an)」包括複數指涉主題，除非該術語於其中使用的前後文清楚地指出相反者。術語「一(a)」(或「一(an)」)、以及術語「一或多」、和「至少一」於本文中係可互換地使用。此外，當於本文中使用时，「及／或」應被理解成具體揭示該二或多個具體指明的特徵或組份之各者加上或不加上其他者。因此，術語「及／或」於本文中如用於諸如「A 及／或 B」的語詞時係意欲包括「A 和 B」、「A 或 B」、「A」(單獨)、和「B」(單獨)。同樣地，術語「及／或」如用於諸如「A、B、及／或 C」的語詞時係意欲涵蓋以下方面之各者：A、B、和 C；A、B、或 C；A 或 C；A 或 B；B 或 C；A 和 C；A 和 B；B 和 C；A (單獨)；B (單獨)；和 C (單獨)。

2. ALK4:ActRIIB 異多聚體

【0086】 於某些方面，本文之揭露內容係關於異多聚體，其包含一或多個 ALK4 受體多肽（例如 SEQ ID NO: 9、10、19、20、42、44、47、48、74、和 76）和一或多個 ActRIIB 受體多肽（例如 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、39、41、45、46、70、72、78、和 80），其等於本文中一般被稱為「ALK4:ActRIIB 異多聚體複合物」或「ALK4:ActRIIB 異多聚體」。較佳地，本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體係可溶的，例如異多聚體可包含 ALK4 受體之可溶性部分（域）和 ActRIIB 受體之可溶性部分（域）。一般而言，ALK4 和 ActRIIB 之胞外域對應於此等受體之可溶性部分。因此，於一些實施方式中，本文之揭露內容之異多聚體包含 ALK4 受體之胞外域和 ActRIIB 受體之胞外域。實例胞外域 ALK4 和 ActRIIB 受體係於本文中揭露且如此序列（以及其等之片段、功能性變體、和經修飾形式）可根據本文之揭露內容之發明（例如 ALK4:ActRIIB 異多聚體組成物及其用途）使用。本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體包括（例如）異二聚體、異三聚體、異四聚體和更高級的寡聚結構。參見（例如）圖 6。於某些較佳的實施方式中，本文之揭露內容之異多聚體係 ALK4:ActRIIB 異二聚體。

【0087】 較佳地，本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體與一或多種 TGF-β 超家族配體結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體可與活化素（例如活化素 A、活化素 B、活化素 C、活化素 E、活化素 AC、活化素 AB、活化素 BC、活化素 AE、和活化素 BE）、GDF8、GDF11、BMP6、GDF3、和 BMP10 之一或多者結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與活化素 A 結合。於一些實施方式中，

ALK4:ActRIIB 異多聚體與活化素 B 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與活化素 C 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與活化素 E 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與活化素 AB 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與活化素 AC 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與活化素 AE 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與活化素 BC 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與活化素 BE 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與 GDF11 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與 GDF8 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與 BMP6 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與 GDF3 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體與 BMP10 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體不與（或不實質上與）BMP9 結合（例如由於 BMP9 和 ALK4:ActRIIB 異多聚體間的交互作用之暫時本質而具有不定 K_a 或 K_d ）。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體相較於對應的 ActRIIB 同多聚體以較強的親和力與活化素 B 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體相較於對應的 ActRIIB 同多聚體以較弱的親和力與 GDF3 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體相較於對應的 ActRIIB 同多聚體以較弱的親和力與 BMP9 結合。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體相較於對應的 ActRIIB 同多聚體以較弱的親和力與 BMP10 結合。視需要地，ALK4:ActRIIB 異多聚體可進一步與 BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP7、BMP8a、BMP8b、GDF5、

GDF6/BMP13、GDF7、GDF9b/BMP15、GDF15/MIC1、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、nodal、神經膠細胞衍生性神經營養因子（GDNF）、neurturin、artemin、persephin、MIS、和 Lefty 之一或多者結合。

【0088】 於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體可用於抑制(拮抗)由一或多種 TGF β 超家族配體介導的傳訊(例如 Smad 2/3 及/或 Smad 1/5/8 傳訊)。尤其，本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體於(例如)諸如該等於本文中描述的基於細胞的分析中可用於抑制通過一或多種 TGF β 超家族配體的細胞內傳訊。例如，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中可抑制由活化素(例如活化素 A、活化素 B、活化素 C、活化素 E、活化素 AC、活化素 AB、活化素 BC、活化素 AE、和活化素 BE)、GDF8、GDF11、BMP6、GDF3、和 BMP10 之一或多者介導的傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中可抑制活化素 A 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中可抑制活化素 B 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中可抑制活化素 C 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中可抑制活化素 D 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中可抑制活化素 E 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中可抑制活化素 AB 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中可抑制活化素 AC 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中可抑制活化素 BC 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中可抑制活化素 AE 傳訊。於一些實施方式中，

ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中可抑制活化素 BE 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中可抑制 GDF11 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中可抑制 GDF8 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中可抑制 BMP6 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中可抑制 GDF3 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中可抑制 BMP9 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中不抑制、或實質上不抑制 BMP9 傳訊。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中相較於對應的 ActRIIB 同多聚體係活化素 B 傳訊之較強的抑制劑。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中相較於對應的 ActRIIB 同多聚體係 BMP10 傳訊之較弱的抑制劑。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中相較於對應的 ActRIIB 同多聚體係 GDF3 傳訊之較強的抑制劑。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中相較於對應的 ActRIIB 同多聚體係 BMP9 傳訊之較強的抑制劑。視需要地，ALK4:ActRIIB 異多聚體於基於細胞的分析中可進一步抑制通過 BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP7、BMP8a、BMP8b、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF9b/BMP15、GDF15/MIC1、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、nodal、神經膠細胞衍生性神經營養因子 (GDNF)、neurturin、artemin、persephin、MIS、和 Lefty 之一或多者的細胞內傳訊。

【0089】 用於本文，術語「ActRIIB」係論及來自任何物種的第 IIB

型活化素受體 (ActRIIB) 蛋白質之家族和藉由誘變或其他修飾而源自如此 ActRIIB 蛋白質的變體。於本文中提及 ActRIIB 時應被理解成提及目前鑑認的形式之任一者。ActRIIB 家族之成員一般係跨膜蛋白質，其由包含富半胱胺酸區域的配體結合性胞外域、跨膜域、和具有預期的絲胺酸／蘇胺酸激酶活性的細胞質域構成。

【0090】 術語「ActRIIB 多肽」包括包含任何 ActRIIB 家族成員之天然存在的多肽以及任何保留有用的活性的其變體（包括突變體、片段、融合物、和擬肽物形式）的多肽。如此變體 ActRIIB 多肽之實例係於本文之揭露內容通篇中以及於國際專利申請案公開編號 WO 2006/012627、WO 2008/097541、和 WO 2010/151426（其等係以其等之完整內容以引用方式併入本文中）中提供。所有於本文中描述的與 ActRIIB 相關的多肽之胺基酸之編號係基於以下提供的人類 ActRIIB 前驅蛋白質序列 (SEQ ID NO: 1) 之編號，除非另加具體指明。

【0091】 人類 ActRIIB 前驅蛋白質序列係如以下：

```

1   MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER
    TNQSGLERCE

51   GEQDKRLHCY ASWRNSSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC
    VATEENPQVY

101  FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPP TAPTLLTVLA YSLLPIGGLS
151  LIVLLAFWMY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLLEIKARGR
201  FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA
251  EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLKGN IITWNELCHV AETMSRGLSY
    
```

301 LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK
 351 PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG
 LVLWELVSRC
 401 KAADGPVDEY MLPFEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKKMRPTI
 KDHWLKHPGL
 451 AQLCVTIEEC WDHDAEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV
 501 TNVDLPPKES SI (SEQ ID NO: 1)

【0092】 訊號胜肽係以單底線指出；胞外域係以**粗體**字指出；且潛在的內源性 N-連接的糖苷化位置係以雙底線指出。

【0093】 經加工胞外 ActRIIB 多肽序列係如以下：

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKG
 CWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAP
T (SEQ ID NO: 2)

【0094】 於一些實施方式中，該蛋白質可以於 N 端具有「SGR...」序列的形式製造。胞外域之 C 端「尾部」係以單底線指出。「尾部」經缺失的序列 (Δ15 序列) 係如以下：

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKG
 CWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (SEQ ID NO: 3)

【0095】 一種具有位於 SEQ ID NO: 1 之位置 64 的丙胺酸 (A64) 的 ActRIIB 之形式亦已於文獻中報導 參見 (例如) Hilden 等人(1994) Blood, 83(8): 2163-2170。申請人已確定包含具有該 A64 取代的 ActRIIB 之胞外域的 ActRIIB-Fc 融合蛋白質對於活化素和 GDF11 具有相對低的親和力。相較之下，具有位於位置 64 的精胺酸 (R64) 的相同 ActRIIB-Fc 融合蛋白質對

於活化素和 GDF11 具有低毫微莫耳濃度至高微微莫耳濃度範圍的親和力。因此，在本文之揭露內容中使用具有 R64 的序列作為人類 ActRIIB 之「野生型」參考序列。

【0096】 具有位於位置 64 的丙胺酸的 ActRIIB 之形式係如以下：

1 MTAPWVALAL LWGSLCAGSG RGEAETRECI YYNANWELER
TNQSGLERCE

51 **GEQDKRLHCY ASWANSSGTI ELVKKGCWLD DFNCYDRQEC**
VATEENPQVY

101 **FCCCEGNFCN ERFTHLPEAG GPEVTYEPPP TAPTLLTVLA YSLLPIGGLS**
151 **LIVLLAFWMY RHRKPPYGHV DIHEDPGPPP PSPLVGLKPL QLLEIKARGR**
201 **FGCVWKAQLM NDFVAVKIFP LQDKQSWQSE REIFSTPGMK HENLLQFIAA**
251 **EKRGSNLEVE LWLITAFHDK GSLTDYLGKN IITWNECHV AETMSRGLSY**
301 **LHEDVPWCRG EGHKPSIAHR DFKSKNVLLK SDLTAVLADF GLAVRFEPGK**
351 **PPGDTHGQVG TRRYMAPEVL EGAINFQRDA FLRIDMYAMG**
LVLWELVSR

401 **KAADGPVDEY MLPFEEEIGQ HPSLEELQEV VVHKKMRPTI**
KDHWLKHPL

451 **AQLCVTIEEC WDHDAAEARLS AGCVEERVSL IRRSVNGTTS DCLVSLVTSV**
501 **TNVDLPPKES SI (SEQ ID NO: 4)**

【0097】 訊號胜肽係以單底線指出且胞外域係以**粗體**字指出。

【0098】 供選擇的 A64 形式之經加工胞外 ActRIIB 多肽序列係如下：

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKG

CWLDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAP

T (SEQ ID NO: 5)

【0099】 於一些實施方式中，該蛋白質可以於 N 端具有「SGR...」序列的形式製造。胞外域之 C 端「尾部」係以單底線指出。「尾部」經缺失的序列 (Δ15 序列) 係如以下：

GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKG

CWLDDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA (SEQ ID NO: 6)

【0100】 編碼人類 ActRIIB 前驅蛋白質的核酸序列係於以下顯示 (SEQ ID NO: 7) (其代表 Genbank 參考序列 NM_001106.3 之核苷酸 25-1560，其編碼 ActRIIB 前驅物之胺基酸 1-513)。所顯示的序列提供位於位置 64 的精胺酸且可被修飾以提供替代的丙胺酸。其訊號序列被加底線。

1 ATGACGGCGC CCTGGGTGGC CCTCGCCCTC CTCTGGGGAT
CGCTGTGCGC

51 CGGCTCTGGG CGTGGGGAGG CTGAGACACG GGAGTGCATC
TACTACAACG

101 CCAACTGGGA GCTGGAGCGC ACCAACCAGA GCGGCCTGGA
GCGCTGCGAA

151 GGCGAGCAGG ACAAGCGGCT GCACTGCTAC GCCTCCTGGC
GCAACAGCTC

201 TGGCACCATC GAGCTCGTGAAGAAGGGCTG CTGGCTAGAT
GACTTCAACT

251 GCTACGATAG GCAGGAGTGT GTGGCCACTG AGGAGAACCC
CCAGGTGTAC

301 TTCTGCTGCT GTGAAGGCAA CTTCTGCAAC GAACGCTTCA
CTCATTTGCC

351 AGAGGCTGGG GGCCCGGAAG TCACGTACGA GCCACCCCCG
ACAGCCCCCA

401 CCCTGCTCAC GGTGCTGGCC TACTCACTGC TGCCCATCGG
GGGCCTTTCC

451 CTCATCGTCC TGCTGGCCTT TTGGATGTAC CGGCATCGCA
AGCCCCCCTA

501 CGGTCATGTG GACATCCATG AGGACCCTGG GCCTCCACCA
CCATCCCCTC

551 TGGTGGGCCT GAAGCCACTG CAGCTGCTGG AGATCAAGGC
TCGGGGGCGC

601 TTTGGCTGTG TCTGGAAGGC CCAGCTCATG AATGACTTTG
TAGCTGTCAA

651 GATCTTCCCA CTCCAGGACA AGCAGTCGTG GCAGAGTGAA
CGGGAGATCT

701 TCAGCACACC TGGCATGAAG CACGAGAACC TGCTACAGTT
CATTGCTGCC

751 GAGAAGCGAG GCTCCAACCT CGAAGTAGAG CTGTGGCTCA
TCACGGCCTT

801 CCATGACAAG GGCTCCCTCA CGGATTACCT CAAGGGGAAC
ATCATCACAT

851 GGAACGAACT GTGTCATGTA GCAGAGACGA TGTCACGAGG
CCTCTCATAC

901 CTGCATGAGG ATGTGCCCTG GTGCCGTGGC GAGGGCCACA
 AGCCGTCTAT
 951 TGCCACAGG GACTTTAAAA GTAAGAATGT ATTGCTGAAG
 AGCGACCTCA
 1001 CAGCCGTGCT GGCTGACTTT GGCTTGGCTG TTCGATTGA
 GCCAGGGAAA
 1051 CCTCCAGGGG ACACCCACGG ACAGGTAGGC ACGAGACGGT
 ACATGGCTCC
 1101 TGAGGTGCTC GAGGGAGCCA TCAACTTCCA GAGAGATGCC TTCCTGCGCA
 1151 TTGACATGTA TGCCATGGGG TTGGTGCTGT GGGAGCTTGT GTCTCGCTGC
 1201 AAGGCTGCAG ACGGACCCGT GGATGAGTAC ATGCTGCCCT
 TTGAGGAAGA
 1251 GATTGGCCAG CACCCTTCGT TGGAGGAGCT GCAGGAGGTG
 GTGGTGCACA
 1301 AGAAGATGAG GCCCACCATT AAAGATCACT GGTGAAACA
 CCCGGGCCTG
 1351 GCCCAGCTTT GTGTGACCAT CGAGGAGTGC TGGGACCATG
 ATGCAGAGGC
 1401 TCGCTTGTCC GCGGGCTGTG TGGAGGAGCG GGTGTCCCTG
 ATTCGGAGGT
 1451 CGGTCAACGG CACTACCTCG GACTGTCTCG TTTCCCTGGT
 GACCTCTGTC
 1501 ACCAATGTGG ACCTGCCCCC TAAAGAGTCA AGCATC (SEQ ID NO: 7)

【0101】 編碼經加工胞外人類 ActRIIB 多肽的核酸序列係如下 (SEQ

ID NO: 8)。所顯示的序列提供位於位置 64 的精胺酸，且可被修飾以提供替代的丙胺酸。

```

1    GGGCGTGGGG AGGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA
ACGCCAACTG

51   GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC
GAAGGCGAGC

101  AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGCGCAACAG
CTCTGGCACC

151  ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA
ACTGCTACGA

201  TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG
TACTTCTGCT

251  GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAACGCT TCACTCATTT
GCCAGAGGCT

301  GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGCCC CCACC
(SEQ ID NO: 8)

```

【0102】 人類 ActRIIB 胞外域和人類 ActRIIA 胞外域之胺基酸序列之排比係於圖 1 中闡明。此排比指出被認為直接接觸 ActRII 配體的在兩種受體內的胺基酸殘基。例如，綜合 ActRII 結構指出 ActRIIB-配體結合口袋係（部分地）由殘基 Y31、N33、N35、L38 至 T41、E47、E50、Q53 至 K55、L57、H58、Y60、S62、K74、W78 至 N83、Y85、R87、A92、和 E94 至 F101 限定。於此等位置，預期到保守性突變會被容忍。

【0103】 此外，ActRIIB 在脊椎動物間保守性良好，其胞外域之大型

伸展係完全保守性的。例如，圖 2 描繪人類 ActRIIB 胞外域相較於種種的 ActRIIB 異種同源物的多重序列排比。與 ActRIIB 結合的配體之許多者亦係高度保守性的。因此，基於此等排比，有可能預測其配體結合域內對於正常 ActRIIB-配體結合活性為重要的關鍵胺基酸位置以及預測其取代可能被容許的而無顯著地改變正常 ActRIIB-配體結合活性的胺基酸位置。因此，根據本文所揭露的方法係有用的活性人類 ActRIIB 變體多肽可包括一或多個位於來自另一種脊椎動物 ActRIIB 之序列的相對應位置的胺基酸，或可包括與在人類或其他脊椎動物序列中者類似的殘基。無意受限，以下實例闡明此方法以界定活性 ActRIIB 變體。人類胞外域 (SEQ ID NO: 53) 中的 L46 於爪蟾 ActRIIB (SEQ ID NO: 55) 中係纈胺酸、且因此此位置可被改變，且視需要地可被改變成另一種疏水性殘基，諸如 V、I 或 F、或非極性殘基，諸如 A。人類胞外域中的 E52 於爪蟾中係 K，而此指出此位置可容許各種各樣的改變，包括極性殘基，諸如 E、D、K、R、H、S、T、P、G、Y 且可能為 A。人類胞外域中的 T93 於爪蟾中係 K，而此指出於此位置可容忍廣泛的結構上的變化，且較佳係極性殘基，諸如 S、K、R、E、D、H、G、P、G 和 Y。人類胞外域中的 F108 於爪蟾中係 Y，且因此應容忍 Y 或其他疏水性基團，諸如 I、V 或 L。人類胞外域中的 E111 於爪蟾中係 K，而此指出於此位置會容忍帶電的殘基，包括 D、R、K 和 H、以及 Q 和 N。人類胞外域中的 R112 於爪蟾中係 K，而此指出於此位置容忍鹼性殘基，包括 R 和 H。人類胞外域中位於位置 119 的 A 保守性相對差，且於齧齒動物顯出為 P 且於爪蟾中顯出為 V，因此於此位置應容忍基本上任何胺基酸。

【0104】 此外，ActRII 蛋白質之結構和功能特徵已於所屬技術領域中

界定（特別是於配體結合方面）（Attisano 等人(1992) Cell 68(1):97-108；Greenwald 等人(1999) Nature Structural Biology 6(1): 18-22；Allendorph 等人(2006) PNAS 103(20: 7643-7648；Thompson 等人(2003) The EMBO Journal 22(7): 1555-1566；以及美國專利編號 7,709,605、7,612,041、和 7,842,663）。除了於本文中的教示之外，此等參考文獻對於如何產生保留一或多種正常活性（例如配體結合活性）的 ActRIIB 變體提供了充足的指引。

【0105】 例如，以三指毒素折疊為人所知的限定性結構模體對於藉由第 I 型和第 II 型受體的配體結合而言係重要的且係由位於各個單體受體之胞外域內的不同位置的保守性半胱胺酸殘基形成(Greenwald 等人(1999) Nat Struct Biol 6:18-22；和 Hinck (2012) FEBS Lett 586:1860-1870)。因此，人類 ActRIIB 之核心配體結合域（如由此等保守性半胱胺酸之最外面者限定的）對應於 SEQ ID NO: 1 之位置 29-109（ActRIIB 前驅物）。因此，圍繞此等半胱胺酸所限定的核心序列之兩側的結構上較無序的胺基酸可於 N 端截短約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、或 28 個殘基及／或於 C 端截短約 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 個殘基而不必然改變配體結合。N 端及／或 C 端截短之例示性 ActRIIB 胞外域包括 SEQ ID NO: 2、3、5、和 6。

【0106】 Attisano 等人顯示於 ActRIIB 之胞外域之 C 端的脯胺酸結之缺失降低該受體對於活化素的親和力。含有此 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 20-119 的 ActRIIB-Fc 融合蛋白質（「ActRIIB(20-119)-Fc」）相較於 ActRIIB(20-134)-Fc（其包括脯胺酸結區域和完整的近膜域）具有降低的與

GDF11 和活化素之結合（參見（例如）美國專利編號 7,842,663）。然而，ActRIIB(20-129)-Fc 蛋白質相較於野生型保留類似但稍微降低的活性，儘管其脯胺酸結區域被瓦解。

【0107】 因此，預期於胺基酸 134、133、132、131、130 和 129（關於 SEQ ID NO: 1）終止的 ActRIIB 胞外域皆會係有活性的，但於 134 或 133 終止的構築體可最有活性。類似地，不預期位於殘基 129-134（關於 SEQ ID NO: 1）之任一者的突變會大大地改變配體結合親和力。支持此，所屬技術領域中已知 P129 和 P130（關於 SEQ ID NO: 1）之突變不會實質上降低配體結合。因此，本文之揭露內容之 ActRIIB 多肽可早至於胺基酸 109（最終半胱胺酸）終止，然而預期於 109 和 119 或於其等之間（例如 109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、或 119）終止的形式會具有降低的配體結合。胺基酸 119（關於本 SEQ ID NO:1）保守性差且因此可被輕易地改變或截短。於 128（關於 SEQ ID NO: 1）或更後面者終止的 ActRIIB 多肽應保留配體結合活性。於 119 和 127 或其等之間（例如 119、120、121、122、123、124、125、126、或 127）（關於 SEQ ID NO: 1）終止的 ActRIIB 多肽會具有中等的結合能力。此等形式之任何者可係欲使用的，取決於臨床或實驗設置。

【0108】 於 ActRIIB 之 N 端，預期到於胺基酸 29 或之前（關於 SEQ ID NO: 1）起始的蛋白質會保留配體結合活性。胺基酸 29 代表開頭的半胱胺酸。於位置 24（關於 SEQ ID NO: 1）的丙胺酸至天門冬醯胺酸突變導入 N-連接的醣苷化序列而無實質上地影響配體結合（美國專利編號 7,842,663）。此確認位於訊號切割胜肽和半胱胺酸交互連接區域間的區域

(對應於胺基酸 20-29)的突變會被良好地容忍。尤其，於位置 20、21、22、23、和 24 (關於 SEQ ID NO: 1) 起始的 ActRIIB 多肽應保留一般的配體停留活性，且亦預期於位置 25、26、27、28、和 29 (關於 SEQ ID NO: 1) 起始的 ActRIIB 多肽保留配體停留活性。例如美國專利編號 7,842,663 已展示令人意外地，於 22、23、24、或 25 起始的 ActRIIB 構築體會具有最大的活性。

【0109】 一起，ActRIIB 之活性部分 (例如配體結合部分) 之一般公式包含 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 29-109。因此，ActRIIB 多肽可 (例如) 包含以下者、基本上由以下者所組成、或由以下者所組成：與於對應於 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 20-29 之任一者的殘基起始 (例如於胺基酸 20、21、22、23、24、25、26、27、28、或 29 之任一者起始) 並於對應於 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 109-134 之任一者的位置結束 (例如於胺基酸 109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、或 134 之任一者結束) 的 ActRIIB 之部分至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 一致的胺基酸序列。其他實例包括於 SEQ ID NO: 1 之 20-29 (例如位置 20、21、22、23、24、25、26、27、28、或 29 之任一者) 或 21-29 (例如位置 21、22、23、24、25、26、27、28、或 29 之任一者) 的位置起始並於 SEQ ID NO: 1 之 119-134 (例如位置 119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、或 134 之任一者)、119-133 (例如位置 119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、

或 133 之任一者)、129-134 (例如位置 129、130、131、132、133、或 134 之任一者)、或 129-133 (例如位置 129、130、131、132、或 133 之任一者) 的位置結束的多肽。其他實例包括於 SEQ ID NO: 1 之 20-24 (例如位置 20、21、22、23、或 24 之任一者)、21-24 (例如位置 21、22、23、或 24 之任一者)、或 22-25 (例如位置 22、22、23、或 25 之任一者) 的位置起始並於 SEQ ID NO: 1 之 109-134 (例如位置 109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、或 134 之任一者)、119-134 (例如位置 119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、或 134 之任一者) 或 129-134 (例如位置 129、130、131、132、133、或 134 之任一者) 的位置結束的構築體。亦設想到在此等範圍內的變體，特別是該等與 SEQ ID NO: 1 之對應部分具有至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致性者。

【0110】 於本文中描述的變異可以種種方式組合。於一些實施方式中，ActRIIB 變體於配體結合口袋包含不超過 1、2、5、6、7、8、9、10 或 15 個保守性胺基酸改變，且於配體結合口袋之位置 40、53、55、74、79 及／或 82 包含零、一、或更多個非保守性改變。位於結合口袋外的位置（於其中變異性可被特別好地容忍）包括胞外域之胺端和羧端（如於以上註記的）、和位置 42-46 和 65-73（關於 SEQ ID NO: 1）。於位置 65 的天門冬醯胺酸至丙胺酸改變（N65A）於 A64 背景下事實上改善配體結合，且因此預期其於 R64 背景下對於配體結合不會有有害功效（美國專利編號

7,842,663)。此改變於 A64 背景下可能消除於 N65 的醣苷化，因此展示於此區域的顯著改變可能可被容忍。雖然對於 R64A 改變的容忍性差，R64K 被良好地容忍，且因此於位置 64 可容忍另一鹼性殘基（諸如 H）（美國專利編號 7,842,663）。此外，所屬技術領域中描述的誘變計畫之結果指出於 ActRIIB 中存在有保守往往係有益的胺基酸位置。關於 SEQ ID NO: 1，此等包括位置 80（酸性或疏水性胺基酸）、位置 78（疏水性，且特別係色胺酸）、位置 37（酸性，且特別係天門冬胺酸或麩胺酸）、位置 56（鹼性胺基酸）、位置 60（疏水性胺基酸，特別係苯丙胺酸或酪胺酸）。因此，本文之揭露內容提供於 ActRIIB 多肽中可係保守的胺基酸之框架。其他保守性可係所欲的位置係如下：位置 52（酸性胺基酸）、位置 55（鹼性胺基酸）、位置 81（酸性）、98（極性或帶電的，特別係 E、D、R 或 K），所有皆係關於 SEQ ID NO: 1。

【0111】 於某些實施方式中，本文之揭露內容係關於包含至少一個 ActRIIB 多肽（包括其片段、功能性變體、和經修飾形式）的異多聚體。較佳地，供根據本文之揭露內容之發明使用的 ActRIIB 多肽係可溶的（例如 ActRIIB 之胞外域）。於其他較佳實施方式中，供根據本文之揭露內容使用的 ActRIIB 多肽與一或多種 TGF-β 超家族配體結合。因此，於一些實施方式中，供根據本文之揭露內容使用的 ActRIIB 多肽供抑制（拮抗）一或多種 TGF-β 超家族配體之活性（例如 Smad 傳訊之抑制）。於一些實施方式中，本文之揭露內容之異多聚體包含至少一個 ActRIIB 多肽，該 ActRIIB 多肽包含以下者、基本上由以下者所組成、或由以下者所組成：與於對應於 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 20-29 的殘基起始（例如於胺基酸 20、21、22、

23、24、25、26、27、28、或 29 之任一者起始) 並於對應於 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 109-134 的位置結束 (例如於胺基酸 109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、或 134 之任一者結束) 的 ActRIIB 之部分至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的胺基酸序列。於某些較佳的實施方式中，本文之揭露內容之異多聚體包含至少一個 ActRIIB 多肽，該 ActRIIB 多肽包含以下者、由以下者所組成、或基本上由以下者所組成：與 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 29-109 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的胺基酸序列。於其他較佳的實施方式中，本文之揭露內容之異多聚體複合物包含至少一個 ActRIIB 多肽，該 ActRIIB 多肽包含以下者、由以下者所組成、或基本上由以下者所組成：與 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 25-131 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的胺基酸序列。於一些實施方式中，本文之揭露內容之異多聚體包含至少一個 ActRIIB 多肽，該 ActRIIB 多肽係與 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、39、41、45、或 46 之任一者之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%、或 100%一致的。於某些較佳的實施方式中，本文之揭露內容之異多聚體包含不包含其中對應於 SEQ ID NO: 1 之 L79 的位置係酸性胺基酸 (即非天然存在的 D 或 E 胺基酸殘基或人工酸性胺基酸) 的 ActRIIB 多

肽。

【0112】 於某些方面，本文之揭露內容係關於包含 ALK4 多肽的蛋白質複合物。用於本文，術語「ALK4」係論及來自任何物種的類活化素受體激酶-4 蛋白質之家族和藉由誘變或其他修飾而源自如此 ALK4 蛋白質的變體。於本文中提及 ALK4 時應被理解成提及目前鑑認的形式之任一者。ALK4 家族之成員一般係跨膜蛋白質，其由具有富半胱氨酸區域的配體結合性胞外域、跨膜域、和具有預期的絲氨酸／蘇氨酸激酶活性的細胞質域構成。

【0113】 術語「ALK4 多肽」包括包含任何 ALK4 家族成員之天然存在的多肽以及任何保留有用的活性的其變體（包括突變體、片段、融合物、和擬肽物形式）的多肽。所有於本文中描述的與 ALK4 相關的多肽之胺基酸之編號係基於以下人類 ALK4 前驅蛋白質序列（SEQ ID NO: 9）之編號，除非另加具體指明。

【0114】 人類 ALK4 前驅蛋白質序列（NCBI Ref Seq NP_004293）係如以下：

1 MAESAGASSF FPLVVLLLAG SGGSGPRGVQ ALLCACTSCL QANYTCETDG
ACMVSIFNLD

61 **GMEHHVRTCI PKVELVPAGK PFYCLSEDL RNTHCCYTDY CNRIDLRVPS**
GHLKEPEHPS

121 **MWGPVELVGI IAGPVFLLFL IIIIVFLVIN YHQRVYHNRQ RLDMEDPSCE**
MCLSKDKTLQ

181 **DLVYDLSTSG SGSGPLFVQ RTVARTIVLQ EIIGKGRFGE VWRGRWRGGD**

VAVKIFSSRE

241 ERSWFREAEL YQTVMLRHEN ILGFIAADNK DNGTWTQLWL VSDYHEHGSL

FDYLNRYTVT

301 IEGMIKLALS AASGLAHLHM EIVGTQGKPG IAHRDLKSKN ILVKKNGMCA

IADLGLAVRH

361 DAVTDTIDIA PNQRVGTKRY MAPEVLDETI NMKHFDSFKC ADIYALGLVY

WEIARRCNSG

421 GVHEEYQLPY YDLVPSDPSI EEMRKVVCDQ KLRPNIPNWW QSYEALRVMG

KMMRECWYAN

481 GAARLTALRI KKTLSQLSVQ EDVKI (SEQ ID NO: 9)

【0115】 訊號胜肽係以單底線指出且胞外域係以**粗體**字指出。

【0116】 經加工胞外人類 ALK4 多肽序列係如以下：

SGPRGVQALLCACTSCLQANYTCETDGACMVSIFNLDGMEHHVRTCIPKVELVPAGK

PFYCLSSDLRNTHCCYTDYCNRIDLRVPSGHLKEPEHPSMWGPVE (SEQ ID NO:

10)

【0117】 編碼 ALK4 前驅蛋白質的核酸序列係於以下顯示 (SEQ ID NO: 11) (對應於 Genbank 參考序列 NM_004302.4 之核苷酸 78-1592)。訊號序列被加底線且胞外域係以**粗體**字指出。

ATGGCGGAGTCGGCCGGAGCCTCCTCCTTCTTCCCCCTTGTTGTCCTCCTGCTCGC
CGGCAGCGGGCGGGTCCGGGCCCCGGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTG
CACCAGCTGCCTCCAGGCCAACTACACGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATG
GTTTCCATTTTCAATCTGGATGGGATGGAGCACCATGTGCGCACCTGCATCCC
CAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGGGAAGCCCTTCTACTGCCTGAGCTCGGA

GGACCTGCGCAACACCCACTGCTGCTACACTGACTACTGCAACAGGATCGAC
TTGAGGGTGCCCAGTGGTCACCTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTCCATGTGG
GGCCCGGTGGAGCTGGTAGGCATCATCGCCGGCCCGGTGTTCTCCTGTTCTCA
TCATCATCATTGTTTTCTTGTCTAATACTATCATCAGCGTGTCTATCACAACCGCCA
GAGACTGGACATGGAAGATCCCTCATGTGAGATGTGTCTCTCAAAGACAAGACG
CTCCAGGATCTTGTCTACGATCTCTCCACCTCAGGGTCTGGCTCAGGGTTACCCCT
CTTTGTCCAGCGCACAGTGGCCCGAACCATCGTTTTACAAGAGATTATTGGCAAGG
GTCGGTTTGGGGAAGTATGGCGGGGCGCTGGAGGGGTGGTGATGTGGCTGTGAA
AATATTCTCTTCTCGTGAAGAACGGTCTTGGTTCAGGGAAGCAGAGATATAACCAGA
CGGTCATGCTGCGCCATGAAAACATCCTTGGATTTATTGCTGCTGACAATAAAGATA
ATGGCACCTGGACACAGCTGTGGCTTGTTTCTGACTATCATGAGCACGGGTCCCTG
TTTGATTATCTGAACCGGTACACAGTGACAATTGAGGGGATGATTAAGCTGGCCTT
GTCTGCTGCTAGTGGGCTGGCACACCTGCACATGGAGATCGTGGGCACCCAAGGG
AAGCCTGGAATTGCTCATCGAGACTTAAAGTCAAAGAACATTCTGGTGAAGAAAA
ATGGCATGTGTGCCATAGCAGACCTGGGCCTGGCTGTCCGTCATGATGCAGTCACT
GACACCATTGACATTGCCCCGAATCAGAGGGTGGGGACCAAACGATACATGGCCC
CTGAAGTACTTGATGAAACCATTAAATATGAAACACTTTGACTCCTTTAAATGTGCTG
ATATTTATGCCCTCGGGCTTGTATATTGGGAGATTGCTCGAAGATGCAATTCTGGAG
GAGTCCATGAAGAATATCAGCTGCCATATTACGACTTAGTGCCCTCTGACCCTTCCA
TTGAGGAAATGCGAAAGGTTGTATGTGATCAGAAGCTGCGTCCCAACATCCCCAA
CTGGTGGCAGAGTTATGAGGCACTGCGGGTGATGGGGAAGATGATGCGAGAGTGT
TGGTATGCCAACGGCGCAGCCCGCCTGACGGCCCTGCGCATCAAGAAGACCCTCT
CCCAGCTCAGCGTGCAGGAAGACGTGAAGATC (SEQ ID NO: 11)

【0118】 編碼胞外 ALK4 多肽的核酸序列係如以下：

TCCGGGCCCCGGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGCACCAGCTGCCTCCAGG
 CCAACTACACGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATGGTTTCCATTTTCAATCTGGAT
 GGGATGGAGCACCATGTGCGCACCTGCATCCCCAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCG
 GGAAGCCCTTCTACTGCCTGAGCTCGGAGGACCTGCGCAACACCCACTGCTGCTA
 CACTGACTACTGCAACAGGATCGACTTGAGGGTGCCCAGTGGTCACCTCAAGGAG
 CCTGAGCACCCGTCCATGTGGGGCCCCGGTGGAG (SEQ ID NO: 12)

【0119】 供選擇的人類 ALK4 前驅蛋白質序列之同功型 (同功型 C)
 (NCBI Ref Seq NP_064733.3) 係如以下：

1 MAESAGASSF FPLVLLLAG SGGSGPRGVQ ALLCACTSCL QANYTCETDG
ACMVSIFNLD

61 **GMEHHVRTCI PKVELVPAGK PFYCLSEDL RNTGCCYTDY CNRIDLRVPS**
GHLKEPEHPS

121 **MWGPVELVGI IAGPVFLLFL IIIVFLVIN YHQRVYHNRQ RLDMEDPSCE**
MCLSKDKTLQ

181 **DLVYDLSTSG SGSGPLPLFVQ RTVARTIVLQ EIIGKGRFGE VWRGRWRGGD**
VAVKIFSSRE

241 **ERSWFREAIE YQTVMLRHEN ILGFIAADNK ADCSFLTLPW EVVMVSAAPK**
LRSLRLQYKG

301 **GRGRARFLFP LNNGTWTQLW LVSDYHEHGS LFDYLNRYTV TIEGMIKLAL**
SAASGLAHLH

361 **MEIVGTQGKP GIAHRDLKSK NILVKKNGMC AIADLGLAVR HDAVTDITDI**
APNQRVGTKR

421 **YMAPEVLDET INMKHFDSFK CADIYALGLV YWEIARRCNS GGVHEEYQLP**
YYDLVPSDPS

481 IEEMRKVVCD QKLRPNIPNW WQSYEALRVM GKMMRECWYA NGAARLTALR
IKKTLSQLSV

541 QEDVKI (SEQ ID NO: 19)

【0120】 訊號胜肽係以單底線指出且胞外域係以**粗體**字指出。

【0121】 經加工胞外 ALK4 多肽序列 (同功型 C) 係如以下：

SGPRGVQALLCACTSCLQANYTCETDGACMVSIFNLDGMEHHVRTCIPKVELVPAGK
PFYCLSSDLRNTHCCYTDYCNRIDLRVPSGHLKEPEHPSMWGPVE (SEQ ID NO:
20)

【0122】 編碼 ALK4 前驅蛋白質 (同功型 C) 的核酸序列係於以下顯示 (SEQ ID NO: 21) (對應於 Genbank 參考序列 NM_020328.3 之核苷酸 78-1715)。訊號序列被加底線且胞外域係以**粗體**字指出。

ATGGCGGAGTCGGCCGGAGCCTCCTCCTTCTTCCCCCTTGTTGTCCTCCTGCTCGC
CGGCAGCGGCGGGTCCGGGGCCCCGGGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTG
CACCAGCTGCCTCCAGGCCAACTACACGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATG
GTTTCCATTTTCAATCTGGATGGGATGGAGCACCATGTGCGCACCTGCATCCC
CAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGGGAAGCCCTTCTACTGCCTGAGCTCGGA
GGACCTGCGCAACACCCACTGCTGCTACACTGACTACTGCAACAGGATCGAC
TTGAGGGTGCCCAGTGGTCACCTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTCCATGTGG
GGCCCGGTGGAGCTGGTAGGCATCATCGCCGGCCCGGTGTTCCCTCCTGTTCCCTCA
TCATCATCATTGTTTTCTTGTCATTAACATCATCAGCGTGTCTATCACAACCGCCA
GAGACTGGACATGGAAGATCCCTCATGTGAGATGTGTCTCTCCAAAGACAAGACG
CTCCAGGATCTTGTCTACGATCTCTCCACCTCAGGGTCTGGCTCAGGGTTACCCCT
CTTTGTCCAGCGCACAGTGGCCCCGAACCATCGTTTTACAAGAGATTATTGGCAAGG

GTCGGTTTGGGGAAGTATGGCGGGGCCGCTGGAGGGGTGGTGATGTGGCTGTGAA
 AATATTCTTCTCTCGTGAAGAACGGTCTTGGTTCAGGGAAGCAGAGATATAACCAGA
 CGGTCATGCTGCGCCATGAAAACATCCTTGGATTTATTGCTGCTGACAATAAAGCA
 GACTGCTCATTCTCACATTGCCATGGGAAGTTGTAATGGTCTCTGCTGCCCCCAA
 GCTGAGGAGCCTTAGACTCCAATACAAGGGAGGAAGGGGAAGAGCAAGATTTTAA
 TTCCCACTGAATAATGGCACCTGGACACAGCTGTGGCTTGTTTCTGACTATCATGA
 GCACGGGTCCCTGTTTGATTATCTGAACCGGTACACAGTGACAATTGAGGGGATGA
 TTAAGCTGGCCTTGTCTGCTGCTAGTGGGCTGGCACACCTGCACATGGAGATCGTG
 GGCACCCAAGGGAAGCCTGGAATTGCTCATCGAGACTTAAAGTCAAAGAACATTC
 TGGTGAAGAAAAATGGCATGTGTGCCATAGCAGACCTGGGCCTGGCTGTCCGTCA
 TGATGCAGTCACTGACACCATTGACATTGCCCCGAATCAGAGGGTGGGGACCAAA
 CGATACATGGCCCCTGAAGTACTTGATGAAACCATTAATATGAAACACTTTGACTCC
 TTAAATGTGCTGATATTTATGCCCTCGGGCTTGTATATTGGGAGATTGCTCGAAGAT
 GCAATTCTGGAGGAGTCCATGAAGAATATCAGCTGCCATATTACGACTTAGTGCCCT
 CTGACCCTTCCATTGAGGAAATGCGAAAGGTTGTATGTGATCAGAAGCTGCGTCCC
 AACATCCCCAACTGGTGGCAGAGTTATGAGGCACTGCGGGTGATGGGGAAGATGA
 TGCGAGAGTGTTGGTATGCCAACGGCGCAGCCCGCCTGACGGCCCTGCGCATCAA
 GAAGACCCTCTCCCAGCTCAGCGTGCAGGAAGACGTGAAGATC (SEQ ID NO: 21)

【0123】 編碼胞外 ALK4 多肽 (同功型 C) 的核酸序列係如以下：

TCCGGGCCCCGGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGCACCAGCTGCCTCCAGG
 CCAACTACACGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATGGTTTCCATTTCAATCTGGAT
 GGGATGGAGCACCATGTGCGCACCTGCATCCCCAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCG
 GGAAGCCCTTCTACTGCCTGAGCTCGGAGGACCTGCGCAACACCCACTGCTGCTA
 CACTGACTACTGCAACAGGATCGACTTGAGGGTGCCCAGTGGTCACCTCAAGGAG

CCTGAGCACCCGTCCATGTGGGGCCCGGTGGAG

(SEQ ID NO: 22)

【0124】 於某些實施方式中，本文之揭露內容係關於包含至少一個 ALK4 多肽（包括其片段、功能性變體、和經修飾形式）的異多聚體。較佳地，供根據本文之揭露內容之發明使用的 ALK4 多肽（例如包含 ALK4 多肽的異多聚體及其用途）係可溶的（例如 ALK4 之胞外域）。於其他較佳實施方式中，供根據本文之揭露內容之發明使用的 ALK4 多肽與一或多種 TGF-β 超家族配體結合及／或抑制（拮抗）其等之活性（例如 Smad 傳訊）。於一些實施方式中，本文之揭露內容之異多聚體包含至少一個與 SEQ ID NO: 9、10、19、20、42、44、47、48、74、和 76 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、或 99% 一致的 ALK4 多肽。於一些實施方式中，本文之揭露內容之異多聚體複合物由以下者所組成或基本上由以下者所組成：至少一個與 SEQ ID NO: 9、10、19、20、42、44、47、48、74、和 76 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、或 99% 一致的 ALK4 多肽。

【0125】 ALK4 在脊椎動物間保守性良好，其胞外域之大型伸展係完全保守性的。例如，圖 5 描繪人類 ALK4 胞外域相較於種種的 ALK4 異種同源物的多重序列排比。與 ALK4 結合的配體之許多者亦係高度保守性的。因此，基於此等排比，有可能預測其配體結合域內對於正常 ALK4-配體結合活性為重要的關鍵胺基酸位置以及預測其取代可能被容許的而無顯著地改變正常 ALK4-配體結合活性的胺基酸位置。因此，根據本文所揭露的方

法係有用的活性人類 ALK4 變體多肽可包括一或多個位於來自另一種脊椎動物 ALK4 之序列的對應位置的胺基酸，或可包括與在人類或其他脊椎動物序列中者類似的殘基。無意受限，以下實例闡明此方法以界定活性 ALK4 變體。人類 ALK4 胞外域 (SEQ ID NO: 59) 中的 V6 於小鼠 ALK4 (SEQ ID NO: 63) 中係異白胺酸，且因此該位置可被改變，且視需要地可被改變成另一種疏水性殘基，諸如 L、I、或 F、或非極性殘基，諸如 A，如於雞 ALK4 (SEQ ID NO: 62) 中觀察到的。人類胞外域中的 E40 於雞 ALK4 中係 K，而此指出此位置可容許廣泛種類的改變，包括極性殘基，諸如 E、D、K、R、H、S、T、P、G、Y，且可能為非極性殘基，諸如 A。人類胞外域中的 S15 於雞 ALK4 中係 D，而此指出此位置容忍廣泛的結構變異，而較佳係極性殘基，諸如 S、T、R、E、K、H、G、P、G 和 Y。人類胞外域中的 E40 於雞 ALK4 中係 K，而此指出此位置會容忍帶電的殘基，包括 D、R、K、H、以及 Q 和 N。人類胞外域中的 R80 於星鼻鼯鼠 ALK4 (SEQ ID NO: 60) 中係 K，而此指出此位置容忍鹼性殘基，包括 R、K、和 H。人類胞外域中的 Y77 於豬 ALK4 (SEQ ID NO: 64) 中係 F，而此指出此位置容忍芳香族殘基，包括 F、W、和 Y。人類胞外域中的 P93 保守性相對差，且於刺猬 ALK4 (SEQ ID NO: 61) 中顯出為 S 且於雞 ALK4 中顯出為 N，因此於此位置應容忍基本上任何胺基酸。

【0126】 此外，ALK4 蛋白質之結構和功能特徵已於所屬技術領域中界定（特別是於配體結合方面）（例如 Harrison 等人(2003) J Biol Chem 278(23):21129-21135；Romano 等人(2012) J Mol Model 18(8):3617-3625；和 Calvanese 等人(2009) 15(3):175-183）。除了於本文中的教示之外，此等參考

文獻對於如何產生保留一或多種正常活性（例如配體結合活性）的 ALK4 變體提供了充足的指引。

【0127】 例如，以三指毒素折疊為人所知的限定性結構模體對於藉由第 I 型和第 II 型受體的配體結合而言係重要的且係由位於各個單體受體之胞外域內的不同位置的保守性半胱胺酸殘基形成(Greenwald 等人(1999) Nat Struct Biol 6:18-22；和 Hinck (2012) FEBS Lett 586:1860-1870)。因此，人類 ALK4 之核心配體結合域（如由此等保守性半胱胺酸之最外面者限定的）對應於 SEQ ID NO: 9 之位置 34-101（ALK4 前驅物）。因此，圍繞此等半胱胺酸所限定的核心序列之兩側的結構上較無序的胺基酸可於 N 端截短約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10、個殘基或於 C 端截短 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、或 26 個殘基而不必然改變配體結合。N 端及／或 C 端截短之例示性 ALK4 胞外域包括 SEQ ID NO: 10 和 20。

【0128】 據此，ALK4 之活性部分（例如配體結合部分）之一般公式包含胺基酸 34-101。因此，ALK4 多肽可（例如）包含以下者、基本上由以下者所組成、或由以下者所組成：與於對應於 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 24-34 之任一者的殘基起始（例如於胺基酸 24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、或 34 之任一者起始）並於對應於 SEQ ID NO: 9 之任一胺基酸 101-126 的位置結束（例如於胺基酸 101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、或 126 之任一者結束的）的 ALK4 之部分至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、

95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的胺基酸序列。其他實例包括於 SEQ ID NO: 9 之位置 24-34 (例如位置 24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、或 34 之任一者)、25-34 (例如位置 25、26、27、28、29、30、31、32、33、或 34 之任一者)、或 26-34 (例如位置 26、27、28、29、30、31、32、33、或 34 之任一者) 起始並於 SEQ ID NO: 9 之位置 101-126 (例如位置 101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、或 126 之任一者)、102-126 (例如位置 102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、或 126 之任一者)、101-125 (例如位置 101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、或 125 之任一者)、101-124 (例如位置 101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、或 124 之任一者)、101-121 (例如位置 101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、或 121 之任一者)、111-126 (例如位置 111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、或 126 之任一者)、111-125 (例如位置 111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、或 125 之任一者)、111-124 (例如位置 111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、或 124 之任一者)、121-126 (例如位置 121、122、123、124、125、或 126 之任一者)、121-125 (例如

位置 121、122、123、124、或 125 之任一者)、121-124 (例如位置 121、122、123、或 124 之任一者)、或 124-126 (例如位置 124、125、或 126 之任一者) 結束的構築體。亦設想到在此等範圍內的變體，特別是該等與 SEQ ID NO: 9 之對應部分具有至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 一致性者。

【0129】 於本文中描述的變異可以種種方式組合。於一些實施方式中，ALK4 變體於配體結合口袋包含不超過 1、2、5、6、7、8、9、10 或 15 個保守性胺基酸改變。位於結合口袋外的位置（於其中變異性可被特別好地容忍）包括胞外域之胺端和羧端（如於以上註記的）

【0130】 於一些實施方式中，本文之揭露內容設想藉由修飾 ALK4 多肽及／或 ActRIIB 多肽之結構製作功能性變體。變體可藉由胺基酸取代、缺失、添加、或其等之組合製造。例如，預期以下者係合理的：分開的以異白胺酸或纈胺酸置換白胺酸、以麩胺酸置換天門冬胺酸、以絲胺酸置換蘇胺酸、或類似的以結構上相關的胺基酸置換一胺基酸（例如保守性突變）不會對所得分子之生物活性有較大的功效。保守性置換係該等於其等之側鏈相關的胺基酸之家族內發生者。本文之揭露內容之多肽之胺基酸序列中的改變是否導致功能性同源物可輕易地藉由評估該變體多肽以與野生型多肽類似的方式於細胞產生反應或與一或多種包括（例如）以下者的 TGF-β 其他超家族配體結合的能力來測定：BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF3、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF8、GDF9b/BMP15、GDF11/BMP11、

GDF15/MIC1、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、活化素 A、活化素 B、活化素 C、活化素 E、活化素 AB、活化素 AC、活化素 BC、活化素 AE、活化素 BE、nodal、神經膠細胞衍生性神經營養因子 (GDNF)、neurturin、artemin、persephin、MIS、和 Lefty。

【0131】 於一些實施方式中，本文之揭露內容設想藉由為了諸如增強治療效力或穩定性（例如增加保存期限及／或對蛋白水解性降解的抗性）的目的修飾 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽之結構來製作功能性變體。

【0132】 於一些實施方式中，本文之揭露內容設想 ALK4 多肽及／或 ActRIIB 多肽之改變該多肽之醣苷化的特殊突變。可選擇如此突變以導入或消除一或多個醣苷化位置，諸如 O-連接的或 N-連接的醣苷化位置。天門冬醯胺酸-連接的醣苷化辨識位置一般包含三胜肽序列天門冬醯胺酸-X-蘇胺酸或天門冬醯胺酸-X-絲胺酸（其中「X」係任何胺基酸），其被適當的細胞醣苷化酵素專一性辨識。該改變亦可藉由將一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基添加至該多肽之序列或以一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基取代該多肽之序列（對於 O-連接的醣苷化位置）來製作。各種各樣的於醣苷化辨識位置之第一或第三胺基酸位置之一或二者的胺基酸取代或缺失（及／或位於第二位置的胺基酸缺失）導致於該經修飾的三胜肽序列非醣苷化。另一種增加多肽上碳水化合物部分之數目的方法係藉由醣苷至該多肽的化學或酵索性偶聯。取決於所使用的偶聯模式，該（等）糖可被接附至(a)精胺酸和組胺酸；(b)自由羧基；(c)自由巰基，諸如該等半胱胺酸者；(d)自由經基，諸如該等絲胺酸、蘇胺酸、或經基脯胺酸者；(e)芳香族殘基，諸如該等苯丙胺酸、酪胺酸、或色胺酸者；或(f)麩醯胺酸之醯胺基。一或多個在多肽上

存在的碳水化合物部分之移除可係化學地及／或酵素性地實現。化學去醣苷化可涉及（例如）多肽至化合物三氟甲磺酸或同等化合物的暴露。此處理導致除了連接性糖（N-乙醯葡萄糖胺或 N-乙醯半乳糖）以外的大多數或所有糖之切割，而使胺基酸序列保持完整。多肽上的碳水化合物部分之酵素性切割可藉由使用各種各樣的內切和外切醣苷酶來達成，如由 Thotakura 等人（Meth. Enzymol. (1987) 138:350）描述的。可（酌情）調整多肽之序列，其取決於所使用的表現系統之類型，因為哺乳動物、酵母菌、昆蟲、和植物細胞皆可導入可被勝肽之胺基酸序列影響的不同醣苷化模式。一般而言，供在人類中使用的本文之揭露內容之異多聚性複合物可在提供適當的醣苷化的哺乳動物細胞株（諸如 HEK293 或 CHO 細胞株）中表現，雖然預期其他哺乳動物表現細胞株亦會有用。

【0133】 本文之揭露內容進一步設想產生突變體（特別是 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽之組合突變體以及截短突變體之組）的方法。組合突變體之池對於鑑認功能活性（例如 TGF-β 超家族配體結合）ALK4 及／或 ActRIIB 序列係特別有用的。篩選如此組合文庫的目的可係產生（例如）具有改變的特性（諸如改變的藥動學或改變配體結合）的多肽變體。各種各樣的篩選分析係於以下提供，且如此分析可用於評估變體。例如，可針對與一或多種 TGF-β 超家族配體結合以預防 TGF-β 超家族配體與 TGF-β 超家族受體之結合及／或以干擾由 TGF-β 超家族配體造成的傳訊的能力篩選 ALK4:ActRIIB 複合物變體。

【0134】 ALK4:ActRIIB 異多聚體之活性可（例如）於基於細胞的分析或活體內分析中測試。例如，可評估 ALK4:ActRIIB 異多聚體對於涉及肌

肉細胞之肌肉製造的基因之表現或蛋白質之活性的功效。此可（如需要）於一或多種 TGF-β 超家族配體之存在下執行，且可轉染細胞以製造 ALK4:ActRIIB 異多聚體與（視需要地）TGF-β 超家族配體。同樣地，可將 ALK4:ActRIIB 異多聚體投予至小鼠或其他動物，且可使用技術領域中認可的方法評估一或多個度量，諸如肌肉形成和力量。類似地，可（例如）藉由如於本文中描述的分析 and 該等屬於所屬技術領域中的通常知識者（例如）於成骨細胞、脂肪細胞、及／或神經元細胞中針對任何對此等細胞之生長的功效來測試 ALK4:ActRIIB 異多聚體（或其變體）之活性。可於如此細胞株中使用 SMAD 反應性報導基因以監視對下游傳訊的功效。

【0135】 可產生組合衍生性變體，其相較於參考 ALK4:ActRIIB 異多聚體具有增加的選擇性或一般增加的效力。當從重組 DNA 構築體表現時，可於基因療法方案中使用如此變體。同樣地，誘變可產生相較於相對應的未經修飾的 ALK4:ActRIIB 異多聚體具有顯著不同的細胞內半生期的變體。例如，可給予經改變的蛋白質對於蛋白水解性降解或其他導致破壞的細胞程序的較高的穩定性或較低的穩定性，或否則使未經修飾的多肽失活。可利用如此變體（和編碼其等的基因）以藉由調節該多肽之半生期來改變多肽複合物水平。例如，短半生期可導致更暫時性的生物功效，且當可誘發的表現系統之部分時，可允許細胞內重組多肽複合物水平之較緊的控制。於 Fc 融合蛋白質中，可於連接子（若有）及／或 Fc 部分作突變以改變一或多種 ALK4:ActRIIB 異多聚體之活性，包括（例如）免疫原性、半生期、和溶解性。

【0136】 組合文庫可以編碼各自包括潛在的 ALK4 及／或 ActRIIB

序列之至少一部分的多肽之文庫的基因之簡併文庫的方式產生。例如，可將合成性寡核苷酸之混合物酵素性地連接至基因序列以使得潛在的 ALK4 及／或 ActRIIB 編碼性核苷酸序列之簡併組可以個別的多肽之形式表現或（供選擇地）以一組大型融合蛋白質之形式表現（例如用於噬菌體展示）。

【0137】 存在有許多藉其可自簡併寡核苷酸序列產生潛在的同源物之文庫的方式。簡併基因序列之化學合成可在自動化 DNA 合成儀中實現，且可接著將合成的基因連接至適當的載體中以用於表現。簡併寡核苷酸之合成於所屬技術領域中係廣為人知的（Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39:3；Itakura 等人 (1981) *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. MacroMolecules*，編者 AG Walton，阿姆斯特丹: Elsevier pp273-289；Itakura 等人 (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323；Itakura 等人 (1984) *Science* 198:1056；和 Ike 等人 (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477)。已於其他蛋白質之定向演化中利用如此技術（Scott 等人，(1990) *Science* 249:386-390；Roberts 等人 (1992) *PNAS USA* 89:2429-2433；Devlin 等人 (1990) *Science* 249:404-406；Cwirla 等人，(1990) *PNAS USA* 87: 6378-6382；以及美國專利編號 5,223,409、5,198,346、和 5,096,815）。

【0138】 供選擇地，可利用誘變之其他形式以產生組合文庫。例如，可藉由以下者自文庫產生並分離 ALK4:ActRIIB 異多聚體：使用（例如）丙胺酸掃描誘變的掃描（Ruf 等人 (1994) *Biochemistry* 33:1565-1572；Wang 等人 (1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099；Balint 等人 (1993) *Gene* 137:109-118；Grodberg 等人 (1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601；Nagashima 等人 (1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892；Lowman 等人 (1991) *Biochemistry*

30:10832-10838；和 Cunningham 等人(1989) Science 244:1081-1085)、連接子掃描誘變 (Gustin 等人(1993) Virology 193:653-660；和 Brown 等人(1992) Mol. Cell Biol. 12:2644-2652；McKnight 等人(1982) Science 232:316)、飽和誘變 (Meyers 等人, (1986) Science 232:613)；PCR 誘變 (Leung 等人(1989) Method Cell Mol Biol 1:11-19)；或隨機誘變，包括化學誘變 (Miller 等人(1992) A Short Course in Bacterial Genetics, CSHL Press, 冷泉港, NY；和 Greener 等人(1994) Strategies in Mol Biol 7:32-34)。連接子掃描誘變 (特別是於組合設置) 係一種有吸引力的用於鑑認 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽之經截短 (生物活性) 形式的方法。

【0139】 所屬技術領域中已知廣大範圍的用於掃描由點突變和截短製作的組合文庫之基因產物和 (就此而言) 用於針對具有某種特性的基因產物掃描 cDNA 文庫的技術。如此技術一般會適用於由 ALK4:ActRIIB 異多聚體之組合誘變產生的基因文庫之快速掃描。最廣泛使用的用於掃描大型基因文庫的技術典型地包含將基因文庫選殖入可複製的表現載體中、以所得的載體之文庫轉形適當的細胞、並在其中所欲的活性之偵測促進編碼其產物被偵測的基因的載體之相對容易的分離的條件下表現組合基因。較佳的分析包括 TGF-β 超家族配體 (例如 BMP2、BMP2/7、BMP3、BMP4、BMP4/7、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP9、BMP10、GDF3、GDF5、GDF6/BMP13、GDF7、GDF8、GDF9b/BMP15、GDF11/BMP11、GDF15/MIC1、TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3、活化素 A、活化素 B、活化素 C、活化素 E、活化素 AB、活化素 AC、活化素 BC、活化素 AE、活化素 BE、nodal、神經膠細胞衍生性神經營養因子 (GDNF)、neurturin、artemin、

persephin、MIS、和 Lefty）結合分析及／或 TGF-β 配體介導性細胞傳訊分析。

【0140】 於某些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體可進一步包含除了任何於 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽中天然出現者以外的轉譯後修飾。如此修飾包括（但不限於）乙醯化、羧基化、糖苷化、磷酸化、脂質化、和醯化。因此，ALK4:ActRIIB 異多聚體可包含非胺基酸元件，諸如聚乙二醇、脂質、多醣或單醣、和磷酸。如此非胺基酸元件對異多聚體複合物之官能性的功效可如於本文中針對其他異多聚體變體描述地測試。當本文之揭露內容之多肽係在細胞中藉由切割該多肽之初生形式來製造時，轉譯後加工對於該蛋白質之正確折疊及／或功能亦可係重要的。不同的細胞（例如 CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3 或 HEK293）具有用於如此轉譯後活性的特殊細胞系統和特別機制且可選擇其等以確保 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽以及包含其等的異多聚體之正確修飾和加工。

【0141】 於某些較佳的實施方式中，於本文中描述的異多聚體包含與至少一個 ActRIIB 多肽（共價地或非共價地）聯結的至少一個 ALK4 多肽。較佳地，於本文中揭露的多肽形成異二聚體複合物，雖然亦包括更高級的異多聚體複合物，諸如（但不限於）異三聚體、異四聚體、和進一步的寡聚結構（參見（例如）圖 6）。於一些實施方式中，ALK4 及／或 ActRIIB 多肽包含至少一個多聚體化域。如於本文中揭露的，術語「多聚體化域」係論及促進在至少第一多肽和至少第二多肽間的共價或非共價交互作用的胺基酸或胺基酸之序列。於本文中揭露的多肽可與多聚體化域共價或非共價地連接。較佳地，多聚體化域促進在第一多肽（例如 ALK4 多肽）和第

二多肽（例如 ActRIIB 多肽）間的交互作用以促進異多聚體形成（例如異二聚體形成），且視需要地阻礙或否則不傾向同多聚體形成（例如同二聚體形成），藉此增加所欲的異多聚體之產量（參見（例如）圖 6）。

【0142】 可使用許多所屬技術領域中已知的方法以產生 ALK4:ActRIIB 異多聚體。例如，非天然存在的二硫鍵可藉由以下者來構築：以含自由巰基殘基（諸如半胱胺酸）置換第一多肽（例如 ALK4 多肽）上天然存在的胺基酸，以使得該自由巰基與在第二多肽（例如 ActRIIB 多肽）上的另一含自由巰基殘基交互作用以使得在該第一和第二多肽間形成二硫鍵。用以促進異多聚體形成的交互作用之其他實例包括（但不限於）離子交互作用，諸如在 Kjaergaard 等人，WO2007147901 中描述的；靜電引導功效，諸如在 Kannan 等人，U.S.8,592,562 中描述的；纏繞線圈交互作用，諸如在 Christensen 等人，U.S.20120302737 之描述的；白胺酸拉鍊，諸如在 Pack & Plueckthun,(1992) Biochemistry 31: 1579-1584 中描述的；和螺旋-轉折-螺旋模體，諸如在 Pack 等人，(1993) Bio/Technology 11: 1271-1277 中描述的。種種的節段之連接可通過（例如）共價結合（諸如藉由化學交聯、肽連接子、二硫橋、等等）或親和力交互作用（諸如藉由抗生物素蛋白-生物素或白胺酸拉鍊技術）獲得。

【0143】 於某些方面，多聚體化域可包含交互作用對之一個組份。於一些實施方式中，於本文中揭露的多肽可形成包含與第二多肽共價或非共價地聯結的第一多肽的蛋白質複合物，其中該第一多肽包含 ALK4 多肽之胺基酸序列和交互作用對之第一成員之胺基酸序列；且該第二多肽包含 ActRIIB 多肽之胺基酸序列和交互作用對之第二成員之胺基酸序列。該交互

作用對可係任何二個交互作用以形成複合物（特別是異二聚體複合物，雖然操作性實施方式亦可利用可形成同二聚體複合物的交互作用對）的多肽序列。該交互作用對之一個成員可與如於本文中描述的 ALK4 或 ActRIIB 多肽（包括（例如）包含以下者、基本上由以下者所組成、或由以下者所組成的多肽序列：與 SEQ ID NO: 2、3、5、6、10、和 20 之任一者之序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的胺基酸序列）融合。可選擇交互作用對以賦予改善的特性／活性，諸如增加的血清半生期，或以扮演另一部分與之接附以提供改善的特性／活性的接頭。例如，聚乙二醇部分可與交互作用對之一或二個組份接附以提供改善的特性／活性，諸如改善的血清半生期。

【0144】 該交互作用對之第一和第二成員可係非對稱的對，意謂該對之成員優先地彼此聯結而非自我聯結。因此，非對稱的交互作用對之第一和第二成員可聯結以形成異二聚體複合物（參見（例如）圖 6）。供選擇地，該交互作用對可係非導向，意謂該對之成員可彼此聯結或自我聯結而無實質上的偏好且因此可具有相同或不同的胺基酸序列。因此，非導向交互作用對之第一和第二成員可聯結以形成同二聚體複合物或異二聚體複合物。視需要地，該交互作用對（例如非對稱的對或非導向交互作用對）之第一成員與該交互作用對之第二成員共價地聯結。視需要地，該交互作用對之第一成員（例如非對稱的對或非導向交互作用對）與該交互作用對之第二成員非共價地聯結。

【0145】 作為特殊的實例，本文之揭露內容提供融合蛋白質，該融合

蛋白質包含與包含免疫球蛋白之恆定域（諸如免疫球蛋白之 CH1、CH2、或 CH3 域或 Fc 域）的多肽融合的 ALK4 或 ActRIIB。本文中提供源自人類 IgG1、IgG2、IgG3、和 IgG4 的 Fc 域。其他降低 CDC 或 ADCC 活性的突變係已知的，且一起，此等變體之任何者係包括在本文之揭露內容中且可被用作為本文之揭露內容之異多聚體複合物之有利的組份。視需要地，SEQ ID NO: 31 之 IgG1 Fc 域於諸如 Asp-265、Lys-322、和 Asn-434（根據相對應的全長 IgG1 編號）的殘基具有一或多個突變。於某些例子中，具有此等突變之一或多者（例如 Asp-265 突變）的突變的 Fc 域相較於野生型 Fc 域具有降低的與 Fcγ 受體結合之能力。於其他例子中，具有此等突變之一或多者（例如 Asn-434 突變）的突變的 Fc 域相較於野生型 Fc 域具有增加的與第 I 型 MHC 相關性 Fc 受體（FcRN）結合的能力。

【0146】 可用於人類 IgG1 之 Fc 部分（G1Fc）的天然胺基酸序列之實例係於以下顯示（SEQ ID NO: 31）。虛線底線指出鉸鏈區域，且實線底線指出具有天然存在的變體的位置。部分地，本文之揭露內容提供包含以下者、基本上由以下者所組成、或由以下者所組成的多肽：與 SEQ ID NO: 31 具有 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致性的胺基酸序列。G1Fc 中天然存在的變體可包括 E134D 和 M136L，根據 SEQ ID NO: 31 中使用的編號系統（參見 Uniprot P01857）。

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
VVDVSHEDPE

51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD

WLNGKEYKCK

101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ

VSLTCLVKGF

151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV

DKSRWQQGNV

201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 31)

【0147】 可用於人類 IgG2 之 Fc 部分 (G2Fc) 的天然胺基酸序列之實例係於以下顯示 (SEQ ID NO: 32)。虛線底線指出鉸鏈區域且雙底線指出序列中有資料庫矛盾的位置 (根據 UniProt P01859)。部分地，本文之揭露內容提供包含以下者、基本上由以下者所組成、或由以下者所組成的多肽：與 SEQ ID NO: 32 具有 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致性的胺基酸序列。

1 VECPCPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCV~~VV~~ DVSHEDPEVQ

51 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL

NGKEYKCKVS

101 NKGLPAPIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP

151 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPMLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS

201 CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK (SEQ ID NO: 32)

【0148】 可用於人類 IgG3 之 Fc 部分 (G3Fc) 的胺基酸序列之兩個實例係於以下顯示。鉸鏈區域於 G3Fc 中可係於其他 Fc 鏈中的至多達四倍長且含有三個完全相同的 15-殘基節段，其後為類似的 17-殘基節段。以下顯示的第一 G3Fc 序列 (SEQ ID NO: 33) 含有由單一 15-殘基節段所組成的

短鉸鏈區域，而第二 G3Fc 序列 (SEQ ID NO: 34) 含有全長鉸鏈區域。於各個例子中，虛線底線指出鉸鏈區域，且實線底線指出具有天然存在的變體的位置，根據 UniProt P01859。部分地，本文之揭露內容提供包含以下者、基本上由以下者所組成、或由以下者所組成的多肽：與 SEQ ID NO: 33 和 34 具有 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致性的胺基酸序列。

```

1  EPKSCDTPPPCPRCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
51  VSHEDPEVQF KWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTFRVVSV
LTVLHQDWLN
101 GKEYKCKVSN KALPAIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
151 TCLVKGFYPS DIAVEWESSG QPENNYNTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS
201 RWQQGNIFSC SVMHEALHNR FTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 33)

```

```

1  ELKTPLGDTT HTCPRCPEPK SCDTPPPCPR CPEPKSCDTP PPCPRCPEPK
51  SCDTPPPCPR CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH
101 EDPEVQFKWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TFRVVSVLTV
LHQDWLNGKE
151 YKCKVSNKAL PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL
201 VKGFYPSDIA VEWESSGQPE NNYNTTPPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ
251 QGNIFSCSVM HEALHNRFTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 34)

```

【0149】 當轉換成於 SEQ ID NO: 33 中使用的編號系統時，G3Fc 中天然存在的變體（例如參見 Uniprot P01860）包括 E68Q、P76L、E79Q、Y81F、D97N、N100D、T124A、S169N、S169del、F221Y，且本文之揭露

內容提供融合蛋白質，該融合蛋白質包含含有此等變異之一或多者的 G3Fc 域。此外，人類免疫球蛋白 IgG3 基因 (*IGHG3*) 顯示特徵在於不同的鉸鏈長度的結構多型性 (參見 Uniprot P01859)。特別地，變體 WIS 缺乏 V 區域之大部分和 CH1 區域之全部。其具有額外的於位置 7 的鏈間二硫鍵 (除了在鉸鏈中正常出現的於位置 11 者以外)。變體 ZUC 缺乏 V 區域之大部分、CH1 區域之全部、和鉸鏈之部分。變體 OMM 可代表對偶基因形式或另一伽馬鏈子類型。本文之揭露內容提供另外的融合蛋白質，該融合蛋白質包含含有此等變體之一或多者的 G3Fc 域

【0150】 可用於人類 IgG4 之 Fc 部分 (G4Fc) 的天然胺基酸序列之實例係於以下顯示 (SEQ ID NO: 35)。虛線底線指出鉸鏈區域。部分地，本文之揭露內容提供包含以下者、基本上由以下者所組成、或由以下者所組成的多肽：與 SEQ ID NO: 35 具有 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致性的胺基酸序列。

```

1  ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ
51  EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV
LHQDWLNGKE
101 YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL
151 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ
201 EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK      (SEQ ID NO: 35)

```

【0151】 本文中呈現 G1Fc 序列 (SEQ ID NO: 31) 之各種各樣在 Fc 域中的經工程改造突變，且 G2Fc、G3Fc、和 G4Fc 中的類似突變可自圖 3

中其等與 G1Fc 的排比衍生。由於不相等的鉸鏈長度，基於同型排比（圖 3）的類似的 Fc 位置於 SEQ ID NO: 31、32、33、34、和 35 中具有不同的胺基酸編號。以下者亦可被認知：當編號涵蓋整個 IgG1 重鏈恆定域（由 C_H1、鉸鏈、C_H2、和 C_H3 區域所組成）時（如於 Uniprot 資料庫），在由鉸鏈、C_H2、和 C_H3 區域所組成的免疫球蛋白序列（例如 SEQ ID NO: 31、32、33、34、和 35）中的給定胺基酸位置會由不同的編號（相較於相同位置）鑑認。例如，所選的人類 G1Fc 序列（SEQ ID NO: 31）中的 C_H3 位置、人類 IgG1 重鏈恆定域（Uniprot P01857）、和人類 IgG1 重鏈間的對應性係如下。

| 不同編號系統中 C _H 3 位置之對應性 | | |
|---|---|--|
| G1Fc （編號於鉸鏈區域中的第一個蘇胺酸起始） | IgG1 重鏈 恆定域 （編號於 C _H 1 起始） | IgG1 重鏈 （Kabat 等人,1991* 之 EU 編號方案） |
| Y127 | Y232 | Y349 |
| S132 | S237 | S354 |
| E134 | E239 | E356 |
| K138 | K243 | K360 |
| T144 | T249 | T366 |
| L146 | L251 | L368 |
| N162 | N267 | N384 |
| K170 | K275 | K392 |
| D177 | D282 | D399 |
| D179 | D284 | D401 |
| Y185 | Y290 | Y407 |
| K187 | K292 | K409 |
| H213 | H318 | H435 |
| K217 | K322 | K439 |
| * Kabat 等人(eds) 1991；Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版，Vol. 1 之 pp. 688-696, NIH，貝什斯達，MD。 | | |

【0152】 一個自單一細胞株大規模製造基於非對稱的免疫球蛋白的蛋白質時所生的問題係以「鏈聯結問題」為人所知。如於雙專一性抗體之製造中明顯面對的，鏈聯結問題關心自多重組合（其係當不同的重鏈及／或輕鏈係在單一細胞株中製造時天然導致的）間有效地製造所欲的多鏈蛋白質的挑戰（Klein 等人(2012) *mAbs* 4:653-663）。當在相同的細胞中製造兩種不同的重鏈和兩種不同的輕鏈時，此問題最為劇烈，於該例子中存在有總共 16 種可能的鏈組合（雖然此等之一些係完全相同的）而典型僅有一種係所欲的。無論如何，相同的原則說明了併入僅兩種不同的（非對稱的）重鏈的所欲多鏈融合蛋白質之降低的產量。

【0153】 所屬技術領域中已知種種在單一細胞株中增加含 Fc 融合多肽鏈之所欲配對以可接受的產量製造所欲的非對稱的融合蛋白質的方法（Klein 等人(2012) *mAbs* 4:653-663；和 Spiess 等人(2015) *Molecular Immunology* 67(2A): 95-106）。用於獲得所欲的含 Fc 鏈之配對的方法包括（但不限於）基於電荷的配對（靜電引導）、「球狀突起至洞穴中（knobs-into-holes）」立體配對、SEEDbody 配對、和基於白胺酸拉鍊的配對（Ridgway 等人(1996) *Protein Eng* 9:617-621；Merchant 等人(1998) *Nat Biotech* 16:677-681；Davis 等人(2010) *Protein Eng Des Sel* 23:195-202；Gunasekaran 等人(2010)；285:19637-19646；Wranik 等人(2012) *J Biol Chem* 287:43331-43339；US5932448；WO 1993/011162；WO 2009/089004、和 WO 2011/034605）。如於本文中描述的，此等方法可用於產生 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異多聚體複合物。參見圖 6。

【0154】 例如，一種特殊多肽間的交互作用可藉其被促進的方法係藉

由工程改造突出至孔洞中 (protuberance-into-cavity) (球狀突起至洞穴中) 互補區域, 諸如在 Arathoon 等人, U.S.7,183,076 和 Carter 等人, U.S.5,731,168 中描述的。「突出」係藉由以較大的胺基酸側鏈 (例如酪胺酸或色胺酸) 置換來自第一多肽之介面 (例如第一交互作用對) 的小型胺基酸側鏈來構築。藉由以較小的胺基酸側鏈 (例如丙胺酸或蘇胺酸) 置換大型胺基酸側鏈而視需要地在第二多肽之介面 (例如第二交互作用對) 上製造與該突出大小相同或類似的互補的「孔洞」。當該第一或第二多肽之一之介面上存在位置和大小適當的突出或孔洞時, 僅需要於相鄰的介面工程改造相對應的孔洞或突出 (分別的)。

【0155】 於中性 pH (7.0), 天門冬胺酸和麩胺酸係帶負電的且離胺酸、精胺酸、和組胺酸係帶正電的。可使用此等帶電的殘基以促進異二聚體形成並同時阻礙同二聚體形成。吸引力交互作用在相反的電荷間發生且排斥性交互作用在相同的電荷間發生。部分地, 於本文中揭露的蛋白質複合物藉由實現帶電的介面殘基之定點誘變來利用吸引力交互作用以促進異多聚體形成 (例如異二聚體形成) 且視需要地利用排斥性交互作用以阻礙同二聚體形成 (例如同二聚體形成)。

【0156】 例如, IgG1 CH3 域介面包含四個涉及域-域交互作用的獨特的帶電殘基對: Asp356-Lys439'、Glu357-Lys370'、Lys392-Asp399'、和 Asp399-Lys409' (於第二鏈的殘基編號係以(')指出)。應注意此處用以命名 IgG1 CH3 域中的殘基的編號方案符合 Kabat 之 EU 編號方案。由於在 CH3-CH3 域交互作用中存在的 2 重對稱, 各個獨特的交互作用於結構中會表示兩次 (例如 Asp-399-Lys409' 和 Lys409-Asp399')。於野生型序列中,

K409-D399’傾向異二聚體和同二聚體形成兩者。於第一鏈中變換電荷極性的單一突變（例如 K409E；帶正電變成帶負電）導致由於第一鏈同二聚體之形成的不利交互作用。該不利的交互作用係導因於在相同電荷（負電-負電；K409E-D399’和 D399-K409E’）間發生的排斥性交互作用。於第二鏈中變換電荷極性的類似突變（D399K’；負電變成正電）導致由於第二鏈同二聚體形成的不利交互作用（K409’-D399K’和 D399K-K409’）。但，同時，此二突變（K409E 和 D399K’）導致由於異二聚體形成的有利交互作用（K409E-D399K’和 D399-K409’）。

【0157】 對於異二聚體形成和同二聚體阻礙的靜電引導功效可進一步藉由可或可不與於第二鏈中帶相反電荷的殘基（包括（例如）Arg355 和 Lys360）配對的另外的帶電殘基之突變來增強。以下表格列出可（單獨或呈組合）用以增強 ALK4:ActRIIB 異多聚體形成的可能的電荷改變突變。

| 增強異二聚體形成的逐對帶電殘基突變之實例 | | | |
|----------------------|---------------|--------------|---------------|
| 於第一鏈中的位置 | 於第一鏈中的突變 | 於第二鏈中的交互作用位置 | 於第二鏈中的相對應突變 |
| Lys409 | Asp 或 Glu | Asp399’ | Lys、Arg、或 His |
| Lys392 | Asp 或 Glu | Asp399’ | Lys、Arg、或 His |
| Lys439 | Asp 或 Glu | Asp356’ | Lys、Arg、或 His |
| Lys370 | Asp 或 Glu | Glu357’ | Lys、Arg、或 His |
| Asp399 | Lys、Arg、或 His | Lys409’ | Asp 或 Glu |
| Asp399 | Lys、Arg、或 His | Lys392’ | Asp 或 Glu |
| Asp356 | Lys、Arg、或 His | Lys439’ | Asp 或 Glu |
| Glu357 | Lys、Arg、或 His | Lys370’ | Asp 或 Glu |

【0158】 於一些實施方式中，一或多個構成本申請案之融合蛋白質中

的 CH3-CH3 介面的殘基係以帶電的胺基酸置換以使得該交互作用變得靜電上不利的。例如，於該介面中的帶正電的胺基酸（例如離胺酸、精胺酸、或組胺酸）係以帶負電的胺基酸（例如天門冬胺酸或麩胺酸）置換。供選擇地，或與上述取代組合，於該介面中的帶負電的胺基酸係以帶正電的胺基酸置換。於某些實施方式中，該胺基酸係以具有所欲的電荷特性的非天然存在的胺基酸置換。應注意將帶負電的殘基（Asp 或 Glu）突變成 His 會導致側鏈體積增加，其可造成立體問題。此外，His 質子予體和受體形式取決於局部環境。於設計策略中應考慮此等問題。因為該等介面殘基在人類和小鼠 IgG 子類型中係高度保守性的，可將於本文中揭露的靜電引導功效應用於人類和小鼠 IgG1、IgG2、IgG3、和 IgG4。亦可延伸此策略以將於 CH3 域介面的不帶電殘基修飾成帶電殘基。

【0159】 部分地，本文之揭露內容使用經工程改以於電荷配對方面為互補的 Fc 序列（靜電引導）提供非對稱的含 Fc 多肽鏈之所欲的配對。可任意地使一對具有靜電互補性的 Fc 序列之一與該構築體之 ALK4 或 ActRIIB 多肽融合（使用或不使用視需要的連接子）以產生 ALK4:ActRIIB 異多聚體。可於所選細胞中共表現此單鏈以及與該第一 Fc 互補的 Fc 序列以利於產生所欲的多鏈構築體（例如 ALK4:ActRIIB 異多聚體）。於此基於靜電引導的實例中，SEQ ID NO: 23（人類 G1Fc(E134K/D177K)）和 SEQ ID NO: 24（人類 G1Fc(K170D/K187D)）係互補的 Fc 序列之實例（其中經工程改造的胺基酸取代被加雙底線）且該構築體之 TGF-β 超家族第 I 型或第 II 型受體多肽可與 SEQ ID NO: 23 或 SEQ ID NO: 24 之一（但非兩者）融合。考慮到天然 hG1Fc、天然 hG2Fc、天然 hG3Fc、和天然 hG4Fc 間高程度的

胺基酸序列一致性，可領會到位於 hG2Fc、hG3Fc、或 hG4Fc 中的相對應位置（參見圖 3）的胺基酸取代會產生互補的 Fc 對，其等可被使用以取代以下互補的 hG1Fc 對（SEQ ID NO: 23 和 24）。

1

THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV

VVDVSHEDPE

51

VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD

WLNGKEYKCK

101

VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSRKEMTKNQ

VSLTCLVKGF

151

YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLKSDG SFFLYSKLTV

DKSRWQQGNV

201

FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK

(SEQ ID NO: 23)

1

THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV

VVDVSHEDPE

51

VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD

WLNGKEYKCK

101

VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ

VSLTCLVKGF

151

YPSDIAVEWE SNGQPENNYD TTPPVLDSDG SFFLYSDLTV

DKSRWQQGNV

201

FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK

(SEQ ID NO: 24)

【0160】 部分地，本文之揭露內容使用經針對立體互補性工程改造的 Fc 序列提供非對稱的含 Fc 多肽鏈之所欲配對。部分地，本文之揭露內容提

供球狀突起至洞穴中配對作為立體互補性之實例。可任意地使一對具有立體互補性的 Fc 序列之一與該構築體之 ALK4 或 ActRIIB 多肽融合（使用或不使用視需要的連接子）以產生 ALK4:ActRIIB 異多聚體。可於所選細胞中共表現此單鏈以及與該第一 Fc 互補的 Fc 序列以利於生產所欲的多鏈構築體。於此基於球狀突起至洞穴中配對的實例中，SEQ ID NO: 25（人類 G1Fc(T144Y)）和 SEQ ID NO: 26（人類 G1Fc(Y185T)）係互補的 Fc 序列之實例（其中經工程改造的胺基酸取代被加雙底線）且該構築體之 ALK4 或 ActRIIB 多肽可與 SEQ ID NO: 25 或 SEQ ID NO: 26 之一（但非兩者）融合。考慮到天然 hG1Fc、天然 hG2Fc、天然 hG3Fc、和天然 hG4Fc 間高程度的胺基酸序列一致性，可領會到位於 hG2Fc、hG3Fc、或 hG4Fc 中的相對應位置（參見圖 3）的胺基酸取代會產生互補的 Fc 對，其等可被使用以取代以下互補的 hG1Fc 對（SEQ ID NO: 25 和 26）。

```
1   THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
VVDVSHEDPE

51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
WLNGKEYKCK

101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ
VSLYCLVKGF

151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV
DKSRWQQGNV

201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK           (SEQ ID NO: 25)

1   THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
VVDVSHEDPE
```

51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
WLNGKEYKCK

101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ
VSLTCLVKGF

151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLTSKLTV
DKSRWQQGNV

201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 26)

【0161】 與經工程改造的二硫鍵組合的基於球狀突起至洞穴中配對的 Fc 互補性之實例係於 SEQ ID NO: 27(hG1Fc(S132C/T144W))和 SEQ ID NO: 28 (hG1Fc(Y127C/T144S/L146A/Y185V)) 揭露。於此等序列中經工程改造的胺基酸取代被加雙底線，且該構築體之 TGF-β 超家族第 I 型或第 II 型多肽可與 SEQ ID NO: 27 或 SEQ ID NO: 28 之一（但非兩者）融合。考慮到天然 hG1Fc、天然 hG2Fc、天然 hG3Fc、和天然 hG4Fc 間高程度的胺基酸序列一致性，可領會到位於 hG2Fc、hG3Fc、或 hG4Fc 中的相對應位置（參見圖 3）的胺基酸取代會產生互補的 Fc 對，其等可被使用以取代以下互補的 hG1Fc 對（SEQ ID NO: 27 和 28）。

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
VVDVSHEDPE

51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
WLNGKEYKCK

101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PCREEMTKNQ
VSLWCLVKGF

151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV

DKSRWQQGNV

201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 27)

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV

VVDVSHEDPE

51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD

WLNGKEYKCK

101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVCTLP PSREEMTKNQ

VSLSCAVKGF

151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV

DKSRWQQGNV

201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 28)

【0162】 部分地，本文之揭露內容使用經工程改造以產生人類 IgG 和 IgA CH₃ 域之交錯 β 股節段的 Fc 序列提供非對稱的含 Fc 多肽鏈之所欲的配對。如此方法包括使用經股交換工程改造域(strand-exchange engineered domain, SEED) C_H3 異二聚體，其允許 SEEDbody 融合蛋白質之形成(Davis 等人(2010) Protein Eng Design Sel 23:195-202)。可任意地使一對具有 SEEDbody 互補性的 Fc 序列之一與該構築體之 ALK4 或 ActRIIB 融合(使用或不使用視需要的連接子)以產生 ALK4 或 ActRIIB 融合多肽。可於所選細胞中共表現此單鏈以及與該第一 Fc 互補的 Fc 序列以利於產生所欲的多鏈構築體。於此基於 SEEDbody (Sb) 配對的實例中，SEQ ID NO: 29 (hG1Fc(Sb_{AG})) 和 SEQ ID NO: 30 (hG1Fc(Sb_{GA})) 係互補的 IgG Fc 序列之實例，其中來自 IgA Fc 的經工程改造的胺基酸取代被加雙底線，且該構築體之 ALK4 或 ActRIIB 多肽可與 SEQ ID NO: 29 或 SEQ ID NO: 30 之一(但

非兩者)融合。考慮到天然 hG1Fc、天然 hG2Fc、天然 hG3Fc、和天然 hG4Fc 間高程度的胺基酸序列一致性，可領會到位於 hG1Fc、hG2Fc、hG3Fc、或 hG4Fc 中的相對應位置（參見圖 3）的胺基酸取代會產生 Fc 單體，其可於以下互補的 IgG-IgA 對中使用（SEQ ID NO: 29 和 30）。

```

1   THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
VVDVSHEDPE

51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
WLNGKEYKCK

101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PERPEVHLLP PSREEMTKNQ
VSLTCLARGF

151 YPKDIAVEWE SNGQPENNYK TTPSRQEPSQ GTTTFAVTSK
LTVDKSRWQQ

201 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK TISLSPGK      (SEQ ID NO: 29)

```

```

1   THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
VVDVSHEDPE

51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
WLNGKEYKCK

101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PPSEELALNE
LVTLTCLVKG

151 FYPSDIAVEW ESNGQELPRE KYLTWAPVLD SDGSFFLYSI
LRVAAEDWKK

201 GDTFSCSVMH EALHNHYTQK SLDRSPGK      (SEQ ID NO: 30)

```

【0163】 部分地，本文之揭露內容提供具有接附於 Fc C_H3 域之 C 端

的可切割白胺酸拉鍊域的非對稱的含 Fc 多肽鏈之所欲的配對。白胺酸拉鍊之接附足以造成異二聚體抗體重鏈之優先集合 (Wranik 等人(2012) J Biol Chem 287:43331-43339)。如於本文中揭露的，可任意地使一對接附至白胺酸拉鍊形成性股的 Fc 序列之一與該構築體之 ALK4 或 ActRIIB 多肽融合(使用或不使用視需要的連接子)以產生 ALK4 或 ActRIIB 融合多肽。可於所選細胞中共表現此單鏈以及接附至互補的白胺酸拉鍊形成性股的 Fc 序列以利於產生所欲的多鏈構築體。純化後使用細菌內蛋白酶 Lys-C 蛋白水解性消化該構築體可釋放該白胺酸拉鍊域，產生其結構與天然 Fc 者完全相同的 Fc 構築體。於此基於白胺酸拉鍊配對的實例中，SEQ ID NO: 36(hG1Fc-Ap1 (酸性)) 和 SEQ ID NO: 37 (hG1Fc-Bp1 (鹼性)) 係互補的 IgG Fc 序列之實例，其中該經工程改造的互補性白胺酸拉鍊序列被加底線，且該構築體之 ALK4 或 ActRIIB 多肽可與 SEQ ID NO: 36 或 SEQ ID NO: 37 之一(但非兩者)融合。考慮到天然 hG1Fc、天然 hG2Fc、天然 hG3Fc、和天然 hG4Fc 間高程度的胺基酸序列一致性，可領會到接附(使用或不使用視需要的連接子)至 hG1Fc、hG2Fc、hG3Fc、或 hG4Fc (參見圖 3) 的白胺酸拉鍊形成性序列會產生 Fc 單體，其可於以下互補的白胺酸拉鍊形成性對中使用 (SEQ ID NO: 36 和 37)。

```

1      THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
VVDVSHEDPE

51     VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
WLNQKEYKCK

101    VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ

```


VSLTCLVKGF

151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TPPVLDSGD SFFLYSKLTV

DKSRWQQGNV

201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGKGGSAQ LEKELQALEK

ENAOLEWELQ

251 ALEKELAQGAT (SEQ ID NO: 36)

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV

VVDVSHEDPE

51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD

WLNGKEYKCK

101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLPSREEMTKNQ

VSLTCLVKGF

151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TPPVLDSGD SFFLYSKLTV

DKSRWQQGNV

201 FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGKGGSAQ LKKKLQALKK

KNAQLKWKLQ

251 ALKKKLAQGAT (SEQ ID NO: 37)

【0164】 於某些方面，本文之揭露內容係關於 ALK4 多肽（例如 ALK4-Fc 融合蛋白質），其包含一或多個改變該 ALK4 多肽之等電點（pI）的胺基酸修飾、及／或 ActRIIB 多肽（例如 ActRIIB-Fc 融合蛋白質），其包含一或多個改變該 ActRIIB 多肽之等電點的胺基酸修飾。於一些實施方式中，選擇一或多個具有高於約 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、或 9.0 的 pI 值的候選域以構築完整多域蛋白質。於其他實施方式中，選擇一或

多個具有低於約 9.0、8.5、8.0、7.5、7.0、6.5、6.0、5.5、或 5.0 的 pI 值的候選域以構築完整的多域蛋白質。所屬技術領域中具有通常知識者會瞭解單一蛋白質會具有多種電荷形式。無意受限於任何特殊理論，可藉由一些不同的機制（包括（但不限於）胺基酸取代、陽離子化、去胺、羧端胺基酸異質性、磷酸化和醣苷化）修飾蛋白質之電荷。

【0165】 可藉由各種各樣的方法（包括（但不限於）等電聚焦）和種種的電腦演算法測定蛋白質之 I_p （參見例如 Bjellqvist 等人，1993, Electrophoresis 14:1023）。於一個實施方式中，pI 係使用利用多溫度低溫浴循環單元和 EPS 3501 XL 電源供應器的 Pharmacia Biotech Multiphor 2 電泳系統測定。將蛋白質樣本置入預鑄 ampholine 凝膠（例如 Amersham Biosciences，pI 範圍 2.5-10）。使用廣範圍 pI 標記標準品（例如 Amersham，pI 範圍 3-10，8 μ L）以測定蛋白質之相對 pI。於（例如）1500 V，50 mA 執行電泳共 105 分鐘。使用（例如）以純水稀釋至 1x 的 Sigma 固定溶液（5x）固定凝膠 染色係（例如）於室溫下使用 Simply Blue 染色劑（Invitrogen）執行過夜。以（例如）由 25%乙醇、8%醋酸和 67%純水所組成的溶液實現去染。使用（例如）Bio-Rad 感光密度計相對於標準品之校正曲線測定等電點。該一或多個度量可進一步包括界定該域在一或多個選自由不同 pH 值、不同溫度、不同剪應力、和不同冷凍／解凍循環所組成之群組的不同條件下的穩定性之特徵的度量。

【0166】 部分地，本文之揭露內容藉由與該 Fc 域中促進所欲的異多聚性物種之純化的另外的突變組合的於以上描述的方法提供非對稱的含 Fc 多肽鏈之所欲的配對。實例之一係與經工程改造的二硫鍵組合的基於球狀

突起至洞穴中配對的 Fc 域之互補性（如於 SEQ ID NO: 27-28 揭露的）加上於一個含 Fc 多肽鏈中的二個帶負電的胺基酸（天門冬胺酸或麩胺酸）和於互補的含 Fc 多肽鏈（SEQ ID NO: 66-67）中的二個帶正電的胺基酸（例如精胺酸）之另外的取代。此等四個胺基酸取代促進所欲的異多聚性融合蛋白質自異質多肽混合物基於在等電點或淨分子電荷之差異的選擇性純化。於此等序列中的經工程改造的胺基酸取代於以下被加雙底線，且該構築體之 ALK4 或 ActRIIB 多肽可與 SEQ ID NO: 66 或 SEQ ID NO: 67 之一（但非兩者）融合。考慮到天然 hG1Fc、天然 hG2Fc、天然 hG3Fc、和天然 hG4Fc 間高程度的胺基酸序列一致性，可領會到位於 hG2Fc、hG3Fc、或 hG4Fc 中的相對應位置（參見圖 3）的胺基酸取代會產生互補的 Fc 對，其等可被使用以取代以下互補的 hG1Fc 對（SEQ ID NO: 66-67）。

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PCREEMTENQ VSLWCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNHYTQDSLS LSPGK (SEQ ID NO: 66)

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVCTLT PSREEMTKNQ VSLSCAVKGF
151 YPSDIAVEWE SRGQPENNYK TTPPVLDSRG SFFLYSSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 67)

【0167】 另一個實例涉及與經工程改造的二硫鍵組合的基於球狀突起至洞穴中配對的 Fc 域之互補性（如於 SEQ ID NO: 27-28 揭露的）加上於

一個含 Fc 多肽鏈中的位置 213 的組胺酸至精胺酸取代 (SEQ ID NO: 68)。
此取代(於 Kabat 等人之編號系統中表示成 H435R)促進基於針對蛋白質 A 的親和力之差異的所欲異聚體自非所欲同二聚體的分離。該經工程改造的胺基酸取代係以雙底線指出,且該構築體之 ALK4 或 ActRIIB 多肽可與 SEQ ID NO: 68 或 SEQ ID NO: 28 之一(但非兩者)融合。考慮到天然 hG1Fc、天然 hG2Fc、天然 hG3Fc、和天然 hG4Fc 間高程度的胺基酸序列一致性,可領會到位於 hG2Fc、hG3Fc、或 hG4Fc 中的相對應位置(參見圖 3)的胺基酸取代會產生互補的 Fc 對,其等可被使用以取代 SEQ ID NO: 68 (以下)和 SEQ ID NO: 28 之互補的 hG1Fc 對。

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
51 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PCREEMTKNQ VSLWCLVKGF
151 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
201 FSCSVMEAL HNRYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 68)

【0168】 各種各樣的 Fc 域中的經工程改造突變係於以上就 G1Fc 序列 (SEQ ID NO: 31) 呈現。G2Fc、G3Fc、和 G4Fc 中的類似突變可自圖 3 中其等與 G1Fc 的排比衍生。由於不相等的鉸鏈長度,基於同型排比(圖 3)的類似 Fc 位置於 SEQ ID NO: 31、32、33、34、和 35 中具有不同的胺基酸編號,如於以下表格中總結的。

| 對於人類 Fc 同型的 C _H 3 位置間的對應性* | | | |
|---------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| IgG1 | IgG4 | IgG2 | IgG3 |
| SEQ ID NO: 31 | SEQ ID NO: 35 | SEQ ID NO: 32 | SEQ ID NO: 33 |
| 編號於 THT...起始 | 編號於 ESK...起始 | 編號於 VEC...起始 | 編號於 EPK...起始 |
| Y127 | Y131 | Y125 | Y134 |
| S132 | S136 | S130 | S139 |
| E134 | E138 | E132 | E141 |
| K138 | K142 | K136 | K145 |
| T144 | T148 | T142 | T151 |
| L146 | L150 | L144 | L153 |
| N162 | N166 | N160 | S169 |
| K170 | K174 | K168 | N177 |
| D177 | D181 | D175 | D184 |
| D179 | D183 | D177 | D186 |
| Y185 | Y189 | Y183 | Y192 |
| K187 | R191 | K185 | K194 |
| H213 | H217 | H211 | R220 |
| K217 | K221 | K215 | K224 |
| *基於圖 3 中顯示的多重序列排比的編號 | | | |

【0169】 咸瞭解該融合蛋白質（例如免疫球蛋白 Fc 融合蛋白質）之不同元件可以任何與所欲的官能性一致的方式佈置。例如，可將 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽域置於異源域之 C 端，或供選擇地，可將異源域置於 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽域之 C 端。該 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽域和該異源域於融合蛋白質不必須相鄰，且該等域之一之 C 端或 N 端或該等域之間可包括另外的域或胺基酸序列。

【0170】 例如，ALK4 及／或 ActRIIB 受體融合蛋白質可包含以公式

A-B-C 提出的胺基酸序列。B 部分對應於 ALK4 或 ActRIIB 多肽域。A 和 C 部分可獨立地為零、一、或超過一個胺基酸，且 A 和 C 部分兩者當出現時對於 B 皆為異源。A 及／或 C 部分可透過連接子序列接附至 B 部分。連接子可富含甘胺酸（例如 2-10、2-5、2-4、2-3 個甘胺酸殘基）或甘胺酸和脯胺酸殘基且可（例如）含有蘇胺酸／絲胺酸和甘胺酸的單一序列或蘇胺酸／絲胺酸及／或甘胺酸的重複序列，例如 GGG（SEQ ID NO: 13）、GGGG（SEQ ID NO: 14）、TGGGG（SEQ ID NO: 15）、SGGGG（SEQ ID NO: 16）、TGGG（SEQ ID NO: 17）、SGGG（SEQ ID NO: 18）、或 GGGGS（SEQ ID NO: 58）單一物、或重複。於某些實施方式中，ALK4 及／或 ActRIIB 融合蛋白質包含以公式 A-B-C 提出的胺基酸序列，其中 A 係前導（訊號）序列，B 由 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽域所組成，且 C 係增強活體內穩定性、活體內半生期、攝取／投予、組織局部化或分佈、蛋白質複合物之形成、及／或純化之一或多者的多肽部分。於某些實施方式中，ALK4 及／或 ActRIIB 融合蛋白質包含以公式 A-B-C 提出的胺基酸序列，其中 A 係 TPA 前導序列，B 由 ALK4 或 ActRIIB 受體多肽域所組成，且和 C 係免疫球蛋白 Fc 域。較佳的融合蛋白質包含於 SEQ ID NO: 39、41、42、44、45、46、47、48、70、72、74、76、78、和 80 之任一者提出的胺基酸序列。

【0171】 於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體進一步包含一或多個異源部分（域）以賦予所欲的特性。例如，一些融合域對於該融合蛋白質藉由親和力色層分析法的分離係特別有用的。如此融合域之廣為人知的實例包括（但不限於）多組胺酸、Glu-Glu、麩胱甘肽 S-轉移酶（GST）、硫氧還原蛋白、蛋白質 A、蛋白質 G、免疫球蛋白重鏈恆定區域（Fc）、麥

芽糖結合蛋白 (MBP)、或人類血清白蛋白。為了親和力純化的目的，使用用於親和力色層分析法的相關基質（諸如麩胱甘肽-、澱粉酶-、和鎳-或鈷-共軛性樹脂）。如此基質之許多者可以「套組」形式獲得，諸如可與(HIS₆)融合作伙伴一起使用的 Pharmacia GST 純化系統和 QIAexpress™ 系統 (Qiagen)。作為另一個實例，可選擇融合域以促進配體肽多肽之偵測。如此偵測域之實例包括種種的螢光性蛋白質（例如 GFP）以及「表位標籤」，其等通常係有針對其等的特殊抗體的短肽序列。可輕易獲得針對其等的特殊單株抗體的廣為人知的表位標籤包括 FLAG、流行性感冒病毒紅血球凝集素 (HA)、和 c-myc 標籤。於一些例子中，該等融合域具有蛋白酶切割位點，諸如對於因子 Xa 或凝血酶的，其允許相關的蛋白酶部分地消化該等融合蛋白質並藉此自其等釋放該等重組蛋白質。所釋放的蛋白質可接著藉由隨後的色層分析性分離自該融合域分離。

【0172】 於某些實施方式中，ALK4 及／或 ActRIIB 多肽可含有一或多個能夠穩定化該等多肽的修飾。例如，如此修飾增強該等多肽之試管內半生期、增強該等多肽之循環半生期、及／或降低該等多肽之蛋白水解性降解。如此穩定化修飾包括（但不限於）融合蛋白質（包括（例如）包含 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽域和穩定化域的融合蛋白質）、醣苷化位置之修飾（包括（例如）將醣苷化位置加至本文之揭露內容之多肽）、和碳水化合物部分之修飾（包括（例如）自本文之揭露內容之多肽移除碳水化合物部分）。用於本文，術語「穩定化域」不只論及如於融合蛋白質之例子中的融合域（例如免疫球蛋白 Fc 域），且亦包括非蛋白質性修飾，諸如碳水化合物部分、或非蛋白質性部分，諸如聚乙二醇。

【0173】 於較佳的實施方式中，欲根據於本文中描述的方法使用的 ALK4:ActRIIB 異多聚體係經分離的複合物。用於本文，經分離的蛋白質（或蛋白質複合物）或多肽（或多肽複合物）係已自其天然環境之組份分離者。於一些實施方式中，本文之揭露內容之異多聚體被純化至純度大於 95%、96%、97%、98%、或 99%，如由（例如）電泳（例如 SDS-PAGE、等電聚焦（IEF）、毛細管電泳）或色層分析法（例如離子交換或逆相 HPLC）測定的。用於評估抗體純度的方法於所屬技術領域中係廣為人知的（Flatman 等人，(2007) J. Chromatogr. B 848:79-87）。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體製劑實質上不含 ALK4 及／或 ActRIIB 同多聚體。例如，於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體製劑包含低於約 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、或低於 1% ALK4 同多聚體。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體製劑包含低於約 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、或低於 1% ActRIIB 同多聚體。於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體製劑包含低於約 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、或低於 1% ALK4 同多聚體和低於約 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、或低於 1% ActRIIB 同多聚體。

【0174】 於某些實施方式中，本文之揭露內容之 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽（以及包含其等的異多聚體）可藉由各種各樣的技術領域中已知的技術製造。例如，可使用標準蛋白質化學技術（諸如該等於以下者中描述的：Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag，柏林 (1993)和 Grant G. A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company，紐約(1992)）合成多肽。此外，自動化胜肽合成儀係商業上

可購得的 (Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Biosearch 9600)。供選擇地，如於所屬技術領域中廣為人知的，該等多肽（包括其等之片段或變體）可使用種種的表現系統（大腸桿菌、中國倉鼠卵巢（CHO）細胞、COS 細胞、桿狀病毒）重組地製造。於進一步的實施方式中，該等經修飾或未經修飾的多肽可通過藉由使用（例如）蛋白酶（例如胰蛋白酶、嗜熱菌蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、或成對鹼性胺基酸轉化酶（paired basic amino acid converting enzyme, PACE））消化重組地製造的全長 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽來製造。可使用電腦分析（使用商業上可購得的軟體，例如 MacVector、Omega、PCGene, Molecular Simulation, Inc.）以鑑認蛋白水解性切割位點。

3.編碼 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽的核酸

【0175】 於某些實施方式中，本文之揭露內容提供分離的及／或重組的編碼於本文中揭露的 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽（包括其等之片段、功能性變體、和融合蛋白質）的核酸。例如，SEQ ID NO: 11 編碼天然存在的人類 ALK4 前驅物多肽，而 SEQ ID NO: 12 編碼經加工的 ALK4 之胞外域。主題核酸可係單股或雙股。如此核酸可係 DNA 或 RNA 分子。此等核酸可被（例如）用於製作如於本文中描述的 ALK4:ActRIIB 異多聚體的方法。

【0176】 用於本文，經分離的核酸係論及已自其天然環境之組份分離的核酸分子。經分離的核酸包括在通常含有該核酸分子的細胞中所含的核酸分子，但該核酸分子係出現在染色體外或位於與其天然的染色體位置不同的染色體位置。

【0177】 於某些實施方式中，編碼本文之揭露內容之 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽的核酸被理解成包括 SEQ ID NO: 7、8、11、12、21、22、40、43、71、73、75、77、79、81、82、或 83 之任一者以及其等之變體。變體核苷酸序列包括不同處在一或多個核苷酸取代、添加、或缺失的序列（包括對偶基因變體），且因此會包括與 SEQ ID NO: 7、8、11、12、21、22、40、43、71、73、75、77、79、81、82、或 83 之任一者中指明的核苷酸序列不同的編碼序列。

【0178】 於某些實施方式中，本文之揭露內容之 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽係由包含以下者、基本上由以下者所組成、或由以下者所組成的經分離或重組的核酸序列編碼：與 SEQ ID NO: 7、8、11、12、21、22、40、43、71、73、75、77、79、81、82、或 83 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致的序列。所屬技術領域中具有通常知識者會領會到包含以下者、基本上由以下者所組成、或由以下者所組成的核酸序列亦在本文之揭露內容之範圍內：和與 SEQ ID NO: 7、8、11、12、21、22、40、43、71、73、75、77、79、81、82、或 83 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致的序列互補的序列。於進一步的實施方式中，本文之揭露內容之核酸序列可與異源核苷酸序列或於 DNA 文庫中分離、重組、及／或融合。

【0179】 於其他實施方式中，本文之揭露內容之核酸亦包括於嚴苛條件下與於 SEQ ID NO: 7、8、11、12、21、22、40、43、71、73、75、77、

79、81、82、或 83 中指明的核苷酸序列、SEQ ID NO: 7、8、11、12、21、22、40、43、71、73、75、77、79、81、82、或 83 之互補序列、或其等之片段雜交的核苷酸序列。所屬技術領域中具有通常知識者會輕易地瞭解到促進 DNA 雜交的適當嚴苛條件可變化。例如，可於約 45 °C 下於 6.0 x 氯化鈉／檸檬酸鈉（SSC）執行雜交，接著為於 50 °C 下以 2.0 x SSC 洗滌。例如，洗滌步驟中的鹽濃度可選自於 50 °C 下約 2.0 x SSC 的低嚴苛度至於 50 °C 下約 0.2 x SSC 的高嚴苛度。此外，洗滌步驟中的溫度可從於室溫下約 22 °C 的低嚴苛條件提高至於約 65 °C 下的高嚴苛條件。溫度和鹽兩者可變化，或溫度或鹽濃度可維持固定而另外的變數被改變。於一個實施方式中，本文之揭露內容提供在於室溫下 6 x SSC 的低嚴苛條件下然後於室溫下以 2 x SSC 洗滌時雜交的核酸。

【0180】 與於 SEQ ID NO: 7、8、11、12、21、22、40、43、71、73、75、77、79、81、82、或 83 提出的核酸不同處在於遺傳密碼之簡併性的經分離的核酸亦在本文之揭露內容之範圍內。例如，一些胺基酸係由超過一個三聯密碼指明。指明相同胺基酸的密碼子或同義密碼子（例如，CAU 和 CAC 對於組胺酸為同義密碼子）可導致「緘默」突變，其不影響該蛋白質之胺基酸序列。然而，預期到確實導致主題蛋白質之胺基酸序列改變的 DNA 序列多型性在哺乳動物細胞間會存在。所屬技術領域中具有通常知識者會領會到由於天然的對偶基因變異，此等於一或多個編碼特定蛋白質的核酸之核苷酸之變異（至多達該等核苷酸之約 3-5%）可於給定物種之個體間存在。任何和所有如此核苷酸變異和所得的胺基酸多型性皆在本文之揭露內容之範圍內。

【0181】 於某些實施方式中，本文之揭露內容之重組核酸可與一或多個表現構築體中的調節性核苷酸序列可操作地連接。調節性核苷酸序列一般對用於表現的宿主細胞會係適當的。所屬技術領域中已知用於各種各樣的宿主細胞的數種類型的適當表現載體和適合調節性序列。典型地，該一或多個調節性核苷酸序列可包括（但不限於）啟動子序列、前導或訊號序列、核糖體結合位置、轉錄起始和終止序列、轉譯起始和終止序列、和增強子或活化子序列。本文之揭露內容亦設想所屬技術領域中已知的組成性或可誘發性啟動子。該等啟動子可係天然存在的啟動子、或組合超過一種啟動子之元件的雜合啟動子。表現構築體在細胞中可存在於離基因組（諸如質體）上，或該表現構築體可被插入染色體中。於一些實施方式中，該表現載體含有可篩選標記基因以允許經轉形宿主細胞之篩選。可篩選標記基因於所屬技術領域中係廣為人知的且會隨者所使用的宿主細胞改變。

【0182】 於某些方面，該主題核酸係在包含編碼 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽且與至少一個調節性序列可操作地連接的核苷酸序列的表現載體中提供。調節性序列係於技術領域中認可的且選擇其以指揮 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽之表現。因此，術語調節性序列包括啟動子、增強子、和其他表現控制元件。例示性調節性序列係於以下者中描述：Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990)。例如，可在此等載體中使用廣泛種類的當與一 DNA 序列可操作地連接時可控制該 DNA 序列之表現的表現控制序列之任何者以表現編碼 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽的 DNA 序列。如此有用的表現控制序列包括（例如）SV40 之早期和晚期啟動子、*tet* 啟動子、腺病毒或細胞巨大病毒立

即早期啟動子、RSV 啟動子、lac 系統、*trp* 系統、TAC 或 TRC 系統、其表現由 T7 RNA 聚合酶指揮的 T7 啟動子、噬菌體拉目達之主要操作子和啟動子區域、fd 外套蛋白之控制區域、3-磷酸甘油酸激酶或其他解糖酵素之啟動子、酸性磷酸酶（例如 Pho5）之啟動子、酵母菌 α 交配因子之啟動子、桿狀病毒系統之多面體啟動子和其他已知控制原核或真核細胞或其等之病毒之基因之表現的序列、和種種的其等之組合。應瞭解到表現載體之設計可基於諸如欲轉形的宿主細胞及／或欲表現的蛋白質之類型之選擇的因子。此外，亦應考慮載體之複本數、控制該複本數的能力和由該載體編碼的任何其他蛋白質（諸如抗生素標記）之表現。

【0183】 本文之揭露內容之重組核酸可藉由將所選殖的基因(或其部分)連接至適合用於在原核細胞、真核細胞（酵母菌、鳥類、昆蟲或哺乳動物）、或兩者中表現的載體中來製造。用於生產重組 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽的表現運載體包括質體和其他載體。例如，適合的載體包括以下類型的質體：用於在原核細胞（諸如大腸桿菌）中表現的 pBR322 衍生性質體、pEMBL 衍生性質體、pEX 衍生性質體、pBTac 衍生性質體和 pUC 衍生性質體。

【0184】 一些哺乳動物表現載體含有促進該載體在細菌中的增殖的原核序列、和一或多種在真核細胞中表現的真核轉錄單元兩者。pcDNAI/amp、pcDNAI/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo 和 pHyg 衍生性載體係適用於轉染真核細胞的哺乳動物表現載體之實例。此等載體之一些係以來自細菌性質體（諸如 pBR322）的序列修飾以促進在原核細胞和真核細胞兩者中的複

製和藥物抗性篩選。供選擇地，可將病毒之衍生物（諸如牛乳頭狀瘤病毒（BPV-1）、或 Epstein-Barr 二氏病毒（pHEBo、pREP 衍生性和 p205））用於蛋白質在真核細胞中的暫時表現。其他病毒（包括反轉錄病毒）表現系統之實例可在以下基因療法遞送系統之描述中找到。種種於質體之製備和宿主有機體之轉形中利用的方法於所屬技術領域中係廣為人知的。對於其他用於原核和真核細胞兩者的適合表現系統、以及一般的重組程序（Molecular Cloning A Laboratory Manual，第 3 版，由 Sambrook、Fritsch 和 Maniatis 編輯 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001）。於一些實例中，藉由使用桿狀病毒表現系統來表現該重組多肽可係所欲的。如此桿狀病毒表現系統之實例包括 pVL 衍生性載體（諸如 pVL1392、pVL1393 和 pVL941）、pAcUW 衍生性載體（諸如 pAcUW1）、和 pBlueBac 衍生性載體（諸如含 β -gal pBlueBac III）。

【0185】 於較佳的實施方式中，會將載體設計成用於在 CHO 細胞中製造主題 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽，諸如 Pcmv-Script 載體（Stratagene, La Jolla, Calif.）、pcDNA4 載體（Invitrogen, Carlsbad, Calif.）和 pCI-neo 載體（Promega, Madison, Wisc.）。如會係明顯的，可使用主題基因構築體以造成於在培養基中繁殖的細胞中的主題 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽之表現，例如以製造蛋白質（包括融合蛋白質或變體蛋白質）以供純化。

【0186】 本文之揭露內容亦係關於以包括主題 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽之一或多者的編碼序列的重組基因轉染的宿主細胞。該宿主細胞可係任何原核或真核細胞。例如，ALK4 及／或 ActRIIB 多肽可於細菌細胞（諸如大腸桿菌）、昆蟲細胞（例如使用桿狀病毒表現系統）、酵母菌、或哺乳

動物細胞（例如中國倉鼠卵巢（CHO）細胞株）中表現。其他適合的宿主細胞對於所屬技術領域中具有通常知識者係已知的。

【0187】 因此，本文之揭露內容進一步係關於製造主題 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽的方法。例如，可將以編碼 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽的表現載體轉染的宿主細胞培養於允許該 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽之表現發生的適當條件下。該多肽可自含有該多肽的細胞之混合物和培養基分泌和分離。供選擇地，ALK4 及／或 ActRIIB 多肽可從自所收穫並溶胞的細胞獲得的細胞質部分或膜部分分離。細胞培養物包括宿主細胞、培養基和其他副產物。適用於細胞培養的培養基於所屬技術領域中係廣為人知的。可使用所屬技術領域中已知用於純化蛋白質的技術（包括離子交換色層分析法、凝膠過濾色層分析法、超過濾、電泳、使用對 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽之特定表位有專一性的抗體的免疫親和力純化和使用與 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽融合的域結合的劑的親和力純化（例如可用於純化 ALK4-Fc 及／或 ActRIIB-Fc 融合蛋白質的蛋白質 A 管柱））自細胞培養基、宿主細胞、或兩者分離主題多肽。於一些實施方式中，該 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽係含有促進其純化的域的融合蛋白質。

【0188】 於一些實施方式中，純化係藉由包括（例如）任何順序的以下者之三者或更多者的一系列管柱色層分析步驟達成：蛋白質 A 色層分析法、Q sepharose 色層分析法、苯基 sepharose 色層分析法、粒徑篩色層分析法、和陽離子交換色層分析法。該純化可加上病毒過濾和緩衝液交換來完成。可將 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽（以及其融合蛋白質）純化至如由粒徑篩色層分析法測定的>90%、>95%、>96%、>98%、或>99%的純度和如

由 SDS PAGE 測定的>90%、>95%、>96%、>98%、或>99%的純度。純度之目標水平應係於哺乳動物系統（特別係非人類靈長動物、齧齒動物（小鼠）、和人類）中足以達成所欲的結果者。

【0189】 於另一個實施方式中，編碼純化前導序列的融合基因（諸如於重組 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽之所欲部分之 N 端的聚(His)／腸激酶切割位點序列）可允許所表現的融合蛋白質藉由親和力色層分析法使用 Ni^{2+} 金屬樹脂純化。接著純化前導序列可藉由以腸激酶處理來隨後移除以提供經純化的 ALK4 及／或 ActRIIB 多肽、以及其等之異多聚體（Hochuli 等人 (1987) J. Chromatography 411:177；和 Janknecht 等人(1991) PNAS USA 88:8972）。

【0190】 用於製作融合基因的技術係廣為人知的。基本上，編碼不同的多肽序列的種種 DNA 片段之連結係根據習用技術執行，其利用用於連接的鈍端或交錯端、提供適當的末端的限制酵素消化、酌情的黏性端之填滿、避免非所欲的連結的鹼性磷酸酶處理、和酵素性連接。於另一個實施方式中，可藉由包括自動化 DNA 合成儀的習用技術合成融合基因。供選擇地，基因片段之 PCR 擴增可使用錨定引子實現，該等引子導致兩個連續的基因片段間的互補突出，該等片段可隨後被黏著以產生嵌合的基因序列。參見（例如）Current Protocols in Molecular Biology，編者 Ausubel 等人，John Wiley & Sons: 1992。

4.例示性治療用途

【0191】 於某些實施方式中，可將 ALK4:ActRIIB 異多聚體（例如

ALK4:ActRIIB 異二聚體) 用於治療或預防與 ALK4:ActRIIB 結合性配體之異常活性有關連的疾病或病況。此等疾病、病症、或病況於本文中一般稱為「與 ALK4:ActRIIB 相關的病況」或「與 ALK4:ActRIIB 相關的病症」。於某些實施方式中，本文之揭露內容提供於個體中治療或預防與 ALK4:ActRIIB 相關的病況的方法，其係藉由將治療有效量的 ALK4:ActRIIB 異多聚體投予至需要其的個體。術語「對象」、「個體」、或「患者」於本說明書通篇中係可互換的。可單獨或以組合形式將本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體之任何者用於在本文中揭露的治療用途。此等方法特別瞄準哺乳動物（包括（例如）齧齒動物、靈長動物、和人類）之治療性和預防性治療。

【0192】 用於本文中，「預防」病症或病況的治療係論及（於統計樣本中）於所治療的樣本中相較於未經治療的對照組樣本降低該病症或病況之發生率、或相較於未經治療的對照組樣本延遲一或多種該病症或病況之症狀之開始或降低其（等）之嚴重性的化合物。術語「治療」用於本文中包括一旦該病況已建立後改善或消除該病況。於任一例子中，預防或治療可於由醫師或其他健康照護提供者提供的診斷和該治療劑之想要的投予結果中辨別。

【0193】 一般而言，如於本文之揭露內容中描述的疾病或病況之治療或預防係藉由以「有效量」投予本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體來達成。藥劑的有效量係論及（於所需的劑量和時間期間）有效於達成所欲的治療或預防結果的量。本文之揭露內容之藥劑之「治療有效量」可根據諸如以下者的因子變化：該個體之疾病之狀態、年齡、性別、和重量、

和該藥劑於該個體中引起所欲的反應的能力。「預防有效量」係論及（於所需的劑量和時間期間）有效於達成所欲的預防性結果的量。

【0194】 天然存在的 ALK4 和 ActRIIB 受體-配體複合物於組織生長以及早期發育過程（諸如種種結構之正確形成）或於一或多種發育後能力（包括性發育、腦下垂體激素製造、和骨骼和軟骨之製造）扮演必要的角色。因此，與 ALK4:ActRIIB 相關的病況包括（但不限於）異常的組織生長和發育缺陷。此外，與 ALK4:ActRIIB 相關的病況包括（但不限於）細胞生長和分化之病症，諸如發炎、過敏、自體免疫疾病、和腫瘤。

【0195】 例如，與 ALK4:ActRIIB 相關的病況包括神經肌肉病症（例如肌肉營養不良和肌肉萎縮）、鬱血性阻塞性肺病（和與 COPD 相關的肌肉消耗）、肌肉消耗症候群、肌肉減少症、惡病質、脂肪組織病症（例如肥胖）、第 2 型糖尿病（NIDDM，成人發病型糖尿病）、和骨骼退化疾病（例如骨質疏鬆症）。其他例示性的與 ALK4:ActRIIB 相關的病況包括肌退化性病症和神經肌肉病症、組織修復（例如創傷癒合）、神經退化性疾病（例如肌肉萎縮性脊髓側索硬化症）、和免疫病症（例如與淋巴球之異常增殖或功能相關的病症）。

【0196】 於一些實施方式中，該與 ALK4:ActRIIB 相關的病況係間質性肺病（例如自發性肺纖維化）。於一些實施方式中，該間質性肺病係肺纖維化。於一些實施方式中，該間質性肺病係由以下者之任一者造成：矽肺病、石棉沉著病、鉍中毒症、過敏性肺炎、藥物使用（例如抗生素、化學治療藥物、抗心律不整劑、士他汀（statin））、全身性硬化、多發性肌炎、皮膚肌炎、全身性紅斑性狼瘡、類風濕關節炎、感染（例如非典型肺炎、

肺囊蟲肺炎、肺結核、沙眼披衣菌、及／或呼吸道融合病毒)、淋巴管癌病、抽煙、或發育病症。於一些實施方式中，該間質性肺病係自發性(例如類肉瘤病、自發性肺纖維化、Hamman-Rich 氏症候群、及／或抗合成酶症候群)。於特別的實施方式中，該間質性肺病係自發性肺纖維化。於一些實施方式中，用於自發性肺纖維化的治療係組合另外的治療劑投予。於一些實施方式中、該另外的治療劑係選自由以下者所組成之群組：吡非尼酮(pirfenidone)、N-乙醯基半胱胺酸、普賴蘇(prednisone)、硫唑嘌呤、尼達尼布(nintedanib)、其等之衍生物和其等之組合。

【0197】 於某些實施方式中，本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體可呈用於肌肉營養不良的治療之部分使用。術語「肌肉營養不良」係論及一群退化性肌肉疾病，其等之特徵在於骨骼肌和有時心臟肌肉和呼吸肌肉之逐漸弱化和劣化。肌肉營養不良係遺傳病症，其等之特徵在於以肌肉中的微小改變起始的進行性肌肉消耗和虛弱。隨著肌肉隨時間劣化，該人之肌肉力量衰落。可以包括主題 TGF-β 超家族異多聚體複合物的攝生法治療的例示性肌肉營養不良包括：Duchenne 氏肌肉營養不良(DMD)、Becker 氏肌肉營養不良(BMD)、Emery-Dreifuss 二氏肌肉營養不良(EDMD)、肢帶肌肉營養不良(LGMD)、臉肩胛肱骨肌肉營養不良(FSH 或 FSHD)(亦以 Landouzy-Dejerine 為人所知)、肌強直性營養不良(MMD；亦以 Steinert 氏病為人所知)、眼咽型肌肉營養不良(OPMD)、遠端肌肉營養不良(DD)、先天性肌肉營養不良(CMD)。

【0198】 Duchenne 氏肌肉營養不良(DMD)於 1860 年代由法國神經學家 Guillaume Benjamin Amand Duchenne 首先描述。Becker 氏肌肉營養

不良 (BMD) 係以於 1950 年代首先描述此 DMD 之變體的德國醫生 Peter Emil Becker 命名。DMD 係最常見的男性遺傳性疾病之一，每 3,500 名男孩影響一人。DMD 於肌肉營養不良蛋白 (dystrophin) 基因 (其位於 X 染色體之短臂) 有缺陷時發生。因為男性僅帶有一個 X 染色體之複本，其等僅具有一個肌肉營養不良蛋白基因之複本。在無肌肉營養不良蛋白蛋白質時，肌肉在收縮和放鬆之循環期間輕易受損。雖然於該疾病早期肌肉藉由再生補償，後來肌肉先驅細胞無法趕上持續的傷害且健康的肌肉被非功能性纖維脂肪性組織置換。

【0199】 BMD 係導因於在肌肉營養不良蛋白基因之不同的突變。BMD 患者具有一些肌肉營養不良蛋白，但其係量不足的或質差的。一些肌肉萎縮蛋白之存在保護患有 BMD 的患者之肌肉免於像患有 DMD 的患者之肌肉退化那麼嚴重或那麼快。

【0200】 於動物中的研究指出 GDF8 傳訊途徑之抑制可能於 DMD 和 BMD 患者中有效地治療疾病之種種方面 (Bogdanovich 等人，2002, Nature 420:418-421 ; Pistilli 等人，2011, Am J Pathol 178:1287-1297)。因此，本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 拮抗劑可扮演 GDF8 抑制劑 (拮抗劑)，且構成供選擇的於 DMD 和 BMD 患者中活體內封阻透過 GDF8 及／或相關的 TGF β 超家族配體的傳訊的方法。

【0201】 類似地，本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體可提供於其他需要肌肉生長的疾病病況中增加肌肉質量的有效方法。例如，肌肉萎縮性脊髓側索硬化症 (ALS) (亦稱為 Lou Gehrig 氏病或運動神經元疾病) 係一種慢性、進行性、且無法治癒的攻擊運動神經元 (其等係對於骨骼肌

收縮之起始而言為必須的中樞神經系統之組份)的 CNS 病症。於 ALS 中，運動神經元劣化且最終死亡，且雖然人之大腦正常會維持完全運作和警惕，肌肉收縮之起始於脊髓水平被封阻。發展出 ALS 的個體典型係於 40 和 70 歲間，且首先劣化的運動神經元係該等支配臂或腿者。患有 ALS 的患者可能會走路困難、可能會把東西掉下、摔倒、說話模糊不清、和無法控制地哭笑。隨著該疾病進展，四肢之肌肉開始由於不使用而萎縮。肌肉虛弱變得致弱，且患者最終需要輪椅或變得困在床上。大部分 ALS 患者由於呼吸衰竭或呼吸器輔助之併發症（如肺炎）而於疾病開始後 3-5 年死亡。

【0202】 於一些實施方式中，本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體可用於治療發炎性肌肉疾病／病症，諸如皮膚肌炎、包涵體肌炎或多發性肌炎。於一些實施方式中，該發炎性肌肉疾病／病症係皮膚肌炎。於一些實施方式中，該發炎性肌肉疾病／病症係多發性肌炎。於一些實施方式中，該發炎性肌肉疾病／病症係包涵體肌炎。於一些實施方式中，該包涵體肌炎係遺傳性包涵體肌炎。於一些實施方式中，該包涵體肌炎係散發性包涵體肌炎。

【0203】 散發性包涵體肌炎與自體免疫和衰退過程兩者相關。此病症典型在年齡超過 50 歲的患者首次出現，且主要於男性出現。臨床上，散發性包涵體肌炎之特徵在於進行性股四頭肌和屈指深肌虛弱和萎縮。許多患者於症狀開始後 10-15 年變得依賴輪椅和嚴重殘障。患者亦經常由於食道肌肉和咽肌肉受累而顯示吞嚥困難。散發性包涵體肌炎之診斷通常係基於一些諸如以下者的因子之組合：血液中升高的肌酸激酶水平、異常的肌電圖結果；或顯示肌肉之發炎性細胞入侵、空泡變性及／或異常蛋白質斑之包

涵的肌肉生檢。

【0204】 藉由 ALK4:ActRIIB 異多聚體促進肌肉質量增加亦可能有益於該等患有肌肉消耗病者。Gonzalez-Cadavid 等人（如前述）報導了 GDF8 表現與人類之無脂肪質量逆相關且增加的 GDF8 基因之表現與具有 AIDS 消耗症候群的人之失重相關。藉由抑制 AIDS 患者中的 GDF8 之功能，可減輕至少某些 AIDS 之症狀（若非完全消除），因此顯著地改善 AIDS 患者之生活品質。

【0205】 由於 GDF8 功能之喪失亦與無營養素攝取之降低的脂肪喪失相關（Zimmers 等人，如前述；McPherron 和 Lee，如前述），可進一步將主題 ALK4:ActRIIB 異多聚體用作為用於延緩或預防肥胖和第 2 型糖尿病之發展的治療劑。

【0206】 癌症厭食症-惡病質症候群係癌症之最使患者衰弱和威脅生命的方面之一。此症候群係許多類型的癌症之共同特徵-於死亡時在大約 80% 的癌症患者中出現-且不僅係差的生活品質和差的對化學療法的反應之原因且亦係短於在具有可相比較的腫瘤但無失重的患者中發現者的生存時間的原因。若大於發病前重量之百分之五的非自願失重在六個月的期間內發生，典型會懷疑患有癌症的患者有惡病質。與厭食症、脂肪和肌肉組織之消耗、和心理痛苦相關，惡病質源自癌症和宿主間的複雜交互作用。癌症惡病質影響細胞介素製造、脂質移動性因子和蛋白質水解誘發性因子之釋放、和中間代謝之改變。雖然厭食症係共通的，僅僅減少食物攝取無法說明在癌症患者中見到的身體組成之改變，且增加營養素攝取無法逆轉該消耗症候群。目前，並無對於控制或逆轉惡病質病程的治療。由於已發

現 GDF8 在成年小鼠中的全身性過度表現會誘發與在人類之惡病質症候群中見到者類似的極度肌肉和脂肪喪失（Zimmers 等人，如前述），可將主題 ALK4:ActRIIB 異多聚體有益地用於預防、治療、或減輕惡病質症候群（其中肌肉生長係所欲的）之症狀。可用於預防、治療、或減輕如於以上描述的肌肉流失的異多聚性複合物之實例係 ALK4:ActRIIB 異二聚體。

【0207】 於某些實施方式中，可將本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體用於誘發骨骼及／或軟骨形成、預防骨流失、增加骨礦化、預防骨骼之脫礦化、及／或增加骨密度之方法。可在被診斷為具有亞臨床低骨密度的患者中將 ALK4:ActRIIB 異多聚體用作為對抗骨質疏鬆症之發展的保護性方法。

【0208】 於一些實施方式中，本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體可於人類和其他動物中的骨折和軟骨缺陷之癒合找到醫療用途。主題方法和組成物亦可於封閉性以及開放性骨折復位以及改善人工關節之固定具有預防用途。由骨原性藥劑誘發的重新的骨骼形成對於先天性、創傷誘發性、或由腫瘤切除造成的顱面缺陷之修復係有用的，且亦可用於美容整形手術。進一步，可將本發明之方法和組成物用於治療牙周病和其他牙齒修復程序。於某些例子中，ALK4:ActRIIB 異多聚體可提供吸引骨骼形成性細胞的環境、刺激骨骼形成性細胞之生長、或誘發骨骼形成性細胞之先驅細胞之分化。亦可將本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體用於治療骨質疏鬆症。進一步，可將 ALK4:ActRIIB 異多聚體用於修復軟骨缺陷和預防／逆轉骨關節炎。如於本文中描述的可用於誘發骨骼形成、預防骨流失、增加骨礦化、預防骨骼之脫礦化、及／或增加骨密度之異多聚性複合物之

實例係 ALK4:ActRIIB 異二聚體。

【0209】 Rosen 等人(編者)Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 第 7 版 American Society for Bone and Mineral Research, 華盛頓 D.C. (以引用方式併入本文中) 提供關於可使用 ALK4:ActRIIB 異多聚體治療的骨骼病症的廣泛討論。本文中提供部分列表。可將本發明之方法和組成物用於特徵在於或造成以下者的病況：骨流失，諸如骨質疏鬆症（包括繼發性骨質疏鬆症）、副甲狀腺機能亢進症、慢性腎臟疾病礦物質骨骼病症、性激素剝奪或去除（例如雄性素及／或動情素）、糖皮質素治療、類風濕關節炎、嚴重燒傷、副甲狀腺機能亢進症、高鈣血症、低鈣血症、低磷酸鹽血症、軟骨病（包括腫瘤誘發性軟骨病）、高磷酸鹽血症、維生素 D 缺乏、副甲狀腺機能亢進症（包括家族性副甲狀腺機能亢進症）和假副甲狀腺低能症、至骨骼的腫瘤轉移、導因於腫瘤或化學療法的骨流失、骨骼和骨髓之腫瘤（例如多發性骨髓瘤）、局部缺血性骨骼病症、牙周病和口部骨流失、Cushing 氏病、Paget 氏病、甲狀腺中毒症、慢性腹瀉狀態或吸收不良、腎小管性酸中毒、或神經性厭食症。亦可將本發明之方法和組成物用於其特徵在於骨骼形成或癒合之失敗的病況，包括不癒合骨折、否則癒合會延緩的骨折、胎兒和新生兒骨骼發育不良（例如低鈣血症、高鈣血症、鈣受體缺陷和維生素 D 缺乏）、骨壞死（包括顎部之骨壞死）和骨發生不全。此外，合成代謝功效會造成如此拮抗劑降低與骨骼傷害或侵蝕相關的骨骼疼痛。由於抗再吸收功效，可將如此拮抗劑用於治療異常骨骼形成之病症，諸如成骨細胞性腫瘤轉移（例如與原發性前列腺癌或乳癌相關者）、骨原性骨肉瘤、骨石化病、進行性骨幹發育不良、骨

內膜骨質增生、脆弱性骨硬化症、和肢骨紋狀肥大。其他可治療的病症包括纖維性發育不良和軟骨發育不良。

【0210】 於另一個特殊的實施方式中，本文之揭露內容提供用於修復骨折和其他與軟骨及／或骨骼缺陷或牙周病相關的病況的治療方法和組成物。本發明進一步提供用於創傷癒合和組織修復的治療方法和組成物。創傷之類型包括（但不限於）燒傷、切口和潰爛。參見（例如）PCT 公開編號 WO 84/01106。如此組成物包含治療有效量的與醫藥上可接受的媒劑、載劑、或基質混合的本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體之至少一者。

【0211】 於一些實施方式中，可將本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體用於造成骨流失的病況，諸如骨質疏鬆症、副甲狀腺機能亢進症、Cushing 氏病、甲狀腺中毒症、慢性腹瀉狀態或吸收不良、腎小管性酸中毒、或神經性厭食症。一般會領會到身為女性，具有低體重且過久坐的生活方式對於骨質疏鬆症（骨骼礦物質密度之喪失，導致骨折風險）係風險因子。然而，骨質疏鬆症亦可導因於長期使用某些醫藥。導因於藥物或另一種醫學病況的骨質疏鬆症以繼發性骨質疏鬆症為人所知。於 Cushing 氏病中，身體製造的過量皮質醇導致骨質疏鬆症和骨折。最常見的與繼發性骨質疏鬆症相關的醫藥係皮質類固醇，其等係一類起與皮質醇（天然由腎上腺製造的激素）類似作用的藥物。雖然適當的甲狀腺激素之水平對於骨骼之發育係所需的，過量的甲狀腺激素可隨時間降低骨骼質量。含鋁制酸劑當被有腎臟問題的人（特別是該等正經歷透析者）以高劑量攝取時可導致骨流失。其他可造成繼發性骨質疏鬆症的醫藥包括用於預防癲癇的苯妥英（dilantin）

和巴比妥酸鹽；胺甲喋呤（Rheumatrex、Immunex、Folex PFS），其係用於一些關節炎之形式、癌症、和免疫病症的藥物；環孢素（Sandimmune、Neoral），其係用於治療一些自體免疫疾病和在器官移植患者中抑制免疫系統的藥物；黃體激素釋放性激素促效劑（Lupron、Zoladex），其用於治療前列腺癌和子宮內膜異位；肝素（Calciparine、Liquaemin），其係抗凝血醫藥；和鎔膽胺（Questran）和 colestipol（Colestid），其等用於治療高膽固醇。導因於癌症療法的骨流失被廣泛地辨識且被稱為癌症療法誘發性骨流失（CTIBL）。骨轉移可於骨骼造成孔洞，其可藉由使用 ALK4:ActRIIB 異多聚體治療來修正。骨流失亦可由牙周病（其中位於牙床凹處的細菌製造毒素和有害酵素的慢性感染）造成。

【0212】 於進一步實施方式中，本文之揭露內容提供用於治療與異常或不想要的骨骼生長相關的疾病或病症的方法和治療劑。例如，患有先天性病症進行性骨化纖維發育不良（Fibrodysplasia ossificans progressiva, FOP）的患者為自發性或對組織創傷反應的於軟組織中的進行性異位骨骼生長所苦，其對生活品質有很大的衝擊。此外，異常的骨骼生長可於換髖手術後發生且因此毀掉手術結果。此係病理性骨骼生長和其中主題方法和組成物於治療上可用的狀況之更常見的實例。亦可將相同的方法和組成物用於治療異常骨骼生長之其他形式（例如創傷、燒傷或脊髓損傷後的骨骼之病理生長）、和用於治療或預防與和轉移性前列腺癌或骨肉瘤連結見到的異常骨骼生長相關的非所欲的病況。

【0213】 於某些實施方式中，本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體可用於在患有癌症的患者中促進骨骼形成。具有某些腫瘤（例如前列

腺、乳房、多發性骨髓瘤或任何造成副甲狀腺機能亢進症的腫瘤) 的患者由於腫瘤誘發性骨流失、骨轉移、和治療劑而具有高骨流失風險。如此患者可以 TGF- β 超家族異多聚體複合物、或複合物之組合治療，即使是在不存在骨流失或骨轉移之跡象下。亦可針對骨流失或骨轉移之跡象監視患者，且可於指標表明風險增加的情況下以 ALK4:ActRIIB 異多聚體治療患者。一般地，利用 DEXA 掃描以評估骨密度之改變，而骨骼再成型之指標可用於評估骨轉移之可能性。可監視血清標記。骨骼專一性鹼性磷酸酶 (BSAP) 係於成骨細胞中存在的酵素。BSAP 之血液水平於患有骨轉移和其他導致骨骼再成型增加的病況的患者中增加。骨鈣化素和原膠原胜肽亦與骨骼形成和骨轉移相關。已於具有由前列腺癌造成的骨轉移的患者中和 (在較小的程度上) 於來自乳癌的骨轉移中偵測到 BSAP 之增加。BMP7 水平於已轉移至骨骼的前列腺癌中 (但非於源於膀胱癌、皮膚癌、肝癌、或肺癌的骨轉移中) 係高的。第 I 型羧端端肽 (ICTP) 係在至骨骼之再吸收期間形成的膠原中找到的交聯物。因為骨骼被不斷地分解和再形成，ICTP 會於身體各處找到。然而，於骨轉移之位置，其水平會係顯著高於在正常骨骼之區域。ICTP 已在導因於前列腺癌、肺癌、和乳癌的骨轉移中以高水平找到。另一種膠原交聯物 (第 I 型 N 端端肽 (NTx)) 在骨更新期間隨著 ICTP 產生。NTx 之量於許多不同類型的癌症 (包括肺癌、前列腺癌、和乳癌) 造成的骨轉移中增加。此外，NTx 之水平隨著骨轉移之進展增加。因此，可將此標記用於偵測轉移以及測量疾病之程度兩者。其他再吸收之標記包括吡啶啉和去氧吡啶啉。任何再吸收標記或骨轉移標記之增加指出患者中對於使用 ALK4:ActRIIB 異多聚體的療法的需求。

【0214】 於另一個實施方式中，可將 ALK4:ActRIIB 異多聚體用於患有慢性腎臟疾病礦物質骨骼病症（CKD-MBD）（導因於腎臟疾病的相關骨骼、心血管、和礦物質代謝病症之寬廣症候群）的患者。CKD-MBD 涵蓋種種往往被稱為腎性骨營養不良（ROD）的骨骼病狀，其係使用，ALK4:ActRIIB 異多聚體的治療之較佳的實施方式。取決於不同病原因子之相對貢獻，ROD 係以種種的骨骼再成型之病理模式顯現（Hruska 等人，2008, Chronic kidney disease mineral bone disorder (CKD-MBD)；於 Rosen 等人（編者）Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism，第 7 版 American Society for Bone and Mineral Research，華盛頓 D.C., pp 343-349）。於譜帶之一端者係具有尿毒症骨營養不良和低骨更新的 ROD，其等之特徵在於低數目的活性再成型位置、極度抑制的骨骼形成、和低骨骼再吸收。位於另一端者係具有副甲狀腺機能亢進症、高骨更新、和纖維性骨炎的 ROD。考慮到 ALK4:ActRIIB 異多聚體可發揮合成代謝和抗再吸收功效兩者，可將此等藥劑用於跨越 ROD 病理譜帶的患者。

【0215】 本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體可與其他骨骼活性醫藥劑共同投予。共同投予可藉由投予單一共調配物、藉由同時投予、或藉由於分開的時間投予來實現。若與其他骨骼活性劑一起投予時，ALK4:ActRIIB 異多聚體可係特別有利的。患者可受益於共同地接受 ALK4:ActRIIB 異多聚體和攝取鈣補充物、維生素 D、適當的運動及／或，於一些例子中，其他醫藥。其他醫藥之實例包括雙膦酸鹽（阿倫膦酸鹽（Alendronate）、伊班膦酸鹽（ibandronate）和利塞膦酸鹽（risedronate））、抑鈣素、動情素、副甲狀腺激素和雷洛昔芬（raloxifene）。該等雙膦酸鹽（阿

侖膦酸鹽、伊班膦酸鹽和利塞膦酸鹽)、抑鈣素、動情素和雷洛昔芬影響骨骼再成型循環且被分類為抗再吸收醫藥。骨骼再成型係由二個不同的期所組成：骨骼再吸收和骨骼形成。抗再吸收醫藥延遲或停止骨骼再成型循環之骨骼再吸收部分但不延遲該循環之骨骼形成性部分。因此，新形成以比骨骼再吸收更高的速率繼續，且骨密度可隨時間增加。特立帕肽 (Teriparatide) (副甲狀腺激素之形式) 增加骨骼再成型循環中骨骼形成之速率。阿侖膦酸鹽被核准用於以預防 (每日 5 mg 或一週一次 35 mg) 和治療 (每日 10 mg 或一週一次 70 mg) 停經後骨質疏鬆症兩者。阿侖膦酸鹽降低骨流失、增加骨密度和降低脊柱、腕和髕骨折之風險。阿侖膦酸鹽亦被核准用於在男性和女性中治療導因於糖皮質素 (即普賴蘇和皮質酮) 之長期使用的糖皮質素誘發性骨質疏鬆症和用於在男性中治療骨質疏鬆症。阿侖膦酸鹽加上維生素 D 被核准用於在停經後女性中治療骨質疏鬆症 (70 mg 一週一次加上維生素 D)、和用於在具有骨質疏鬆症的男性中改善骨骼質量的治療。伊班膦酸鹽被核准用於預防和治療停經後骨質疏鬆症。以一月一次丸劑 (150 mg) 的形式攝取，伊班膦酸鹽應該於每個月同一日攝取。伊班膦酸鹽減少骨流失、增加骨密度並降低脊柱骨折之風險。利塞膦酸鹽被核准用於預防和治療停經後骨質疏鬆症。每日地攝取 (5 mg 劑) 或每週地攝取 (35 mg 劑或 35 mg 劑加上鈣)，利塞膦酸鹽延緩骨流失、增加骨密度和降低脊柱和非脊柱骨折之風險。利塞膦酸鹽亦被核准用於男性和女性以預防及／或治療導因於糖皮質素 (即普賴蘇或皮質酮) 之長期使用的糖皮質素誘發性骨質疏鬆症。抑鈣素係天然存在的涉及鈣調節和骨骼代謝的激素。在過了更年期超過 5 年的女性中，抑鈣素延緩骨流失、增加脊骨密度、

且可減輕與骨折相關的疼痛。抑鈣素降低脊柱骨折之風險。抑鈣素可以注射劑（每日 50-100 IU）或鼻噴霧（每日 200 IU）的形式獲得。

【0216】 患者亦可受益於相聯地接受 ALK4:ActRIIB 異多聚體和另外的骨骼活性醫藥。動情素療法（ET）／激素療法（HT）被核准用於預防骨質疏鬆症。已顯示 ET 於停經後女性會在脊柱和髖兩者減少骨流失、增加骨密度、並降低髖和脊柱骨折之風險。ET 最常以遞送每日大約 0.3 mg 的低劑量或每日大約 0.625 mg 的標準劑量的丸劑或皮膚貼劑之形式投予且即使當於 70 歲之後開始亦有效。當單獨攝取動情素時，其可增加女性發展出子宮內襯之癌症（子宮內膜癌症）之風險。為消除此風險，健康照護提供者為該等具有完整子宮的女性開與動情素組合的激素助孕素的處方（激素補充療法或 HT）。ET/HT 減輕更年期症狀且已顯示其對骨骼健康具有有益的功效。副作用可包括陰道出血、乳房易觸痛、情緒不安和膽囊疾病。雷洛昔芬（一日 60 mg）被核准用於預防和治療停經後骨質疏鬆症。其係來自一類稱為選擇性動情素受體調節劑（Selective Estrogen Receptor Modulator，SERM）的藥物，該等藥物已被開發來提供動情素之有益功效而無其等之潛在缺點。雷洛昔芬增加骨骼質量並降低脊柱骨折之風險。顯示雷洛昔芬可降低髖和其他非脊柱骨折之風險的數據尚不可得。特立帕肽（一種副甲狀腺激素之形式）被核准用於在停經後女性和有高骨折風險的男性中治療骨質疏鬆症。此醫藥刺激新骨骼形成並顯著地增加骨骼礦物質密度。在停經後女性中，骨折復位在脊柱、髖、足、肋骨和腕見到。在男性，骨折復位在脊柱見到，但數據不足以評估於其他位置的骨折復位。特立帕肽係以每日注射的形式自我投予達至多 24 個月。

【0217】 於其他實施方式中，可將 ALK4:ActRIIB 異多聚體用於在動物中調整體脂肪含量和用於治療或預防與其相關的病況，且特別是與其相關的傷害健康的病況。根據本發明，調整（控制）體重可係論及減少或增加體重、降低或提高獲重速率、或提高或降低失重速率、且亦包括積極地維持、或不顯著地改變體重（例如對抗否則可增加或減少體重的外部或內部影響）。本文之揭露內容之一個實施方式係關於藉由將 ALK4:ActRIIB 異多聚體投予至需要其的動物（例如人類）來調整體重。

【0218】 於一些實施方式中，可將本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體用於在動物中降低體重及／或減少獲重，且更特別是用於在有肥胖之風險或為肥胖所苦的患者治療或改善肥胖。於另一個特殊的實施方式中，本發明係針對用於治療無法獲重或維持重量（例如患有消耗症候群的動物）的動物的方法和化合物。如此方法對於以下者係有效的：增加體重及／或質量、或降低重量及／或質量喪失、或改善與非所欲的低（例如不健康的）體重及／或質量相關或由其造成的病況。此外，可以本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體治療高膽固醇（例如高膽固醇血症或異常血脂症）之病症。

【0219】 於其他實施方式中，可將 ALK4:ActRIIB 異多聚體用於在動物中調整體脂肪含量和用於治療或預防與其相關的病況，且特別是與其相關的傷害健康的病況。根據本發明，調整（控制）體重可係論及減少或增加體重、降低或提高獲重速率、或提高或降低失重速率、且亦包括積極地維持、或不顯著地改變體重（例如對抗否則可增加或減少體重的外部或內部影響）。本文之揭露內容之一個實施方式係關於藉由將 ALK4:ActRIIB 異

多聚體投予至需要其的動物（例如人類）來調整體重。例如，於一些實施方式中，ALK4:ActRIIB 異多聚體可用於治療或預防選自以下者的病症或病況：肥胖（例如腹部肥胖）；過重；胰島素抗性；代謝症候群和其他代謝疾病或病況；脂質病症，諸如低 HDL 水平、高 LDL 水平、高脂血症、高三酸甘油酯血症或異常血脂症；脂蛋白異常；降低的三酸甘油酯；發炎（例如肝臟發炎及／或脂肪組織之發炎）、脂肪肝病；非酒精性脂肪肝病；高血糖症；葡萄糖耐受性異常（IGT）；高胰島素血症；高膽固醇（例如高 LDL 水平和高膽固醇血症）；心血管疾病，諸如心臟病，包括冠狀動脈心臟病、鬱血性心臟衰竭、中風、周邊血管病、動脈粥樣硬化；動脈硬化、和高血壓；症候群 X；血管再狹窄；神經病變；視網膜病變；神經退化性疾病；內皮功能異常、呼吸功能異常；胰臟炎；多囊性卵巢症候群；升高的尿酸水平；血色素沉積症（鐵質過多）；黑色棘皮症（皮膚上的黑斑）；或癌症（例如卵巢癌、乳癌、子宮內膜癌、和結腸癌）；或與以上疾病或病況之一或多者相關的另一種病症／病況。於一些實施方式中，使用 ALK4:ActRIIB 異多聚體治療的疾病或病況與過重（例如 $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ 的 BMI）相關或與體脂肪過多相關。

【0220】 於一個實施方式中，本文之揭露內容提供降低體重的方法，其包含將有效量的 ALK4:ActRIIB 異多聚體投予至欲降低體重或需要降低體重的對象。於一些實施方式中，該對象係過重的（例如肥胖前期）。於一些實施方式中，該對象具有 25 kg/m^2 或更高的身體質量指數（BMI）。於進一步的實施方式中，該對象具有 25 kg/m^2 至 29.9 kg/m^2 、 30 kg/m^2 至 39.9 kg/m^2 、 25 kg/m^2 至 39.9 kg/m^2 、或 25 kg/m^2 至 50 kg/m^2 的 BMI。於一些實

施方式中，該對象係肥胖的。於一些實施方式中，該對象具有 30 kg/m^2 或更高（例如 30 至 39.9 kg/m^2 或 30 kg/m^2 至 50 kg/m^2 ）的 BMI。於一些實施方式中，該對象係病態地肥胖的。於一些實施方式中，該對象具有 40 kg/m^2 或更高的 BMI。於進一步的實施方式中，該對象具有 40 kg/m^2 至 45 kg/m^2 、或 40 kg/m^2 至 50 kg/m^2 的 BMI。於一些實施方式中，該對象具有中心肥胖（例如腹部區域過度肥胖，包括腹脇胖及／或內臟胖）。於一些實施方式中，該對象具有 0.85 或更高的腰圍／臀圍比（WHR）。於一些實施方式中，該對象具有周邊肥胖（例如臀部過度肥胖）。於一些實施方式中，該對象具有第 2 型糖尿病。該 ALK4:ActRIIB 異多聚體可單獨投予或作為其他類型支持療法組合療法投予。例如，於一些實施方式中，該支持療法係節食及／或運動。

【0221】 於一個實施方式中，本文之揭露內容提供減少獲重的方法，其包含將有效量的 ALK4:ActRIIB 異多聚體投予至欲減少獲重或需要減少獲重的對象。於一些實施方式中，該對象係過重（例如肥胖前期）。於一些實施方式中，該對象具有 25 kg/m^2 或更高的 BMI。於進一步的實施方式中，該對象具有 25 kg/m^2 至 29.9 kg/m^2 、 30 kg/m^2 至 39.9 kg/m^2 、 25 kg/m^2 至 39.9 kg/m^2 、或 25 kg/m^2 至 50 kg/m^2 的 BMI。於一些實施方式中，該對象係肥胖的。於一些實施方式中，該對象具有 30 kg/m^2 或更高（例如 30 至 39.9 kg/m^2 或 30 kg/m^2 至 50 kg/m^2 ）的 BMI。於一些實施方式中，該對象係病態地肥胖的。於一些實施方式中，該對象具有 40 kg/m^2 或更高的 BMI。於進一步的實施方式中，該對象具有 40 kg/m^2 至 45 kg/m^2 、或 40 kg/m^2 至 50 kg/m^2 的 BMI。於一些實施方式中，該對象具有第 2 型糖尿病。

【0222】 亦提供者係治療或預防與體重過重相關的疾病或病況的方法，其包含將有效量的 ALK4:ActRIIB 異多聚體投予至需要治療或預防的對象。於一個實施方式中，所治療或預防的疾病或病況係肥胖。於一個實施方式中，所治療或預防的疾病或病況係胰島素抗性。於一個實施方式中，所治療或預防的疾病或病況係選自由以下者所組成之群組的成員：異常血脂症、高脂血症（總膽固醇水平 >240 mg/dL）、高膽固醇血症（例如 >200 mg/dL、 >220 mg/dL、 >240 mg/dL、 >250 mg/dL、或 >275 mg/dL 的總膽固醇水平）、低 HDL 血清水平（例如 <40 mg/dL、 <45 mg/dL、或 <50 mg/dL）、高 LDL 血清水平（例如 ≥ 100 mg/dL、 ≥ 130 mg/dL、 ≥ 160 mg/dL、或 ≥ 190 mg/dL）、和高三酸甘油脂血症（例如 ≥ 150 mg/dL、 ≥ 175 mg/dL、 ≥ 200 mg/dL、 ≥ 300 mg/dL、 ≥ 400 mg/dL、或 ≥ 499 mg/dL 的禁食 TG 水平）。於某些實例中，該 ALK4:ActRIIB 拮抗劑治療伴隨節食及／或運動。

【0223】 於另一個實施方式中，本文之揭露內容提供於過重的對象降低體重的方法。該方法包括將有效量的 ALK4:ActRIIB 異多聚體投予至過重對象。於一些實施方式中，該對象具有 25 kg/m² 或更高的身體質量指數（BMI）。於進一步的實施方式中，該對象具有 25 kg/m² 至 29.9 kg/m²、 30 kg/m² 至 39.9 kg/m²、 25 kg/m² 至 39.9 kg/m²、或 25 kg/m² 至 50 kg/m²、或 27 至 40 kg/m² 的 BMI。於一些實施方式中，該對象係肥胖的。於一些實施方式中，該對象具有 30 kg/m² 或更高（例如 30 至 39.9 kg/m² 或 30 kg/m² 至 50 kg/m²）的 BMI。該 ALK4:ActRIIB 異多聚體係單獨投予或呈組合療法投予。於一些實施方式中，該 ALK4:ActRIIB 異多聚體治療伴隨節食及／或運動。

【0224】 於一個實施方式中，本文之揭露內容提供於肥胖的對象降低

體重的方法。該方法包括將有效量的 ALK4:ActRIIB 異多聚體投予至該對象。於一些實施方式中，該對象具有 30 kg/m^2 或更高（例如 30 至 39.9 kg/m^2 或 30 kg/m^2 至 50 kg/m^2 的 BMI。於一些實施方式中，該對象具有 40 kg/m^2 或更高的 BMI。於一些實施方式中，該對象具有中心肥胖（例如腹部區域過度肥胖，包括腹脇胖及／或內臟胖）。於一些實施方式中，該對象具有 0.85 或更高的腰圍／臀圍比（WHR）。於一些實施方式中，該對象具有周邊肥胖（例如臀部過度肥胖）。於一些實施方式中，該 ALK4:ActRIIB 異多聚體治療伴隨節食及／或運動。

【0225】 於另一個實施方式中，本文之揭露內容提供治療及／或改善肥胖或與肥胖相關的疾病或病況的方法，其包含將有效量的 ALK4:ActRIIB 異多聚體投予至肥胖的對象。於一些實施方式中，該對象具有 30 kg/m^2 或更高的 BMI。於進一步的實施方式中，該對象具有 30 至 39.9 kg/m^2 或 30 kg/m^2 至 50 kg/m^2 的 BMI。於一些實施方式中，該對象係病態地肥胖的。於一些實施方式中，該對象具有 40 kg/m^2 或更高的身體 BMI。於進一步的實施方式中，該對象具有 40 kg/m^2 至 45 kg/m^2 、或 40 kg/m^2 至 50 kg/m^2 的 BMI。於一些實施方式中，該對象具有第 2 型糖尿病。於一些實施方式中，該對象具有 30 kg/m^2 或更高（例如 30 至 39.9 kg/m^2 ）的 BMI。於一些實施方式中，該對象具有至少 40 kg/m^2 的 BMI。於一些實施方式中，該對象具有中心肥胖（例如腹部區域過度肥胖，包括腹脇胖及／或內臟胖）。於一些實施方式中，該對象具有 0.85 或更高的腰圍／臀圍比（WHR）。於一些實施方式中，該對象具有周邊肥胖（例如臀部過度肥胖）。於一些實施方式中，該 ALK4:ActRIIB 異多聚體治療伴隨節食及／或運動。

【0226】 亦提供者係治療或預防與肥胖相關的疾病或病況的方法，其包含將有效量的 ALK4:ActRIIB 異多聚體投予至需要治療或預防的對象。於一個實施方式中，所治療或預防的疾病或病況係選自由以下者所組成之群組的成員：異常血脂症、高脂血症（總膽固醇水平>240 mg/dL）、高膽固醇血症（例如>200 mg/dL、>220 mg/dL、>240 mg/dL、>250 mg/dL、或>275 mg/dL 的總膽固醇水平）、低 HDL 血清水平（例如<40mg/dL、<45 mg/dL、或<50 mg/dL）、高 LDL 血清水平（例如≥ 100 mg/dL、≥ 130 mg/dL、≥ 160 mg/dL、或≥ 190 mg/dL）、和高三酸甘油脂血症（例如≥ 150 mg/dL、≥ 175 mg/dL、≥ 200 mg/dL、≥ 300 mg/dL、≥ 400 mg/dL、或≥ 499 mg/dL 的禁食 TG 水平）。於一個實施方式中，所治療或預防的疾病或病況係心血管疾病。於另外的實施方式，所治療或預防的疾病或病況係高血壓（高的血壓）、心肌梗塞、周邊動脈疾病、血管調節功能異常、動脈硬化鬱血性心臟衰竭、動脈粥樣硬化、冠狀動脈心臟病、或微血管疾病。於一個實施方式中，所治療或預防的疾病或病況係肝臟疾病。於一個實施方式中，所治療或預防的肝臟疾病或病況係 NAFLD。於一個實施方式中，該肝臟疾病係脂肪肝。於一個實施方式中，該肝臟疾病係 NASH。於另一個實施方式中，所治療或預防的疾病或病況係選自以下群組的成員：脂肪肝炎、脂肪變性、纖維化、及／或硬化。於某些實例中，該 ALK4:ActRIIB 異多聚體治療伴隨節食及／或運動。

【0227】 於另一個實施方式中，本文之揭露內容提供治療、改善、及／或預防第 2 型糖尿病或與糖尿病相關的疾病或病況的方法，其包含將有效量的異多聚體投予至具有第 2 型糖尿病的對象或有發展出第 2 型糖尿病

的風險的對象。於一些實施方式中，該對象具有 30 kg/m^2 或更高的身體質量指數 BMI（例如 30 至 39.9 kg/m^2 ）。於一些實施方式中，該對象具有至少 40 kg/m^2 的 BMI。於一些實施方式中，該對象具有中心肥胖（例如腹部區域過度肥胖，包括腹脇胖及／或內臟胖）。於一些實施方式中，該對象具有 0.85 或更高的 WHR。於一些實施方式中，該對象具有周邊肥胖（例如臀部過度肥胖）。於一些實施方式中，該 ALK4:ActRIIB 異多聚體治療伴隨節食及／或運動。

【0228】 亦提供者係治療、改善或預防與糖尿病相關的疾病或病況的方法，其包含將有效量的 ALK4:ActRIIB 異多聚體投予至具有糖尿病的對象。於一個實施方式中，所治療或預防的疾病或病況係選自由以下者所組成之群組的成員：異常血脂症、高脂血症（總膽固醇水平 $>240 \text{ mg/dL}$ ）、高膽固醇血症（例如 $>200 \text{ mg/dL}$ 、 $>220 \text{ mg/dL}$ 、 $>240 \text{ mg/dL}$ 、 $>250 \text{ mg/dL}$ 、或 $>275 \text{ mg/dL}$ 的總膽固醇水平）、低 HDL 血清水平（例如 $<40 \text{ mg/dL}$ 、 $<45 \text{ mg/dL}$ 、或 $<50 \text{ mg/dL}$ ）、高 LDL 血清水平（例如 $\geq 100 \text{ mg/dL}$ 、 $\geq 130 \text{ mg/dL}$ 、 $\geq 160 \text{ mg/dL}$ 、或 $\geq 190 \text{ mg/dL}$ ）、和高三酸甘油脂血症（例如 $\geq 150 \text{ mg/dL}$ 、 $\geq 175 \text{ mg/dL}$ 、 $\geq 200 \text{ mg/dL}$ 、 $\geq 300 \text{ mg/dL}$ 、 $\geq 400 \text{ mg/dL}$ 、或 $\geq 499 \text{ mg/dL}$ 的禁食 TG 水平）。於一個實施方式中，所治療或預防的疾病或病況係心血管疾病。於另外的實施方式，所治療或預防的疾病或病況係高血壓（高的血壓）、心肌梗塞、周邊動脈疾病、血管調節功能異常、或動脈硬化。於一個實施方式中，所治療或預防的疾病或病況係肝臟疾病。於另一個實施方式中，所治療或預防的疾病或病況係選自以下群組的成員：脂肪肝病、脂肪肝炎、脂肪變性、及／或硬化。於一個實施方式中，所治療或預防的疾病或病況

係選自由以下者所組成之群組的成員：白內障、阻塞型睡眠呼吸中止、靜脈炎、痛風、骨關節炎、膽囊疾病、和高膽固醇。於某些實例中，該 ALK4:ActRIIB 異多聚體治療伴隨節食及／或運動。

【0229】 本文之揭露內容亦提供用於在一對象中改善血液-脂質輪廓的方法，其包含將有效量的 ALK4:ActRIIB 異多聚體投予至需要如此治療的對象。於一些實施方式中，本文之揭露內容提供用於降低 LDL 膽固醇之水平或提高 HDL-膽固醇之水平的方法。於一個實施方式中，該對象具有異常血脂症。於另一個實施方式中，該對象具有升高的血清脂質（例如膽固醇（高膽固醇血症）及／或三酸甘油酯（例如高三酸甘油酯血症）。於一個實施方式中，該對象具有 ≥ 100 mg/dL、 ≥ 130 mg/dL、或 ≥ 160 mg/dL 的 LDL-C)。於一個實施方式中，該對象具有 ≥ 150 mg/dL、 ≥ 160 mg/dL、 ≥ 170 mg/dL 的 TG)。於一個實施方式中，該對象具有升高的血漿胰島素水平（高胰島素血症；例如 >20 ug/ml 的禁食胰島素水平可超過 100）。於一些實施方式中，該對象具有第 II 型糖尿病。

【0230】 根據一個實施方式，本文之揭露內容提供治療或預防代謝疾病或病症或與代謝疾病或病症相關的病況的方法，其包含將 ALK4:ActRIIB 異多聚體投予至需要其的對象。於一個實施方式中，所治療的代謝疾病、病症、或病況係高血糖症（例如於禁食狀態下或在口服葡萄糖耐受性測試期間於葡萄糖投予後 > 130 mg/dL）。於一個實施方式中，所治療的代謝疾病、病症、或病況係脂質代謝疾病、病症、或病況。於一個實施方式中，所治療的代謝疾病、病症、或病況係異常血脂症。於進一步實施方式中，該脂質代謝疾病、病症、或病況係選自以下者的成員：低 HDL 水平、高

LDL 水平、高三酸甘油酯水平、高脂血症、和脂蛋白異常。於一個實施方式中，該對象具有>200 mg/dL、>220 mg/dL、>240 mg/dL、>250 mg/dL、或>275 mg/dL 的總膽固醇水平。於一個實施方式中，該對象具有<40mg/dL、<45 mg/dL、或<50 mg/dL 的 HDL 血清水平)。於一個實施方式中，該對象具有 ≥ 100 mg/dL、 ≥ 130 mg/dL、 ≥ 160 mg/dL、或 ≥ 190 mg/dL 的 LDL 血清水平。於一個實施方式中，該對象具有 ≥ 150 mg/dL、 ≥ 175 mg/dL、 ≥ 200 mg/dL、 ≥ 300 mg/dL、 ≥ 400 mg/dL、或 ≥ 499 mg/dL 的禁食 TG 水平。於一個實施方式中，所治療的代謝疾病、病症、或病況係葡萄糖代謝疾病、病症、或病況。於進一步實施方式中，該葡萄糖代謝疾病、病症、或病況係選自以下者的成員：葡萄糖失耐、胰島素抗性、葡萄糖耐受性異常 (IGT)、空腹葡萄糖異常 (IFG)。於一個實施方式中，所治療的代謝疾病、病症、或病況係選自由以下者所組成之群組的成員：高尿酸水平、NAFLD、脂肪肝、NASH、和多囊性卵巢症候群。於一個實施方式中，所治療的對象具有高胰島素血症。於一個實施方式中，所治療的對象係肥胖的 (例如該對象具有腹部肥胖)。於另一個實施方式中，所治療的對象具有第 II 型糖尿病。

【0231】 代謝症候群係涉及一組增加心臟病之風險的病症的病況。代謝症候群之主要組份係過重、心血管參數 (血液中高的血壓、異常血脂症、高三酸甘油酯水平及／或低 HDL 水平)、動脈粥樣硬化、糖尿病、及／或胰島素抗性。具有此等組份之數者 (即代謝症候群) 的對象高度傾向患有心臟病，雖然各個組份皆係風險因子。本文之揭露內容亦提供用於治療或預防以上代謝症候群之組份之 1、2、3、或更多者的方法，其包含將治療有效量的 ALK4:ActRIIB 異多聚體投予至需要其的對象。

【0232】 另外提供者係治療、預防或改善心血管疾病或病況的方法，其包含將 ALK4:ActRIIB 異多聚體投予至需要其的對象。於一個實施方式中，所治療、預防、或改善的心血管疾病或病況係動脈粥樣硬化。於一個實施方式中，所治療、預防、或改善的心血管疾病或病況係高血壓（例如於休息狀態下 $>130/80$ mmHg 或 $>140/90$ mmHg 的血壓。於一個實施方式中，該心血管疾病係動脈粥樣硬化（冠狀動脈心臟病疾病）。

【0233】 於一個實施方式中，本文之揭露內容提供用於治療及／或改善發炎性肝臟疾病或病況的方法，其包含將 ALK4:ActRIIB 異多聚體投予至需要其的對象。於一個實施方式中，該疾病或病況係 NAFLD。於進一步實施方式中，該疾病或病況係脂肪肝。於進一步實施方式中，該疾病或病況係脂肪變性（例如非酒精性脂肪肝炎（NASH））。於進一步實施方式中，該疾病或病況係酒精性脂肪肝病。

【0234】 本文之揭露內容亦提供改善血糖控制的方法，其包含將治療有效量的 ALK4:ActRIIB 異多聚體投予至需要其的對象。於一個實施方式中，所投予的對象具有 >130 、 >135 、 >140 、 >145 、或 >150 mg/dL 的禁食血糖水平。於一個實施方式中，所投予的對象於用餐後 2 小時具有 >180 、 >185 、 >190 、 >195 、或 >200 mg/dL 的餐後血糖水平。於某些實例中，該 ALK4:ActRIIB 異多聚體治療伴隨節食及／或運動。該投予亦可降低體重或治療肥胖。於某些實例中，該對象具有第 2 型糖尿病。於某些實例中，該對象具有 27 至 40 kg/m² 的 BMI。於某些實例中，該對象具有 30 至 39.9 kg/m² 的 BMI。於某些實例中，該對象具有至少 40 的 BMI。於某些實例中，該對象係過重。於某些實例中，該對象係肥胖的。血糖控制的改善可使用所屬

技術領域中已知的技術（諸如混合性膳食測試（mixed-meal test））評估。

【0235】 本文之揭露內容亦提供用於在一對象中治療、預防或改善高血糖症或與高血糖症相關的病況的組成物和方法，其包含將有效量的 ALK4:ActRIIB 異多聚體投予至需要如此治療的對象。於一個實施方式中，所投予的對象具有>130、>135、>140、>145、或>150 mg/dL 的禁食血糖水平。於一個實施方式中，所投予的對象於用餐後 2 小時具有>180、>185、>190、>195、或>200 mg/dL 的餐後血糖水平。於一個實施方式中，該治療、預防或改善之結果係選自由以下者所組成之群組的成員：血清葡萄糖水平之降低、血清三酸甘油酯水平之降低、血清胰島素水平之降低、及／或血清非酯化脂肪酸水平之降低，相較於該對象在治療前之血清水平。於一個實施方式中，該治療、預防或改善之結果係體溫增加約 0.4°C 至 1°C，相較於該對象在治療前之體溫。於一些實施方式中，該 ALK4:ActRIIB 治療亦降低該對象之體重。

【0236】 於另一個實施方式中，本文之揭露內容提供在一對象中降低血漿胰島素水平的方法，其包含將有效量的 ALK4:ActRIIB 異多聚體投予至需要如此治療的對象。於一個實施方式中，該對象具有>130、>135、>140、>145、或>150 mg/dL 的禁食血糖水平。於一個實施方式中，該對象於用餐後 2 小時具有>180、>185、>190、>195、或>200 mg/dL 的餐後血糖水平。於一個實施方式中，該對象係過重。於一個實施方式中，該對象係肥胖的。於另一個實施方式中，該對象具有第 2 型糖尿病。

【0237】 本文之揭露內容亦提供用於在一對象中治療、預防或改善高血糖症或與高血糖症相關的病況組成物和方法，其包含將有效量的

ALK4:ActRIIB 異多聚體投予至需要如此治療的對象。於一個實施方式中，該對象具有>130、>135、>140、>145、或>150 mg/dL 的禁食血糖水平。於一個實施方式中，該對象於用餐後 2 小時具有>180、>185、>190、>195、或>200 mg/dL 的餐後血糖水平。於一個實施方式中，該治療、預防或改善之結果係選自由以下者所組成之群組的成員：血清葡萄糖水平之降低、血清三酸甘油酯水平之降低、血清胰島素水平之降低、及／或血清非酯化脂肪酸水平之降低，相較於該對象在治療前之血清水平。於一個實施方式中，該治療、預防或改善之結果係體溫增加約 0.4°C 至 1°C，相較於該對象在治療前之體溫。於一些實施方式中，該 ALK4:ActRIIB 異多聚體治療亦降低該對象之體重。

【0238】 於另一個實施方式中，本文之揭露內容提供在一對象中降低血漿胰島素水平的方法，其包含將有效量的 ALK4:ActRIIB 異多聚體投予至需要如此治療的對象。於一個實施方式中，該對象具有>130、>135、>140、>145、或>150 mg/dL 的禁食血糖水平。於一個實施方式中，該於用餐後 2 小時具有>180、>185、>190、>195、或>200 mg/dL 的餐後血糖水平。於一個實施方式中，該對象係過重。於一個實施方式中，該對象係肥胖的。於另一個實施方式中，該對象具有第 2 型糖尿病。

【0239】 於另一個實施方式中，本文之揭露內容提供在一對象中治療、預防、或改善肝臟疾病的方法，其包含將有效量的 ALK4:ActRIIB 異多聚體投予至具有肝臟疾病的對象。於一個實施方式中，該對象具有肝臟之發炎。於一個實施方式中，該對象具有 NAFLD。於一個實施方式中，該對象具有脂肪肝。於另一個實施方式中，該對象具有 NASH。於一個實施方

式中，該對象具有脂肪肝。於另一個實施方式中，該對象具有酒精性脂肪肝。於一個實施方式中，所治療、預防或改善的肝臟疾病係纖維化、結疤、硬化、或肝臟衰竭。於另一個實施方式中，所治療、預防或改善的肝臟疾病係肝癌。於一個實施方式中，該對象係過重。於另一個實施方式中，該對象係肥胖的。於另一個實施方式中，該對象具有第 2 型糖尿病。

【0240】 纖維化一般係論及膠原纖維和胞外基質兩者之過量沉積組合器官或組織中細胞數目之相對減少。雖然此過程係損傷後的天然創傷癒合之重要特徵，纖維化可在包括（例如）肺臟、腎臟、肝臟、骨骼、肌肉、和皮膚的種種組織和器官中導致病理傷害。已廣泛地研究 TGF- β 於纖維化的角色。然而，亦已指出其他 TGF- β 超家族配體與纖維化有關，包括（例如）活化素（例如活化素 A 和活化素 B）和 GDF8（Hedger 等人(2013) Cytokine and Growth Factor Reviews 24:285-295；Hardy 等人(2015) 93: 567-574；和 Cantini 等人(2008) J Sex Med 5:1607-1622）。因此，於一些實施方式中，可將本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體用於治療纖維化，特別是與纖維化相關的病症和病況。例如，ALK4:ActRIIB 異多聚體可用於治療或預防以下者之一或多者：肺纖維化、過敏性肺炎、自發性纖維化、肺結核、肺炎、囊腫性纖維化、氣喘、慢性阻塞性肺病（COPD）、肺氣腫、腎（腎臟）纖維化、腎（腎臟）衰竭、慢性腎（腎臟）疾病、骨骼纖維化、骨髓纖維化、類風濕關節炎、全身性紅斑性狼瘡、硬皮症、類肉瘤病、具有多血管炎的肉芽腫病、Peyronie 氏病、肝纖維化、Wilson 氏病、肝醣蓄積病（特別是第 III、IV、IX、和 X 型）、鐵質過多、Gaucher 氏病、Zellweger 氏症候群、非酒精性和酒精性脂肪肝炎、膽管硬化、硬化性膽管炎、

Budd-Chiari 氏症候群、與手術相關的纖維化、Crohn 氏病、Duputren 氏攣縮、縱膈纖維化、腎源性纖維化、腹膜後纖維化、心房纖維化、心肌內膜纖維化、胰纖維化和自發性肺纖維化。

【0241】 腎臟維持血液之許多特徵，包括體積、pH 平衡、電解質濃度、和血壓、以及負責毒素和廢物過濾。此等功能依賴腎臟腎元之復雜結構、血液通過腎臟之種種微血管的持續流動、和透過來自身體剩下的部分的訊號（包括內分泌激素）的腎臟之調節。腎臟功能之問題表現成直接機制（例如基因缺陷、感染、或毒素暴露）和進行性地出自如肥大和超過濾（其等本身往往係對腎臟功能的更直接刺激之結果）的長期壓力源的間接機制。由於腎臟於血液維持和廢物分泌的中心角色，與腎臟相關的疾病表現有許多種且變化大；其等可於以下者回顧：Harrison's Principles of Internal Medicine，第 18 版，McGraw Hill, N.Y.，第 13 部分，Chp 277-289。

【0242】 如於本文中描述的，ALK4:ActRIIB 異多聚體在腎臟疾病模型中具有種種的有益功效。尤其，使用 ALK4:ActRIIB 異多聚體治療在具有單側輸尿管阻塞的對象中降低腎臟組織傷害、發炎、和纖維化。此等數據指出 ALK4:ActRIIB 異多聚體可用於治療或預防腎臟疾病，特別是治療或預防種種腎臟疾病之併發症（表現），包括（例如）腎臟組織傷害、發炎、及／或纖維化。

【0243】 因此，可將本發明之方法用於種種與腎臟相關的疾病或病況。用於本文，「與腎臟相關的疾病或病況」可係論及任何影響腎臟或腎系統的疾病、病症、或病況。與腎臟相關的疾病或病況之實例包括（但不限於）慢性腎臟疾病（或衰竭）、急性腎臟疾病（或衰竭）、原發性腎臟疾病、

非糖尿病性腎臟疾病、腎小球性腎炎、間質性腎炎、糖尿病性腎臟疾病、
 糖尿病性腎病、腎小球硬化、快速進展性腎小球性腎炎、腎纖維化、Alport
 氏症候群、IDDM 腎炎、環間膜增生性腎小球性腎炎、膜增生性腎小球性
 腎炎、新月形腎小球性腎炎、腎間質纖維化、局灶性節段性腎小球硬化、
 膜性腎病、微小改變疾病、少免疫快速進展性腎小球性腎炎、IgA 腎病、多
 囊性腎臟疾病、Dent 氏病、腎半胱胺酸積蓄症、Heymann 氏腎炎、體染色
 體顯性（成人型）多囊性腎臟疾病、體染色體隱性（幼兒型）多囊性腎臟
 疾病、急性腎臟損傷、腎病症候群、腎缺血、足細胞疾病或病症、蛋白尿、
 腎小球疾病、膜性腎小球性腎炎、局灶性節段性腎小球性腎炎、子癇前症、
 子癇、腎臟病灶、膠原血管病、良性直立性（姿勢性）蛋白尿、IgM 腎病、
 膜性腎病、類肉瘤病、糖尿病、導因於藥物的腎臟傷害、Fabry 氏病、胺基
 酸尿、Fanconi 氏症候群、高血壓性腎硬化、間質性腎炎、鐮形血球貧血症、
 血紅素尿、肌球蛋白尿、華格納氏肉芽病、第 1 型肝醣蓄積病、慢性腎臟
 疾病、慢性腎衰竭、低腎小球濾過率（GFR）、腎血管硬化、狼瘡性腎炎、
 ANCA 陽性少免疫新月形腎小球性腎炎、慢性同種異體移植腎病、腎毒性、
 腎的毒性、腎臟壞死、腎臟傷害、腎小球和腎小管損傷、腎臟功能異常、
 腎炎症候群、急性腎衰竭、慢性腎衰竭、近端小管功能異常、急性腎臟移
 殖排斥、慢性腎臟移植排斥、非 IgA 環間膜增生性腎小球性腎炎、感染後
 腎小球性腎炎、以任何方式涉及腎的脈管炎、任何遺傳性腎病、任何間質
 性腎炎、腎移植失敗、腎臟癌、與其他病況（例如高血壓、糖尿病、和自
 體免疫疾病）相關的腎臟疾病、Dent 氏病、腎半胱胺酸積蓄症、Heymann
 氏腎炎、原發性腎臟疾病、塌陷性腎小球病變、密度沈積病、與冷凝球蛋

白血症相關的腎小球性腎炎、Henoch-Schonlein 二氏病、感染後腎小球性腎炎、細菌性心內膜炎、顯微多發性血管炎、Churg-Strauss 二氏症候群、抗 GBM 抗體介導性腎小球性腎炎、類澱粉變性、單株免疫球蛋白沉積病、原纖維性腎小球性腎炎、免疫觸突樣腎小球病變、缺血性腎小管損傷、給藥誘發性腎小管-間質性腎炎、毒性腎小管-間質性腎炎、感染性腎小管-間質性腎炎、細菌性腎盂腎炎、導因於多瘤病毒感染或 HIV 感染的病毒感染性腎小管-間質性腎炎、代謝誘發性腎小管-間質性疾病、混合型結締組織疾病、管型腎病、導因於尿酸鹽或草酸鹽或藥物誘發性結晶沉積的結晶性腎病、急性細胞性腎小管-間質性同種異體移植排斥、導因於淋巴瘤或移植後淋巴增生性疾病的腫瘤浸潤性疾病、腎臟之閉鎖性疾病、血管病、栓塞性微血管病、腎血管硬化、動脈硬化梗塞疾病、混合型結締組織疾病、結節性多動脈炎、鈣調磷酸酶抑制劑誘發性血管病、急性細胞性血管同種異體移植排斥、急性體液性同種異體移植排斥、早期腎功能衰退（ERFD）、末期腎病（ESRD）、腎靜脈栓塞、急性腎小管壞死、急性間質性腎炎、已建立的慢性腎臟疾病、腎動脈狹窄、缺血性腎病、尿毒症、藥物和毒素誘發性慢性腎小管間質性腎炎、反流性腎病、腎結石、Goodpasture 氏症候群、正球性正血色性貧血、腎貧血、糖尿病慢性腎臟疾病、與 IgG4 相關的疾病、von Hippel-Lindau 二氏症候群、結節性硬化、腎消耗病、腎髓質囊性病、腎細胞癌、腺癌、腎胚細胞瘤、淋巴瘤、白血病、唾液酸化不足病症、慢性環孢素腎病、腎再灌注損傷、腎發育不良、氮血症、兩側動脈阻塞、急性尿酸腎病、低血容、急性兩側阻塞性尿路病變、高血鈣性腎病、溶血性尿毒性症候群、急性尿滯留、惡性腎硬化、分娩後腎小球硬化、硬皮症、非

Goodpasture 氏抗 GBM 疾病、顯微結節性多動脈炎、過敏性肉芽腫病、急性輻射腎炎、鏈球菌後腎小球性腎炎、Waldenstrom 氏巨球蛋白血症、鎮痛劑腎病、動靜脈瘻管、動靜脈移植物、透析、腎臟異位、髓質海綿腎、腎性骨營養不良、單腎、水腎、微白蛋白尿、尿毒症、血尿、高脂血症、低白蛋白血症、脂尿症、酸中毒，高血鉀症、和水腫。

【0244】 於一些實施方式中，本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體可用於治療或預防慢性腎臟疾病，視需要與一或多種用於治療慢性腎臟疾病的支持療法組合。於一些實施方式中，本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體可用於治療或預防一或多種慢性腎臟疾病之併發症（症狀或表現），視需要與一或多種用於治療慢性腎臟疾病的支持療法組合。於一些實施方式中，本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體可用於治療或預防末期腎臟衰竭，視需要與一或多種用於治療末期腎臟疾病的支持療法組合。慢性腎臟疾病（CKD）（亦已慢性腎病為人所知）係跨越數月或數年之期間的腎功能之進行性喪失。惡化的腎臟功能之症狀可能包括感到普遍不適和經歷食慾降低。往往，慢性腎臟疾病由於篩檢已知處於腎臟問題之風險者（諸如該等具有高的血壓或糖尿病者和該等具有與 CKD 相關的血液者）而被診斷出。此疾病亦可在其導致其被辨識的併發症（諸如心血管疾病、貧血、或心包炎）之一時被鑑認出。近期的專業指引將 CKD 嚴重性分成五期，其中第 1 期係最輕微的且通常造成很少的症狀而第 5 期係嚴重的病且若未被治療會有差的預期壽命。第 5 期 CKD 往往被稱為末期腎臟疾病、末期腎病、或末期腎臟衰竭，且與目前過時的術語慢性腎衰竭或慢性腎臟衰竭大至同義；且通常意謂患者需要腎替代性治療，其可能涉及

某種形式的透析，但理想上組成腎臟移植。CKD 最初無特殊的症狀且一般僅偵測出血清肌酐或尿中蛋白質增加。隨著腎臟功能降低和種種的症狀可能如以下描述地表現。血壓可能由於液體過多和透過腎素-血管張力素系統由腎臟製造的血管活性激素之生產而升高，增加患者發展出高血壓及／或患有鬱血性心臟衰竭之風險。尿素可能堆積，導致氮血症並最終導致尿毒症（範圍從嗜睡症到心包炎和腦病的症狀）。由於其高全身性循環，尿素係於外分泌汗水以高濃度排泄且於汗水蒸發時在皮膚上結晶（「尿毒霜」）。鉀可能於血液中堆積（高血鉀症，有包括不適和潛在致命的心律不整的症狀範圍）。高血鉀症通常於腎小球濾過率降低至低於 20-25 ml/min/1.73 m² 前不發展出，於該時點腎臟排泄鉀之能力降低。CKD 中的高血鉀症可能因酸血症（其導致鉀位移至胞外）和由於缺乏胰島素而惡化。促紅血球形成素合成可能減少而導致貧血。液體體積過量症狀可能發生，其範圍在輕微的水腫至威脅生命的肺水腫。高磷酸鹽血症（導因於磷酸排泄減少）一般可能於腎小球過濾降低後發生。高磷酸鹽血症與心血管風險增加相關，其為對血管鈣化的直接刺激。低鈣血症可能表現，其一般由纖維母細胞生長因子-23 之刺激造成。骨細胞為 FGF23 之製造增加之原因，而 FGF23 係酵素 1-阿爾法-羥化酶（其造成 25-羥基膽鈣化醇被轉換成 1,25 二羥基維生素 D₃）之有力抑制劑。之後，此進展成繼發性副甲狀腺機能亢進症、腎性骨營養不良、和進一步損害心臟功能的血管鈣化。代謝性酸中毒（導因於硫酸鹽、磷酸鹽、尿酸等等之累積）可能發生和由於對酵素作用的過量的酸而造成酵素活性改變；且亦由於過量的酸（酸血症）而促進高血鉀症而增加心臟和神經元膜之興奮性。酸中毒亦導因於自近端小管之細胞產生足夠的氨之

能力之降低。鐵不足貧血（其隨著腎臟功能降低而盛行率增加）於該等需要血液透析者中特別盛行。其於原因方面係多因子的，但包括發炎增加、促紅血球形成素減少、和導致骨髓抑制的高尿酸血症。患有 CKD 者為加速的動脈粥樣硬化所苦且相較於一般人口更可能發展出心血管疾病。為 CKD 和心血管疾病所苦的患者相較於僅僅為後者所苦者傾向具有明顯較差的預後。

【0245】 用於本文，「與...組合」、「之組合」、或「共同投予」係論及任何使得另外的療法（例如第二、第三、第四、等等）於體內仍有效（例如多種化合物於該患者中同時有效，其可包括該等化合物之協同功效）的投予形式。有效性可不與該藥劑在血液、血清、或血漿中的可測量濃度相關。例如，該等不同的治療化合物可以相同的調配物或以分開的調配物相伴地或相繼地和以不同的時程投予。因此，接受如此治療的個體可受益於不同的療法之組合功效。一或多種本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體可與一或多種其他另外的藥劑或支持療法同時投予、於該藥劑或療法前投予、或於該藥劑或療法後投予。一般而言，各治療劑會以針對該特別的藥劑決定的劑量及／或時程投予。欲於一攝生法中利用的特別組合會考慮到本文之揭露內容之拮抗劑和該療法及／或所欲者之相容性。

【0246】 於一些實施方式中，若患者具有 Duchenne 氏肌肉營養不良或 Becker 氏肌肉營養不良，於本文中揭露的 ALK4:ActRIIB 異多聚體之任何者可與以下者之一或多者組合投予：eteplirsen、皮質類固醇（例如地夫可特（deflazacort））、類固醇（例如普賴蘇）、血壓及／或心臟醫藥（例如血管張力素轉化酶抑制劑、貝他阻斷劑、和利尿劑）、抗氣喘劑（例如阿布帖

醇 (albuterol))、維生素／營養物／抗氧化劑 (例如胺基酸、肉鹼、輔酶 Q10、肌酸、魚油、綠茶萃取物、維生素 E)、手術、物理治療、幹細胞療法、基因療法、輔助換氣、節食及／或運動。

【0247】 於一些實施方式中，若患者具有臉肩胛肱骨肌肉營養不良，於本文中揭露的 ALK4:ActRIIB 異多聚體之任何者可與以下者之一或多者組合投予：阿布帖醇、語言治療、手術、助行器、腰背護具、T 細胞抑制劑 (例如經截短組胺醯基-tRNA 合成酶)、幹細胞療法、基因療法、及／或足部支撐裝置。

【0248】 於一些實施方式中，若患者具有肌肉萎縮性脊髓側索硬化症，於本文中揭露的 ALK4:ActRIIB 異多聚體之任何者可與以下者之一或多者組合投予：利魯唑 (riluzole)、依達拉奉 (edaravone)、馬賽替尼 (masitinib)、抗氧化劑、物理治療、語言治療、營養支持、呼吸支持 (例如非侵入性呼吸器)、幹細胞療法、及／或基因療法。

【0249】 於一些實施方式中，若患者具有散發性包涵體肌炎，於本文中揭露的 ALK4:ActRIIB 異多聚體之任何者可與以下者之一或多者組合投予：皮質類固醇、普賴蘇、歐生隆 (oxandrolone)、胺甲喋呤、黴酚酸嗎啉乙酯 (mycophenolate mofetil)、靜脈內免疫球蛋白、貝他干擾素-1a、依那西普 (etanercept)、阿倫單抗 (alemtuzumab)、抑濾泡素、鋰、bimagrumab、arimoclomol、雷帕黴素 (rapamycin)、抗氧化劑、肉鹼、輔酶 Q10、物理治療、職能治療、幹細胞療法、及／或基因療法。

【0250】 於一些實施方式中，若患者具有 Alport 氏症候群，於本文中揭露的 ALK4:ActRIIB 異多聚體之任何者可與以下者之一或多者組合投

予：血管張力素轉化酶（ACE）抑制劑（例如貝那普利（benazepril）、西拉普利（cilazapril）、伊那拉普利（enalapril）、福辛普利（fosinopril）、賴諾普利（lisinopril）、培哚普利（perinopril）、雷米普利（ramapril）和喹那普利（quinapril））、血管張力素受體阻斷劑（例如坎地沙坦（candesartan）、依普沙坦（epresartan）、艾比沙坦（irbesartan）、洛沙坦（losartan）、替米沙坦（telmisartan）和纈沙坦（valsartan））、士他汀（例如氟伐他汀（fluvastatin））、非二氫吡啶鈣離子通道阻斷劑（例如迪太贊（diltiazem））、環孢素、及／或醛固酮抑制劑。

【0251】 於一些實施方式中，若患者具有肌肉減少症，於本文中揭露的 ALK4:ActRIIB 異多聚體之任何者可與以下者之一或多者組合投予：尿皮質素（urocortin）II、激素補充療法（例如睪固酮或人類生長激素）、肌酸、維生素 D、運動、節食、及／或肌力訓練。

5.醫藥組成物

【0252】 於某些方面，本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體可單獨投予或可呈醫藥調配物（亦被稱為治療組成物或醫藥組成物）之組份投予。醫藥調配物係論及呈現允許其中所含的活性成分（例如本文之揭露內容之藥劑）之生物活性有效的形式且不含對該調配物會被投予至其的對象而言有不可接受的毒性的另外的組份的製劑。可調配主題化合物以用於以任何用於人類或獸醫醫藥的便利的方式投予。例如，一或多種本文之揭露內容之藥劑可以醫藥上可接受的載劑調配。醫藥上可接受的載劑係論及一種醫藥調配物中除了活性成分以外的成分，其一般對於一對象而言係非

毒性的。醫藥上可接受的載劑包括（但不限於）緩衝液、賦形劑，穩定劑、及／或保存劑。一般而言，用於本文之揭露內容的醫藥調配物當投予至一對象時係呈無熱原生理上可接受的形式。除了該等於本文中描述者以外的治療上有用的藥劑（其可視需要被包括在如於以上描述的調配物中）可於本文之揭露內容之方法中與主題藥劑組合投予。

【0253】 於某些實施方式中，組成物會非經腸地投予（例如藉由靜脈內（I.V.）注射、動脈內注射、骨內注射、肌肉內注射、鞘內腔注射、皮下注射、或皮內注射）。適用於非經腸投予的醫藥組成物可包含與一或多種以下者組合的一或多種本文之揭露內容之藥劑：醫藥上可接受的無菌等張水性或非水性溶液、分散液、懸浮液或乳液、或可緊鄰使用前被復水成無菌可注射溶液或分散液的無菌粉末。可注射溶液或分散液可含有抗氧化劑、緩衝液、抑菌劑、懸浮劑、增稠劑、或使該調配物與所欲的接受者之血液等張的溶質。可用於本文之揭露內容之醫藥調配物的適合的水性和非水性載劑之實例包括水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇、聚乙二醇、等等）、植物油（例如橄欖油）、可注射有機酯（例如油酸乙酯）、和適合的其等之混合物。可（例如）藉由使用塗覆材料（例如卵磷脂）、藉由於分散液之例子中維持所需的粒徑、和藉由使用介面活性劑來維持適合的流動性。

【0254】 於一些實施方式中，本文之揭露內容之治療方法包括全身地或局部地從移植物或裝置投予該醫藥組成物。進一步，該醫藥組成物可被裝入膠囊或以用於遞送至目標組織位置（例如骨髓或肌肉）的形式注射。於某些實施方式中，本文之揭露內容之組成物可包括能夠將本文之揭露內容之藥劑之一或多者遞送至目標組織位置（例如骨髓或肌肉）、提供用於發

展組織的結構且最佳地能夠被再吸收至身體內的基質。例如，該基質可提供一或多種本文之揭露內容之藥劑之延遲釋放。如此基質可由目前用於其他移植醫學應用的材料形成。

【0255】 基質材料可之選擇可基於以下者之一或多者：生物相容性、生物可分解性、機械特性、外觀、和介面特性。主題組成物之特別應用會界定適當調配物。可用於組成物的基質可係生物可分解的和化學性界定的硫酸鈣、磷酸三鈣、羥磷灰石、聚乳酸、和聚酸酐。其他可能的材料係生物可分解的和生物上界定分明的，包括（例如）骨骼或皮膚膠原。進一步基質包含純蛋白質或胞外基質組份。其他可能的基質係非生物可分解的和化學性界定的，包括（例如）燒結羥磷灰石、生物玻璃、鋁酸鹽、或其他陶瓷。基質可包含以上提及的材料之類型之任何者之組合，包括（例如）聚乳酸和羥磷灰石或膠原和磷酸三鈣。該等生物陶瓷可於組成物中被改變（例如鋁酸-磷酸-鈣）和加工改變孔徑、粒徑、粒形、和生物可分解性之一或多者。

【0256】 於某些實施方式中，本文之揭露內容之醫藥組成物可外用地投予。「外用施用」或「外用地」意謂該醫藥組成物與身體表面（包括（例如）皮膚、傷口位置、和黏膜）之接觸。外用醫藥組成物可具有種種的施用形式且典型包含含藥物層，其適用於在外用地投予該組成物後被置於靠近該組織或直接與該組織接觸。適用於外用投予的醫藥組成物可包含組合的一或多種一或多種本文之揭露內容之 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其被調配成液體、凝膠、霜劑、洗劑、軟膏劑、泡沫劑、糊劑、油灰、半固體、或固體。呈液體、凝膠、霜劑、洗劑、軟膏劑、泡沫劑、糊劑、或油灰形式

的組成物可藉由在目標組織上塗開、噴霧、塗抹、輕拍或滾動該組成物來施用。該組成物亦可被灌入無菌敷料、跨皮膚貼劑、硬膏劑、和繃帶中。油灰、半固體或固體形式之組成物可係可變形的。其等可係彈性或非彈性的（例如易曲的或剛性的）。於某些方面，該組成物形成一複合物之部分且可包括纖維、微粒、或具有相同或不同的組成物的多層。

【0257】 呈液體形式的外用組成物可包括醫藥上可接受的溶液、乳液、微乳液、和懸浮液。除了該一或多種活性成分以外，該液體劑型可含有一般於所屬技術領域中使用的惰性稀釋劑，包括（例如）水或其他溶劑、助溶劑及／或乳化劑（例如乙醇、異丙醇、碳酸乙酯、醋酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苯甲酯、丙二醇、或 1,3-丁二醇、油（例如棉籽、花生、玉米、胚芽、橄欖、蓖麻、和芝麻油）、甘油、四氫呋喃醇、聚乙二醇、山梨糖醇酐之脂肪酸酯、和其等之混合物）。

【0258】 外用凝膠、霜劑、洗劑、軟膏劑、半固體或固體組成物可包括一或多種增稠劑，諸如多醣、合成性聚合物或基於蛋白質的聚合物。於一個本發明之實施方式中，本文之膠凝劑係適當地非毒性且賦予所欲的黏度者。該等增稠劑可包括以下者之聚合物、共聚物、和單體：乙基吡咯啉酮、甲基丙烯醯胺、丙烯醯胺 N-乙基咪唑、羧基乙基、乙烯酯、乙烯醚、聚矽氧，聚環氧乙烷、聚乙二醇、乙醇、丙烯酸鈉、丙烯酸酯、順丁烯二酸、NN-二甲基丙烯醯胺、二丙酮丙烯醯胺、丙烯醯胺、丙烯醯基嗎福林、pluronic、膠原、聚丙烯醯胺、聚丙烯酸酯、聚乙烯醇、聚伸乙烯基、聚乙烯基矽酸酯、以糖（例如蔗糖、葡萄糖、葡萄糖胺、半乳糖、海藻糖、甘露糖、或乳糖）取代的聚丙烯酸酯、醯基醯胺基丙磺酸、四甲氧

基正矽酸酯、甲基三甲氧基正矽酸酯、四烷氧基正矽酸酯、三烷氧基正矽酸酯、二醇、丙二醇、甘油、多醣、褐藻酸酯、聚葡萄糖、環糊精、纖維素、經修飾的纖維素、經氧化的纖維素、幾丁聚醣、幾丁質、瓜爾膠、鹿角菜膠、玻尿酸、菊糖、澱粉、經修飾的澱粉、瓊脂糖、甲基纖維素、植物膠、玻糖醛酸(hylaronans)、水凝膠、明膠、醣胺聚醣、羧甲基纖維素、羥乙基纖維素、羥丙基甲基纖維素、果膠、低-甲氧基果膠、交聯的聚葡萄糖、澱粉-丙烯腈接枝共聚物、澱粉聚丙烯酸鈉、羥乙基甲基丙烯酸酯、羥乙基丙烯酸酯、聚伸乙烯基、聚乙基乙烯基醚、聚甲基甲基丙烯酸酯、聚苯乙烯、聚胺甲酸酯、聚烷酸酯、聚乳酸、聚乳酸酯、聚(3-羥基丁酸酯)、磺酸化水凝膠、AMPS (2-丙烯醯胺基-2-甲基-1-丙磺酸)、SEM (磺乙基甲基丙烯酸酯)、SPM (磺丙基甲基丙烯酸酯)、SPA (磺丙基丙烯酸酯)、N,N-二甲基-N-甲基丙烯醯氧基乙基-N-(3-磺丙基)銨甜菜鹼、甲基丙烯酸醯胺丙基-二甲基銨磺基甜菜鹼、SPI (伊康酸-雙(1-丙基磺酸(sulfonizacid)-3)酯二-鉀鹽)、伊康酸、AMBC (3-丙烯醯胺基-3-甲基丁酸)、貝他-羧基乙基丙烯酸酯(丙烯酸二聚物)、和順丁烯二酸酐-甲基乙烯基醚聚合物、其等之衍生物、其等之鹽、其等之酸、和其等之組合。於某些實施方式中，本文之揭露內容之醫藥組成物可(例如)以以下者之形式口服地投予：膠囊、藥包、丸劑、錠劑、口含錠(使用經矯味基底，諸如蔗糖和阿拉伯膠或西黃蓍膠)、粉末、顆粒劑、水性或非水性液體中的溶液或懸浮液、水包油或油包水液體乳液、或酞劑或糖漿劑、或糖錠(使用惰性基底，諸如明膠和甘油、或蔗糖和阿拉伯膠)、及/或漱口水，其等各含有預先決定量的本文之揭露內容之化合物和視需要的一或多種其他活性成分。本文之揭露內容之化合物

和視需要的一或多種其他活性成分亦可以食團、舐劑、或糊劑的形式投予。

【0259】 於用於口服投予（例如膠囊、錠劑、丸劑、糖衣錠、粉末、和顆粒劑）的固體劑型中，一或多種本文之揭露內容之化合物可與一或多種以下者混合：醫藥上可接受的載劑，包括（例如）檸檬酸鈉、磷酸二鈣、填充劑或增量劑（例如澱粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇、和矽酸）、黏合劑（例如羧甲基纖維素、褐藻酸酯、明膠、聚乙基吡咯啉酮、蔗糖、和阿拉伯膠）、保濕劑（例如甘油）、崩散劑（例如瓊脂-瓊脂、碳酸鈣、馬鈴薯或樹薯澱粉、褐藻酸、矽酸鹽、和碳酸鈉）、溶液阻滯劑（例如石蠟）、吸收加速劑（例如四級銨化合物）、濕潤劑（例如鯨蠟醇和甘油單硬脂酸酯）、吸收劑（例如高嶺土和皂土）、潤滑劑（例如滑石、硬脂酸鈣、硬脂酸鎂、固體聚乙二醇、月桂基硫酸鈉）、呈色劑、和其等之混合物。於膠囊、錠劑、和丸劑之例子中，該醫藥調配物（組成物）亦可包含緩衝劑。亦可將類似類型的固體組成物用作為軟和硬填充明膠膠囊中的填充劑，其使用一或多種包括（例如）乳糖（lactose）或乳糖（milk sugar）以及高分子量聚乙二醇的賦形劑。

【0260】 用於口服投予該醫藥組成物的液體劑型可包括醫藥上可接受的乳液、微乳液、溶液、懸浮液、糖漿、和酏劑。除了該一或多種活性成分以外，該液體劑型可含有一般於所屬技術領域中使用的惰性稀釋劑，包括（例如）水或其他溶劑、助溶劑及／或乳化劑（例如乙醇、異丙醇、碳酸乙酯、醋酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苯甲酯、丙二醇、或 1,3-丁二醇、油（例如棉籽、花生、玉米、胚芽、橄欖、蓖麻、和芝麻油）、甘油、四氫呋喃醇、聚乙二醇、山梨糖醇酐之脂肪酸酯、和其等之混合物）。除了惰性稀

釋劑以外，該口服調配物亦可包括佐劑，其包括（例如）濕潤劑、乳化劑和懸浮劑、甜味劑、矯味劑、呈色劑、香化劑、保存劑、和其等之組合。

【0261】 懸浮液(除了該等活性化合物以外)可含有懸浮劑，包括(例如)乙氧基化異硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇、山梨糖醇酐酯、微晶纖維素、偏氫氧化鋁、皂土、瓊脂-瓊脂、西黃蓍膠、和其等之組合。

【0262】 預防微生物之作用及／或生長可藉由納入種種的抗細菌劑和抗真菌劑（包括（例如）對羥苯甲酸酯、氯丁醇、和酚山梨酸）來確保。

【0263】 於某些實施方式中，於該組成物中納入等張劑（包括（例如）糖或氯化鈉）可係所欲的。此外，可注射醫藥形式之延長吸收可藉由納入延遲吸收的劑（包括（例如）單硬脂酸鋁和明膠）來實現。

【0264】 咸瞭解劑量攝生法會由主治醫師在考慮種種改變本文之揭露內容之藥劑之一或多者的作用的因子後決定。於促進紅血球形成的 ALK4:ActRIIB 異多聚體之例子中，種種的因子可包括（但不限於）患者之紅血球計數、血紅素水平、所欲的目標紅血球計數、患者之年齡、患者之性別、患者之飲食、任何可促成紅血球水平降低的疾病之嚴重性、投予之時間、和其他臨床因子。將其他已知的活性劑加至最終組成物亦可影響劑量。進展可藉由定期評估紅血球水平、血紅素水平、網狀紅血球水平、和其他造血過程之指標之一或多者來監視。

【0265】 於某些實施方式中，本文之揭露內容亦提供用於活體內製造本文之揭露內容之藥劑之一或多者的基因療法。如此療法會藉由將藥劑序列導入至具有以上列出的病症之一或多者細胞或組織中來達成其治療功效。藥劑序列之遞送可（例如）藉由使用重組表現載體（諸如嵌合病毒）

或膠體分散劑系統來達成。本文之揭露內容之藥劑序列之一或多者之較佳的治療性遞送係使用靶向性脂質體。

【0266】 種種的可如於本文中教示地用於基因療法的病毒載體包括腺病毒、疱疹病毒、牛痘、或 RNA 病毒（例如反轉錄病毒）。反轉錄病毒載體可係鼠類或鳥類反轉錄病毒之衍生物。其中可插入單一外源基因的反轉錄病毒載體之實例包括（但不限於）：Moloney 鼠類白血病毒（MoMuLV）、Harvey 鼠類肉瘤病毒（HaMuSV）、鼠類乳房腫瘤病毒（MuMTV）、和 Rous 肉瘤病毒（RSV）。一些其他反轉錄病毒載體可併入多個基因。此等載體之所有者皆可傳遞或併入可篩選標記之基因以使得經轉導細胞可被鑑認和產生。可藉由接附（例如）糖、醣脂、或蛋白質來使得反轉錄病毒載體為目標專一性。較佳的靶向係藉由使用抗體實現。所屬技術領域中具有通常知識者會認知到可將特殊多核苷酸序列插入至反轉錄病毒基因組中或將其接附至病毒外套以允許含有本文之揭露內容之藥劑之一或多者的反轉錄病毒載體之目標專一性遞送。

【0267】 供選擇地，組織培養細胞可藉由習用磷酸鈣轉染直接以編碼反轉錄病毒結構基因（gag、pol、和 env）的質體轉染。此等細胞接著係以含有目標基因的載體質體轉染。所得的細胞將反轉錄病毒載體釋放至培養基中。

【0268】 另一種用於本文之揭露內容之藥劑之一或多者的靶向性遞送系統係膠體分散劑系統。膠體分散劑系統包括（例如）巨分子複合物、毫微膠囊、微球、珠粒、和基於脂質的系統，包括水包油乳液、微胞、混合微胞、和脂質體。於某些實施方式中，本文之揭露內容之較佳的膠體系

統係脂質體。脂質體係可用作為試管內和活體內遞送媒劑的人工膜泡。RNA、DNA、和完整病毒粒子可被裝入其水性內裡內和並以生物活性形式遞送至細胞 (Fraley, 等人(1981) Trends Biochem. Sci., 6:77)。使用脂質體媒劑有效率地轉殖基因的方法於所屬技術領域中係已知的 (Mannino, 等人(1988) Biotechniques, 6:682, 1988)。

【0269】 脂質體之組成物通常係磷脂類 (其可包括類固醇 (例如膽固醇)) 之組合。脂質體之物理特徵取決於 pH、離子力、和二價陽離子之存在。亦可使用其他磷脂或其他脂質, 包括 (例如) 磷脂醯化合物 (例如磷脂醯甘油、磷脂醯膽鹼、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯乙醇胺、神經鞘脂、腦苷脂、和神經節苷脂)、卵磷脂醯膽鹼、二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼、和二硬脂醯基磷脂醯膽鹼。脂質體之靶向亦可能基於 (例如) 器官專一性、細胞專一性、和胞器專一性且係所屬技術領域中已知的。

以引用方式併入

【0270】 所有於本文中提及的出版物和專利案特此以其等之完整內容以引用方式併入, 其程度如同各個個別出版物或專利案被具體地和個體地指出係以引用方式併入。

【0271】 雖然已討論標的之特殊實施方式, 以上說明書係闡明性的而非限制性的。對所屬技術領域中具有通常知識者而言, 在回顧此說明書和以下申請專利範圍後許多變化會變得很明顯。本發明之完整範圍應參照申請專利範圍 (加上其等之同等物之完整範圍) 和說明書 (加上如此變化) 來判定。

實施例

【0272】 本發明現被一般地描述，其參照以下實施例可更輕易地瞭解，該等實施例僅係為闡明本發明之某些實施方式和實施方式之目的而被納入而非意欲限制本發明。

實施例 1. ALK4:ActRIIB 異二聚體之產生

【0273】 構築包含人類 ActRIIB 和人類 ALK4 之胞外域的可溶性 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異多聚性複合物，該等胞外域各自分開地藉由連接子與 Fc 域融合，該連接子被置於該胞外域和該 Fc 域間。個別的構築體被分別稱為 ActRIIB-Fc 融合多肽和 ALK4-Fc 融合多肽且各自之序列係於以下提供。

【0274】 用於促進 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異多聚性複合物之形成的方法學（與 ActRIIB-Fc 或 ALK4-Fc 同二聚體複合物不同）係於該等 Fc 域之胺基酸序列導入改變以引導非對稱的異多聚性複合物之形成。許多不同的使用 Fc 域製作非對稱的交互作用對的方法係於本文之揭露內容中描述。

【0275】 於一個方法（於 SEQ ID NO: 39-41 和 42-44（分別的）之 ActRIIB-Fc 和 ALK4-Fc 多肽序列闡明）中，一個 Fc 域被改變以於交互作用面導入陽離子性胺基酸，而另外的 Fc 域被改變以於交互作用面導入陰離子性胺基酸。ActRIIB-Fc 融合多肽和 ALK4-Fc 融合多肽各自利用組織血纖維蛋白溶酶原活化子（TPA）前導子：MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP（SEQ ID NO: 38）。

【0276】 該 ActRIIB-Fc 多肽序列 (SEQ ID NO: 39) 係於以下顯示：

```

1   MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA
NWELERTNQS

51  GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC
YDRQECVATE

101  ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
151  PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
201  DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
KCKVSNKALP

251  APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRKEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
301  EWESNGQPEN NYKTTTPVLK SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMH

351  EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 39)

```

【0277】 其前導子 (訊號) 序列和連接子被加底線。為促進 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體而非可能的同二聚體複合物之一之形成，可將兩個胺基酸取代 (以離胺酸置換酸性胺基酸) 導入至該 ActRIIB 融合蛋白質之 Fc 域中，如於以上由雙底線指出的。SEQ ID NO: 39 之胺基酸序列可視需要地以離胺酸 (K) 被自其 C 端移除的形式提供。

【0278】 此 ActRIIB-Fc 融合蛋白質係由以下核酸序列 (SEQ ID NO: 40) 編碼：

```

1   ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC
TGTGTGGAGC

51  AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT

```

GAGACACGGG

101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC
CAACCAGAGC

151 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC
ACTGCTACGC

201 CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG
AAGGGCTGCT

251 GGCTAGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT
GGCCACTGAG

301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT
TCTGCAACGA

351 GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC
ACGTACGAGC

401 CACCCCCGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG
CCCACCGTGC

451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT
TCCCCC AAA

501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC
ACATGCGTGG

551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA
CTGGTACGTG

601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG
AGGAGCAGTA

651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG

CACCAGGACT

701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA
AGCCCTCCCA

751 GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC
CCCGAGAACC

801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGAA GGAGATGACC
AAGAACCAGG

851 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA
CATCGCCGTG

901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA
CCACGCCTCC

951 CGTGCTGAAG TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG
CTCACCGTGG

1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC
CGTGATGCAT

1051 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC
TGTCTCCGGG

1101 TAAA (SEQ ID NO: 40)

【0279】 其成熟的 ActRIIB-Fc 融合多肽 (SEQ ID NO: 41) 係如下，
且可視需要地以離胺酸 (K) 被自其 C 端移除的形式提供。

1 GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC
YASWRNSSGT

51 IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
101 GGPEVTYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS

151 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE

QYNSTYRVVS

201 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS

251 RKEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLKSDGSF

301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

(SEQ ID NO: 41)

【0280】 ALK4-Fc 融合多肽之互補形式 (SEQ ID NO: 42) 係如以下：

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGPRGV QALLCACTSC

LQANYTCETD

51 GACMVSIFNL DGMEHHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSD LRNTHCCYTD

101 YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF

151 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFENWYVDG

VEVHNAKTKP

201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVS NKALPAP

IEKTISKAKG

251 QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY

301 DTTPVLDSG GSFFLYSDLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA

LHNHYTQKSL

351 SLSPG (SEQ ID NO: 42)

【0281】 其前導序列和連接子被加底線。為引導與以上 SEQ ID NO: 39 和 41 之 ActRIIB-Fc 融合多肽形成異二聚體，可將兩個胺基酸取代（以天門冬胺酸置換離胺酸）導入至該 ALK4-Fc 融合多肽之 Fc 域中，如於以上由雙底線指出的。SEQ ID NO: 42 之胺基酸序列可視需要地以離胺酸（K）

被加至其 C 端的形式提供。

【0282】 此 ALK4-Fc 融合蛋白質係由以下核酸 (SEQ ID NO: 43) 編碼：

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC
TGTGTGGAGC
51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCCGGGCC CCGGGGGGTC
CAGGCTCTGC
101 TGTGTGCGTG CACCAGCTGC CTCCAGGCCA ACTACACGTG
TGAGACAGAT
151 GGGGCCTGCA TGGTTTCCAT TTTCAATCTG GATGGGATGG
AGCACCATGT
201 GCGCACCTGC ATCCCCAAAG TGGAGCTGGT CCCTGCCGGG
AAGCCCTTCT
251 ACTGCCTGAG CTCGGAGGAC CTGCGCAACA CCCACTGCTG
CTACACTGAC
301 TACTGCAACA GGATCGACTT GAGGGTGCCC AGTGGTCACC
TCAAGGAGCC
351 TGAGCACCCG TCCATGTGGG GCCCGGTGGA GACCGGTGGT
GGAACTCACA
401 CATGCCCACC GTGCCAGCA CCTGAACTCC TGGGGGGACC
GTCAGTCTTC
451 CTCTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC
GGACCCCTGA

501 GGTACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT
GAGGTCAAGT

551 TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA
GACAAAGCCG

601 CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG
TCCTCACCGT

651 CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC
AAGGTCTCCA

701 ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA
AGCCAAAGGG

751 CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG CCCCCATCCC
GGGAGGAGAT

801 GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC
TTCTATCCCA

851 GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA
GAACAACACTAC

901 GACACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC GGCTCCTTCT
TCCTCTATAG

951 CGACCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC
GTCTTCTCAT

1001 GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA
GAAGAGCCTC

1051 TCCCTGTCTC CGGGT (SEQ ID NO: 43)

【0283】 其成熟的 ALK4-Fc 融合蛋白質序列 (SEQ ID NO: 44) 係如

下且可視需要地以離胺酸（K）被加至其 C 端的形式提供。

1 SGPRGVQALL CACTSCLQAN YTCETDGACM VSIFNLDGME
HHVRTCIPKV

51 ELVPAGKPFY CLSSEDLRNT HCCYTDYCNR IDLRVPSGHL
KEPEHPSMWG

101 PVETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR
TPEVTCVVVD

151 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
LTVLHQDWLN

201 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR
EEMTKNQVSL

251 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYDTTP PVLDSDGSFF
LYSDLTVDKS

301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 44)

【0284】 SEQ ID NO: 41 和 SEQ ID NO: 44（分別的）之 ActRIIB-Fc 和 ALK4-Fc 蛋白質可自 CHO 細胞株共表現和純化以產生包含 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 的異多聚性複合物。

【0285】 於另一個使用非對稱的 Fc 融合蛋白質促進異多聚體複合物之形成的方法中，該等 Fc 域被改變以導入互補的疏水性交互作用和另外的分子間二硫鍵，如於 SEQ ID NO: 45-46 和 47-48（分別的）之 ActRIIB-Fc 和 ALK4-Fc 多肽序列中闡明的。該 ActRIIB-Fc 融合多肽和 ALK4-Fc 融合多肽各自利用組織血纖維蛋白溶酶原活化子（TPA）前導子：MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP（SEQ ID NO: 38）。

【0286】 該 ActRIIB-Fc 多肽序列 (SEQ ID NO: 45) 係於以下顯示：

```

1    MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA
NWELERTNQS

51   GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC
YDRQECVATE

101  ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT
GGGTHTCPPC

151  PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE
DPEVKFNWYV

201  DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
KCKVSNKALP

251  APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPCREEMT KNQVSLWCLV
KGFYPSDIAV

301  EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMH

351  EALHNHYTQK SLSLSPGK          (SEQ ID NO: 45)

```

【0287】 其前導子 (訊號) 序列和連接子被加底線。為促進該 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體而非可能的同二聚體複合物之一之形成，可將兩個胺基酸取代 (以半胱胺酸置換絲胺酸和以色胺酸置換蘇胺酸) 導入至該融合蛋白質之 Fc 域中，如於以上由雙底線指出的。SEQ ID NO: 45 之胺基酸序列可視需要地以離胺酸 (K) 被自其 C 端移除的形式提供。

【0288】 其成熟的 ActRIIB-Fc 融合多肽係如以下：

```

1    GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC

```

YASWRNSSGT

51 IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC
NERFTHLPEA

101 GGPEVTYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
PKPKDTLMIS

151 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS

201 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPC

251 REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF

301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
(SEQ ID NO: 46)

【0289】 ALK4-Fc 融合多肽之互補形式 (SEQ ID NO: 47) 係如下且
可視需要地以離胺酸 (K) 被自其 C 端移除的形式提供。

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGPRGV QALLCACTSC
LQANYTCETD

51 GACMVSIFNL DGMEHHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSD
LRNTHCCYTD

101 YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGG GTHTCPPCPA
PELLGGPSVF

151 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
VEVHNAKTKP

201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP

IEKTISKAKG

251 QPREPQVCTL PPSREEMTKN QVSLSCAVKG FYPSDIAVEW
ESNGQPENNY

301 KTTTPVLDSG GSFFLVSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA
LHNHYTQKSL

351 SLSPGK (SEQ ID NO: 47)

【0290】 其前導序列和連接子被加底線。為引導與以上 SEQ ID NO: 45 和 46 之 ActRIIB-Fc 融合多肽形成異二聚體，可將四個胺基酸取代導入至該 ALK4 融合多肽之 Fc 域中，如於以上由雙底線指出的。SEQ ID NO: 47 之胺基酸序列可視需要地以離胺酸（K）被自其 C 端移除的形式提供。

【0291】 其成熟的 ALK4-Fc 融合蛋白質序列係如以下者且可視需要地以離胺酸（K）被自其 C 端移除的形式提供。

1 SGPRGVQALL CACTSCLQAN YTCETDGACM VSIFNLDGME
HHVRTCIPKV

51 ELVPAGKPFY CLSSEDLRNT HCCYTDYCNR IDLRVPSGHL
KEPEHPSMWG

101 PVETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR
TPEVTCVVVD

151 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
LTVLHQDWLN

201 GKEYKCKVSN KALPAIEKT ISKAKGQPRE PQVCTLPPSR
EEMTKNQVSL

251 SCAVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGDSFF

LVSKLTVDKS

301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 48)

【0292】 SEQ ID NO: 46 和 SEQ ID NO: 48 (分別的) 之 ActRIIB-Fc 和 ALK4-Fc 蛋白質可自 CHO 細胞株共表現和純化以產生包含 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 的異多聚性複合物。

【0293】 種種的 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 複合物之純化可藉由包括 (例如) 任何順序的以下者之三者或更多者的一系列管柱色層分析步驟達成：蛋白質 A 色層分析法、Q sepharose 色層分析法、苯基 sepharose 色層分析法、粒徑篩色層分析法、陽離子交換色層分析法、和基於表位的親和力色層分析法 (例如使用針對 ALK4 或 ActRIIB 上的表位的抗體或功能上同等的配體)。該純化可以病毒過濾和緩衝液交換來完成。

【0294】 於另一個使用非對稱的 Fc 融合蛋白質促進異多聚體複合物之形成的方法中，該等 Fc 域被改變以導入互補的疏水性交互作用、另外的分子間二硫鍵、和在該二個 Fc 域間的靜電差異以促進基於淨分子電荷的純化，如於 SEQ ID NO: 70-73 和 74-77 (分別的) 之 ActRIIB-Fc 和 ALK4-Fc 多肽序列中闡明的。該 ActRIIB-Fc 融合多肽和 ALK4-Fc 融合多肽各自利用組織血纖維蛋白溶酶原活化子 (TPA) 前導子：MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 38)。

【0295】 該 ActRIIB-Fc 多肽序列 (SEQ ID NO: 70) 係於以下顯示：

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA
NWELERTNQS

51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC

YDRQECVATE

101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC

151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV

201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY

KCKVSNKALP

251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPCREEMT ENQVSLWCLV KGFYPSDIAV

301 EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ

GNVFSCSVMH

351 EALHNHYTQD SLSLSPG (SEQ ID NO: 70)

【0296】 其前導序列和連接子被加底線。為促進該 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體而非可能的同二聚體複合物之一之形成，可將兩個胺基酸取代（以半胱胺酸置換絲胺酸和以色胺酸置換蘇胺酸）導入至該融合蛋白質之 Fc 域中，如於以上由雙底線指出的。為促進該 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體之純化，亦可將兩個胺基酸取代（以酸性胺基酸置換離胺酸）導入至該融合蛋白質之 Fc 域中，如於以上由雙底線指出的。SEQ ID NO: 70 之胺基酸序列可視需要地以離胺酸被加至其 C 端的形式提供。

【0297】 此 ActRIIB-Fc 融合蛋白質係由以下核酸（SEQ ID NO: 71）編碼：

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC
TGTGTGGAGC

51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT
GAGACACGGG

101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC
CAACCAGAGC

151 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC
ACTGCTACGC

201 CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG
AAGGGCTGCT

251 GGCTAGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT
GGCCACTGAG

301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT
TCTGCAACGA

351 GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC
ACGTACGAGC

401 CACCCCCGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG
CCCACCGTGC

451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT
TCCCCC AAA

501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC
ACATGCGTGG

551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA
CTGGTACGTG

601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG
AGGAGCAGTA

651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG
CACCAGGACT

701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA
AGCCCTCCCA

751 GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC
CCCGAGAACC

801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATGCCGGA GGAGATGACC
GAGAACCAGG

851 TCAGCCTGTG GTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA
CATCGCCGTG

901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA
CCACGCCTCC

951 CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG
CTCACCGTGG

1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC
CGTGATGCAT

1051 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGGAC AGCCTCTCCC
TGTCTCCGGG

1101 T (SEQ ID NO: 71)

【0298】 其成熟的 ActRIIB-Fc 融合多肽係如下 (SEQ ID NO: 72) 且
可視需要地以離胺酸被加至其 C 端的形式提供。

1 GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC
YASWRNSSGT

51 IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA

101 GGPEVTYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS

151 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE

QYNSTYRVVS

201 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC
251 REEMTENQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQDSL SLS PG

(SEQ ID NO: 72)

【0299】 此 ActRIIB-Fc 融合多肽係由以下核酸 (SEQ ID NO: 73) 編碼：

1 GGGCGTGGGG AGGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA
ACGCCAACTG
51 GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC
GAAGGCGAGC
101 AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGCGCAACAG
CTCTGGCACC
151 ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA
ACTGCTACGA
201 TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG
TACTTCTGCT
251 GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATTT
GCCAGAGGCT
301 GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGCCC
CCACCGGTGG
351 TGGA ACTCAC ACATGCCCAC CGTGCCCAGC ACCTGAACTC
CTGGGGGGGAC
401 CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CAAAACCCA AGGACACCCT

CATGATCTCC

451 CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC

ACGAAGACCC

501 TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG

CATAATGCCA

551 AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG

TGTGGTCAGC

601 GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGA CTGGCTG AATGGCAAGG

AGTACAAGTG

651 CAAGGTCTCC AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA

ACCATCTCCA

701 AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACCACAGG TGTACACCCT

GCCCCCATGC

751 CGGGAGGAGA TGACCGAGAA CCAGGTCAGC CTGTGGTGCC

TGGTCAAAGG

801 CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT

GGGCAGCCGG

851 AGAACAATA CAAGACCACG CCTCCCGTGC TGGACTCCGA

CGGCTCCTTC

901 TTCCTCTATA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC

AGCAGGGGAA

951 CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC

CACTACACGC

1001 AGGACAGCCT CTCCCTGTCT CCGGGT (SEQ ID NO: 73)

【0300】 ALK4-Fc 融合多肽 (SEQ ID NO: 74) 之互補形式係如下且可視需要地以離胺酸被自其 C 端移除的形式提供。

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGPRGV QALLCACTSC
LQANYTCETD

51 GACMVSIFNL DGMEHHVRTC IPKVELVPAG KPFYCLSSED LRNTHCCYTD

101 YCNRIDLRVP SGHLKEPEHP SMWGPVETGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF

151 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
VEVHNAKTKP

201 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNNKALPAP
IEKTISKAKG

251 QPREPQVCTL PPSREEMTKN QVSLSCAVKG FYPSDIAVEW ESRGQPENNY

301 KTTTPVLDSR GSFFLVSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA
LHNHYTQKSL

351 SLSPGK (SEQ ID NO: 74)

【0301】 其前導序列和連接子被加底線。為引導與以上 SEQ ID NO: 70 和 72 之 ActRIIB-Fc 融合多肽形成異二聚體，可將四個胺基酸取代（以半胱胺酸置換酪胺酸、以絲胺酸置換蘇胺酸、以丙胺酸置換白胺酸、和以纈胺酸置換酪胺酸）導入至該 ALK4 融合多肽之 Fc 域中，如於以上由雙底線指出的。為促進該 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體之純化，亦可將兩個胺基酸取代（以精胺酸置換天門冬醯胺酸和以精胺酸置換天門冬胺酸）導入至該 ALK4-Fc 融合多肽之 Fc 域中，如於以上由雙底線指出的。SEQ ID NO: 74 之胺基酸序列可視需要地以離胺酸被自其 C 端移除的形式提供。

【0302】 此 ALK4-Fc 融合多肽係由以下核酸 (SEQ ID NO: 75) 編碼：

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC
 TGTGTGGAGC
 51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCCGGGCC CCGGGGGGTC
 CAGGCTCTGC
 101 TGTGTGCGTG CACCAGCTGC CTCCAGGCCA ACTACACGTG
 TGAGACAGAT
 151 GGGGCCTGCA TGGTTTCCAT TTTCAATCTG GATGGGATGG
 AGCACCATGT
 201 GCGCACCTGC ATCCCCAAAG TGGAGCTGGT CCCTGCCGGG
 AAGCCCTTCT
 251 ACTGCCTGAG CTCGGAGGAC CTGCGCAACA CCCACTGCTG
 CTACACTGAC
 301 TACTGCAACA GGATCGACTT GAGGGTGCCC AGTGGTCACC
 TCAAGGAGCC
 351 TGAGCACCCG TCCATGTGGG GCCCGGTGGA GACCGGTGGT
 GGAACTCACA
 401 CATGCCCACC GTGCCCAGCA CCTGAACTCC TGGGGGGACC
 GTCAGTCTTC
 451 CTCTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC
 GGACCCCTGA
 501 GGTCACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT
 GAGGTCAAGT
 551 TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA
 GACAAAGCCG

601 CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG
TCCTCACCGT

651 CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC
AAGGTCTCCA

701 ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA
AGCCAAAGGG

751 CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTGCACCCTG CCCCCATCCC
GGGAGGAGAT

801 GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGTCTGCGC CGTCAAAGGC
TTCTATCCCA

851 GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCCGCG GGCAGCCGGA
GAACAACACTAC

901 AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCCGC GGCTCCTTCT
TCCTCGTGAG

951 CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC
GTCTTCTCAT

1001 GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA
GAAGAGCCTC

1051 TCCCTGTCTC CGGGTAAA (SEQ ID NO: 75)

【0303】 其成熟的 ALK4-Fc 融合多肽序列係如以下者 (SEQ ID NO:
76) 且可視需要地以離胺酸被自其 C 端移除的形式提供。

1 SGPRGVQALL CACTSCLQAN YTCETDGACM VSIFNLDGME
HHVRTCIPKV

51 ELVPAGKPFY CLSSEDLRNT HCCYTDYCNR IDLRVPSGHL KEPEHPSMWG

101 PVETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
151 VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
LTVLHQDWLN

201 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVCTLPPSR EEMTKNQVSL
251 SCAVKGFYPS DIAVEWESRG QPENNYKTTP PVLDSRGSFF LVSKLTVDKS
301 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 76)

【0304】 此 ALK4-Fc 融合多肽係由以下核酸(SEQ ID NO: 77)編碼：

1 TCCGGGCCCC GGGGGGTCCA GGCTCTGCTG TGTGCGTGCA
CCAGCTGCCT

51 CCAGGCCAAC TACACGTGTG AGACAGATGG GGCCTGCATG
GTTTCCATTT

101 TCAATCTGGA TGGGATGGAG CACCATGTGC GCACCTGCAT
CCCCAAAGTG

151 GAGCTGGTCC CTGCCGGGAA GCCCTTCTAC TGCCTGAGCT
CGGAGGACCT

201 GCGCAACACC CACTGCTGCT AACTGACTA CTGCAACAGG
ATCGACTTGA

251 GGGTGCCCAG TGGTCACCTC AAGGAGCCTG AGCACCCGTC
CATGTGGGGC

301 CCGGTGGAGA CCGGTGGTGG AACTCACACA TGCCCACCGT
GCCCAGCACC

351 TGAACTCCTG GGGGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCCCCCA
AAACCCAAGG

401 ACACCCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT

GGTGGTGGAC

451 GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG

TGGACGGCGT

501 GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG

TACAACAGCA

551 CGTACCGTGT GGTCAGCGTC CTCACCGTCC TGCACCAGGA

CTGGCTGAAT

601 GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC

CAGCCCCCAT

651 CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA

CCACAGGTGT

701 GCACCCTGCC CCCATCCCGG GAGGAGATGA CCAAGAACCA

GGTCAGCCTG

751 TCCTGCGCCG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG

TGGAGTGGGA

801 GAGCCGCGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT

CCCGTGCTGG

851 ACTCCCGCGG CTCCTTCTTC CTCGTGAGCA AGCTCACCGT

GGACAAGAGC

901 AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC

ATGAGGCTCT

951 GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG GGTA

(SEQ ID NO: 77)

【0305】 SEQ ID NO: 72 和 SEQ ID NO: 76 (分别的) 之 ActRIIB-Fc

和 ALK4-Fc 蛋白質可自 CHO 細胞株共表現和純化以產生包含 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 的異多聚性複合物。

【0306】 種種的 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 複合物之純化可藉由包括（例如）任何順序的以下者之三者或更多者的一系列管柱色層分析步驟達成：蛋白質 A 色層分析法、Q sepharose 色層分析法、苯基 sepharose 色層分析法、粒徑篩色層分析法、陽離子交換色層分析法、基於表位的親和力色層分析法（例如使用針對 ALK4 或 ActRIIB 上的表位的抗體或功能上同等的配體）、和多元色層分析法（例如使用含有靜電配體和疏水性配體兩者的樹脂）。該純化可以病毒過濾和緩衝液交換來完成。

【0307】 於另一個使用非對稱的 Fc 融合蛋白質促進異多聚體複合物之形成的方法中，該等 Fc 域被改變以導入互補的疏水性交互作用、另外的分子間二硫鍵、和特別於 ActRIIB-Fc 多肽鏈中的組胺酸至精胺酸取代以促進基於蛋白質 A 親和力的純化，如於 SEQ ID NO: 78-81 之 ActRIIB-Fc 多肽序列和 SEQ ID NO: 47、48、82、和 83 之 ALK4-Fc 多肽序列中闡明的。該 ActRIIB-Fc 融合多肽和 ALK4-Fc 融合多肽各自利用 TPA 前導子：MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP（SEQ ID NO: 38）。

【0308】 該 ActRIIB-Fc 多肽序列（SEQ ID NO: 78）係於以下顯示：

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA
NWELERTNQS

51 GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC
YDRQECVATE

101 ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC

151 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
201 DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
KCKVSNKALP
251 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPCREEMT KNQVSLWCLV KGFYPSDIAV
301 EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMH
351 EALHNRYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 78)

【0309】 其前導序列和連接子被加底線。為促進該 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體而非可能的同二聚體複合物之一之形成，可將兩個胺基酸取代（以半胱胺酸置換絲胺酸和以色胺酸置換蘇胺酸）導入至該 ActRIIB-Fc 融合多肽之 Fc 域中，如於以上由雙底線指出的。亦可將另一個胺基酸取代（以精胺酸置換組胺酸）導入至該融合蛋白質之 Fc 域中，如於以上由雙底線指出的，以促進該 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體之純化。SEQ ID NO: 78 之胺基酸序列可視需要地以離胺酸被自其 C 端移除的形式提供。

【0310】 此 ActRIIB-Fc 融合蛋白質係由以下核酸（SEQ ID NO: 79）編碼：

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC
TGTGTGGAGC
51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT
GAGACACGGG
101 AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC
CAACCAGAGC

151 GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC
ACTGCTACGC

201 CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG
AAGGGCTGCT

251 GGCTAGATGA CTTCAACTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT
GGCCACTGAG

301 GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT
TCTGCAACGA

351 GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC
ACGTACGAGC

401 CACCCCCGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG
CCCACCGTGC

451 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT
TCCCCC AAA

501 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC
ACATGCGTGG

551 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA
CTGGTACGTG

601 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGCGGG
AGGAGCAGTA

651 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG
CACCAGGACT

701 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA
AGCCCTCCCA

751 GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC
CCCGAGAACC

801 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATGCCGGGA GGAGATGACC
AAGAACCAGG

851 TCAGCCTGTG GTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA
CATCGCCGTG

901 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA
CCACGCCTCC

951 CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG
CTCACCGTGG

1001 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC
CGTGATGCAT

1051 GAGGCTCTGC ACAACCGCTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC
TGTCTCCGGG

1101 TAAA (SEQ ID NO: 79)

【0311】 其成熟的 ActRIIB-Fc 融合多肽係如下 (SEQ ID NO: 80) 且
可視需要地以離胺酸被自其 C 端移除的形式提供。

1 GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC
YASWRNSSGT

51 IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA

101 GGPEVTYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS

151 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS

201 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC

251 REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSGDSF

301 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN RYTQKSLSLS PGK

(SEQ ID NO: 80)

【0312】 此 ActRIIB-Fc 融合多肽係由以下核酸 (SEQ ID NO: 81) 編碼：

1 GGGCGTGGGG AGGCTGAGAC ACGGGAGTGC ATCTACTACA
ACGCCAACTG

51 GGAGCTGGAG CGCACCAACC AGAGCGGCCT GGAGCGCTGC
GAAGGCGAGC

101 AGGACAAGCG GCTGCACTGC TACGCCTCCT GGCGCAACAG
CTCTGGCACC

151 ATCGAGCTCG TGAAGAAGGG CTGCTGGCTA GATGACTTCA
ACTGCTACGA

201 TAGGCAGGAG TGTGTGGCCA CTGAGGAGAA CCCCCAGGTG
TACTTCTGCT

251 GCTGTGAAGG CAACTTCTGC AACGAGCGCT TCACTCATTT
GCCAGAGGCT

301 GGGGGCCCGG AAGTCACGTA CGAGCCACCC CCGACAGCCC
CCACCGGTGG

351 TGGA ACTCAC ACATGCCCAC CGTGCCCAGC ACCTGAACTC
CTGGGGGGGAC

401 CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CAAAACCCA AGGACACCCT
CATGATCTCC

```

451   CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC
ACGAAGACCC

501   TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG
CATAATGCCA

551   AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG
TGTGGTCAGC

601   GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGACTGGCTG AATGGCAAGG
AGTACAAGTG

651   CAAGGTCTCC AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA
ACCATCTCCA

701   AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACCACAGG TGTACACCCT
GCCCCCATGC

751   CGGGAGGAGA TGACCAAGAA CCAGGTCAGC CTGTGGTGCC
TGGTCAAAGG

801   CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT
GGGCAGCCGG

851   AGAACAATA CAAGACCACG CCTCCCGTGC TGGACTCCGA
CGGCTCCTTC

901   TTCCTCTATA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC
AGCAGGGGAA

951   CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC
CGCTACACGC

1001  AGAAGAGCCT CTCCCTGTCT CCGGGTAAA      (SEQ ID NO:
81)

```

【0313】 ALK4-Fc 融合多肽之互補形式係 SEQ ID NO: 47 (於以上顯示), 其含有四個胺基酸取代以引導與 SEQ ID NO: 78 和 80 之 ActRIIB-Fc 融合多肽形成異二聚體且可視需要地以離胺酸被自其 C 端移除的形式提供。

【0314】 此 ALK4-Fc 融合多肽係由以下核酸(SEQ ID NO: 82)編碼:

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC
TGTGTGGAGC

51 AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCCGGGCC CCGGGGGGTC
CAGGCTCTGC

101 TGTGTGCGTG CACCAGCTGC CTCCAGGCCA ACTACACGTG
TGAGACAGAT

151 GGGGCCTGCA TGGTTTCCAT TTTCAATCTG GATGGGATGG
AGCACCATGT

201 GCGCACCTGC ATCCCCAAAG TGGAGCTGGT CCCTGCCGGG
AAGCCCTTCT

251 ACTGCCTGAG CTCGGAGGAC CTGCGCAACA CCCACTGCTG
CTACACTGAC

301 TACTGCAACA GGATCGACTT GAGGGTGCCC AGTGGTCACC
TCAAGGAGCC

351 TGAGCACCCG TCCATGTGGG GCCCGGTGGA GACCGGTGGT
GGAACTCACA

401 CATGCCCACC GTGCCCAGCA CCTGAACTCC TGGGGGGACC
GTCAGTCTTC

451 CTCTTCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC
GGACCCCTGA

501 GGTCACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT
GAGGTCAAGT

551 TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC ATAATGCCAA
GACAAAGCCG

601 CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT GTGGTCAGCG
TCCTCACCGT

651 CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC
AAGGTCTCCA

701 ACAAAGCCCT CCCAGCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA
AGCCAAAGGG

751 CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTGCACCCTG CCCCCATCCC
GGGAGGAGAT

801 GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGTCTGCGC CGTCAAAGGC
TTCTATCCCA

851 GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA
GAACAACCTAC

901 AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGAATCCGAC GGCTCCTTCT
TCCTCGTGAG

951 CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC
GTCTTCTCAT

1001 GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA
GAAGAGCCTC

1051 TCCCTGTCTC CGGGTAAA (SEQ ID NO: 82)

【0315】 其成熟的 ALK4-Fc 融合多肽序列係 SEQ ID NO: 48 (於以上顯示) 且可視需要地以離胺酸被自其 C 端移除的形式提供。

【0316】 此 ALK4-Fc 融合多肽係由以下核酸(SEQ ID NO: 83)編碼:

1 TCCGGGCCCC GGGGGGTCCA GGCTCTGCTG TGTGCGTGCA
CCAGCTGCCT

51 CCAGGCCAAC TACACGTGTG AGACAGATGG GGCCTGCATG
GTTTCCATTT

101 TCAATCTGGA TGGGATGGAG CACCATGTGC GCACCTGCAT
CCCCAAAGTG

151 GAGCTGGTCC CTGCCGGGAA GCCCTTCTAC TGCCTGAGCT
CGGAGGACCT

201 GCGCAACACC CACTGCTGCT AACTGACTA CTGCAACAGG
ATCGACTTGA

251 GGGTGCCCAG TGGTCACCTC AAGGAGCCTG AGCACCCGTC
CATGTGGGGC

301 CCGGTGGAGA CCGGTGGTGG AACTCACACA TGCCCACCGT
GCCCAGCACC

351 TGAACTCCTG GGGGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCCCCCA
AAACCCAAGG

401 ACACCCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT
GGTGGTGGAC

451 GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG

TGGACGGCGT

501 GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG

TACAACAGCA

551 CGTACCGTGT GGTCAGCGTC CTCACCGTCC TGCACCAGGA

CTGGCTGAAT

601 GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC

CAGCCCCCAT

651 CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA

CCACAGGTGT

701 GCACCCTGCC CCCATCCCGG GAGGAGATGA CCAAGAACCA

GGTCAGCCTG

751 TCCTGCGCCG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG

TGGAGTGGGA

801 GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT

CCCGTGCTGG

851 ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCGTGAGCA AGCTCACCGT

GGACAAGAGC

901 AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC

ATGAGGCTCT

951 GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG GGTA

(SEQ ID NO: 83)

【0317】 SEQ ID NO: 80 和 SEQ ID NO: 48 (分別的) 之 ActRIIB-Fc 和 ALK4-Fc 蛋白質可自 CHO 細胞株共表現和純化以產生包含 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 的異多聚性複合物。

【0318】 種種的 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 複合物之純化可藉由包括（例如）任何順序的以下者之三者或更多者的一系列管柱色層分析步驟達成：蛋白質 A 色層分析法、Q sepharose 色層分析法、苯基 sepharose 色層分析法、粒徑篩色層分析法和基於表位的親和力色層分析法（例如使用針對 ALK4 或 ActRIIB 上的表位的抗體或功能上同等的配體）、和多元色層分析法（例如使用含有靜電配體和疏水性配體兩者的樹脂）。該純化可以病毒過濾和緩衝液交換來完成。

實施例 2. ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體相較於 ActRIIB-Fc 同二聚體和 ALK4-Fc 同二聚體的配體結合輪廓

【0319】 使用基於 Biacore™ 的結合分析以比較以上描述的 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體複合物之配體結合選擇性與 ActRIIB-Fc 和 ALK4-Fc 同二聚體複合物之配體結合選擇性。該 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體、ActRIIB-Fc 同二聚體、和 ALK4-Fc 同二聚體係使用抗 Fc 抗體獨立地捕捉至該系統上。注射配體並允許其在被捕捉的受體蛋白質上流動。結果係於以下表格總結，其中對有效的配體阱最有指示性的配體解離速率(k_d)係以灰底表示。

:

| ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體相較於 ActRIIB-Fc 同二聚體和 ALK4-Fc 同二聚體的結合輪廓 | | | | | | | | | |
|---|----------------------|----------------------|--------------------|----------------------|----------------------|--------------------|----------------------------|----------------------|--------------------|
| 配體 | ActRIIB-Fc 同二聚體 | | | ALK4-Fc 同二聚體 | | | ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體 | | |
| | k_a (1/Ms)) | k_d (1/s)) | K_D (pM)) | k_a (1/Ms)) | k_d (1/s)) | K_D (pM)) | k_a (1/Ms)) | k_d (1/s)) | K_D (pM)) |
| 活化素 A | 1.2×10^7 | 2.3×10^{-4} | 19 | 5.8×10^5 | 1.2×10^{-2} | 20000 | 1.3×10^7 | 1.5×10^{-4} | 12 |
| 活化素 B | 5.1×10^6 | 1.0×10^{-4} | 20 | 無結合 | | | 7.1×10^6 | 4.0×10^{-5} | 6 |
| BMP6 | 3.2×10^7 | 6.8×10^{-3} | 190 | --- | | | 2.0×10^6 | 5.5×10^{-3} | 2700 |
| BMP9 | 1.4×10^7 | 1.1×10^{-3} | 77 | --- | | | 暫時* | | 3400 |
| BMP10 | 2.3×10^7 | 2.6×10^{-4} | 11 | --- | | | 5.6×10^7 | 4.1×10^{-3} | 74 |
| GDF3 | 1.4×10^6 | 2.2×10^{-3} | 1500 | --- | | | 3.4×10^6 | 1.7×10^{-2} | 4900 |
| GDF8 | 8.3×10^5 | 2.3×10^{-4} | 280 | 1.3×10^5 | 1.9×10^{-3} | 15000† | 3.9×10^5 | 2.1×10^{-4} | 550 |
| GDF11 | 5.0×10^7 | 1.1×10^{-4} | 2 | 5.0×10^6 | 4.8×10^{-3} | 270† | 3.8×10^7 | 1.1×10^{-4} | 3 |
| * 由於交互作用之暫時性質而不確定 | | | | | | | | | |
| † 極低的訊號 | | | | | | | | | |
| --- 未測試 | | | | | | | | | |

【0320】 此等比較性結合數據顯示 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體相較於 ActRIIB-Fc 或 ALK4-Fc 同二聚體具有改變的結合輪廓／選擇性。

ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體相較於任一同二聚體顯示增強的與活化素 B 的結合，保留如於使用 ActRIIB-Fc 同二聚體時觀察到的強力的與活化素 A、GDF8、和 GDF11 的結合，並展現實質上減少的與 BMP9、BMP10、和 GDF3 的結合。尤其，BMP9 顯示低或無法觀察到的對於 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體的親和力，然而此配體與 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體強力地結合。與 ActRIIB-Fc 同二聚體類似，該異二聚體保留中間水平的與 BMP6 的結合。參見圖 4。

【0321】 此外，使用 A-204 報導基因分析以評估 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體和 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 同二聚體對於透過活化素 A、活化素 B、GDF11、GDF8、BMP10、和 BMP9 的傳訊的功效。細胞株：人類橫紋肌肉瘤(源自肌肉)。報導載體：pGL3(CAGA)12(如於 Dennler 等人，1998, EMBO 17: 3091-3100 中描述的)。CAGA12 模體係於 TGF-β 反應性基因 (PAI-1 基因) 中存在，故此載體通用於透過 Smad2 和 3 傳訊的因子。例示性 A-204 報導基因分析係於以下概述。

【0322】 第 1 日：將 A-204 細胞分至 48 槽孔盤中。

【0323】 第 2 日：以 10 ug pGL3(CAGA)12 或 pGL3(CAGA)12(10 ug) +pRLCMV (1 ug) 和 Eugene 轉染 A-204 細胞。

【0324】 第 3 日：添加因子（稀釋至培養基+0.1% BSA 中）。於加至細胞前，需將抑制劑以因子預培養約一 hr。約六 hr 後，以 PBS 潤洗細胞並接著溶胞。

【0325】 於以上步驟後，申請人執行螢光素酶分析。

【0326】 該 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體和 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc

同二聚體於此分析中皆被測定為活化素 A、活化素 B、GDF11、和 GDF8 之有力的抑制劑。尤其，如可見於圖 7 中圖解的比較性同二聚體／異二聚體 IC₅₀ 數據，ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體與該 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 同二聚體類似地抑制活化素 A、活化素 B、GDF8、和 GDF11 傳訊途徑。然而，BMP9 和 BMP10 傳訊途徑之 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體抑制相較於該 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 同二聚體顯著地減少。此數據與以上討論的結合數據一致，該結合數據中觀察到該 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體和 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 同二聚體兩者皆顯示強力的與活化素 A、活化素 B、GDF8、和 GDF11 的結合，但 BMP10 和 BMP9 對於該 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體相較於該 ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc 同二聚體具有顯著地降低的親和力。

【0327】 一起，此等數據因此顯示 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體相較於 ActRIIB-Fc 同二聚體係活化素 B、活化素 A、GDF8、和 GDF11 之更具選擇性的拮抗劑。因此，於某些如此選擇性拮抗作用係有利的應用中，ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體相較於 ActRIIB-Fc 同二聚體會更有用。實例包括其中保留活化素 A、活化素 B、活化素 AB、GDF8、和 GDF11 之一或多者之拮抗作用但最小化 BMP9、BMP10、GDF3、和 BMP6 之一或多者之拮抗作用係所欲的治療應用。

實施例 3. ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體在小鼠中相較於 ActRIIB-Fc 同二聚體的活性輪廓

【0328】 在小鼠中測試同二聚體複合物和異二聚體複合物以調查其

等之活體內活性輪廓之差異。於大約 10 週齡開始以 ActRIIB-Fc 同二聚體(10 mg/kg)、 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體 (3 或 10 mg/kg)、或媒劑 (磷酸鹽緩衝食鹽水，PBS) 皮下給藥野生型 C57BL/6 小鼠每週兩次共 4 週 (n = 9 小鼠每組)。ALK4-Fc 同二聚體未於活體內測試，而此係由於其於無細胞條件下無法以高親和力結合配體，如由表面電漿子共振測定的。研究終點包括：體重；於基線和研究完成 (4 週) 時由核磁共振 (NMR) 測定的總瘦質量和總脂肪質量；於基線和 4 週時由雙能 x 射線吸光測定法 (DEXA) 測定的總骨骼礦物質密度；和於 4 週測定的腓腸肌、股直肌、和胸肌之重量。

| ActRIIB-Fc 和 ALK4-Fc 複合物在野生型小鼠中的活性 | | | | |
|---|-------|--------------------------------|----------------------------|-----------|
| 終點 (4 wk) | 媒劑 | ActRIIB-Fc 同二聚體 10 mg/kg | ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體 | |
| | | | 10 mg/kg | 3 mg/kg |
| 離開基線的體重之 改變 | ↑ 15% | ↑ 38% ** | ↑ 41% ** | ↑ 33% ** |
| 離開基線的總瘦質 量之改變 | ↓ 1% | ↑ 5% ** | ↑ 5% ** | ↑ 5% ** |
| 離開基線的總脂肪 質量之改變 | ↑ 5% | ↓ 3.6% ** | ↓ 3.5% ** | ↓ 3.5% ** |
| 離開基線的總骨骼 礦物質密度之改變 | ↑ 8% | ↑ 14% * | ↑ 12% * | ↑ 11% |
| 腓腸肌重量† | 23 | 36 ** | 35 ** | 30 ** |
| 股肌重量† | 11.5 | 17 ** | 16 ** | 14 ** |
| 胸肌重量† | 15 | 23 ** | 28 ** | 23 ** |
| *P < 0.05 vs. 媒劑 | | | | |
| **P < 0.01 vs. 媒劑 | | | | |
| †組合的左和右肌肉重量，其等係針對股骨長度作標準化 (mg/mm) 以針對體型大小作對照 | | | | |

【0329】 研究結果係於以上表格總結。如所預期的，ActRIIB-Fc 同二

聚體造成身體組成之明顯改變，許多與 GDF8 和活化素抑制之已知功效一致。使用 ActRIIB-Fc 同二聚體的野生型小鼠之治療相較於以媒劑治療的對照組在研究之過程中超過加倍的體重增加。伴隨此淨獲重者係總瘦質量和總骨骼礦物質密度之顯著增加、以及總脂肪質量之顯著減少（相較於媒劑）。應認知到瘦組織和脂肪組織之經標準化（基於百分比的）改變在其等與絕對改變之對應方面不同，而此係因為瘦質量（在小鼠中典型為體重之約 70%）遠大於脂肪質量（典型為體重之約 10%）。所檢查的個別骨骼肌（包括腓腸肌、股肌、和胸肌）之重量在使用 ActRIIB-Fc 同二聚體的治療之過程中相較於媒劑對照組皆顯著地增加。

【0330】 該 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體產生某些與該 ActRIIB-Fc 同二聚體之功效極度類似的功效，儘管此兩種複合物之配體選擇性不同。如於以上表格中顯示的，對於所有列終點，使用 10 mg/kg 的劑量水平的該 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體的小鼠之治療與相同劑量水平的 ActRIIB-Fc 同二聚體之功效匹敵、幾乎與其等匹敵、或超過其等。對於數個終點，3 mg/kg 的該 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體之功效相較於 10 mg/kg 輕微減弱，因此提供劑量-功效關係之跡象（證據）。

【0331】 因此，ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體對骨骼肌和骨骼發揮有益的合成代謝功效且對脂肪的組織發揮有益的分解代謝功效，其等與 ActRIIB-Fc 同二聚體之功效非常類似。然而，與 ActRIIB 同二聚體不同，ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體僅展現對 BMP9 和 BMP10 的低親和力或與 BMP9 和 BMP10 的暫時結合且因此應對由該等配體介導的程序（諸如血管生成）具有極小至無的同時抑制。此新穎的選擇性（例如）於治療需要肌

肉和骨骼的刺激性功效和對脂肪的抑制性功效但不需要改變的血管生成的患者中會係有用的。

實施例 4. ALK4:ActRIIB 異多聚體治療抑制腎臟纖維化和發炎並減少腎臟損傷。

【0332】 在小鼠單側輸尿管阻塞模型中評估實施例 2 中描述的 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體對腎臟疾病的功效。參見（例如）Klahr 和 Morrissey (2002) *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F861-F875。

【0333】 二十四隻 12 週齡的 C57BL/6 雄性小鼠經歷於腎臟之下極之水平面的左側單側輸尿管結紮兩次。於第 3 日，使八隻小鼠安樂死並自個別的動物收穫腎臟以評估腎臟損傷。將剩下的小鼠隨機分成兩組：i)八隻小鼠於手術後第 3 日、第 7 日、第 10 日、和第 14 日被皮下注射 10mg/kg 的劑量的該 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體且 ii)八隻小鼠於手術後第 3 日、第 7 日、第 10 日、和第 14 日被皮下注射媒劑對照組（磷酸緩衝食鹽水(PBS)）。兩組皆於第 17 日根據相關的動物照料指南犧牲。收集來自個別動物之 UUO 腎臟和對側的腎臟兩者的半腎以用於組織學分析（H&E、和 Masson's Trichrome 染色），並將和 1/4 腎臟用於 RNA 萃取（RNeasy Midi Kit, Qiagen, IL）。

【0334】 執行針對 UUO 腎臟樣本的基因表現分析以評估種種基因之水平。在 CFX Connect™ 即時 PCR 偵測系統(Bio-Rad, CA)上執行 QRT-PCR 以評估種種纖維變性基因（Colla1、纖維接合素、PAI-1、CTGF、和 α -SMA）、發炎基因（TNF α 、和 MCP1）、細胞介素（TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3、和活

化素 A)、和腎臟損傷基因 (NGAL 之表現。參見圖 8。使用 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體的小鼠之治療顯著地抑制纖維變性和發炎基因之表現、抑制 TGF β 1/2/3 之上調並減少腎臟損傷。組織學數據確認了 ALK4-Fc:ActRIIB-Fc 異二聚體治療在該 UUO 模型中顯著地抑制腎臟纖維化並減少腎臟損傷。

【0335】 一起，此等數據顯示 ALK4:ActRIIB 異多聚體治療抑制腎臟纖維化和發炎並減少腎臟損傷。此外，此等數據指出其他 ALK4:ActRIIB 拮抗劑可用於治療或預防腎臟疾病，包括 (例如) ALK4 及／或 ActRIIB 結合性配體之拮抗劑、ALK4 及／或 ActRIIB 受體之拮抗劑、ALK4 及／或 ActRIIB 下游傳訊介質 (例如 Smad) 之拮抗劑、和與 ALK4 及／或 ActRIIB 相關的 TGF β 超家族共受體之拮抗劑。

【符號說明】

無

發明摘要

【發明名稱】

ALK4:ACTRIIB 異多聚體及其用途

ALK4:ACTRIIB HETEROMULTIMERS AND USES THEREOF

【中文】

於某些方面，本文之揭露內容提供包含 ALK4 受體之胞外域和 ActRIIB 之胞外域的可溶性異多聚性多肽複合物。於某些方面，如此可溶性 ALK4:ActRIIB 複合物可用於調節（促進或抑制）組織或細胞（包括（例如）肌肉、骨骼、軟骨、脂肪、神經組織、腫瘤、及／或癌細胞）之生長。於某些方面，如此 ALK4:ActRIIB 複合物可用於改善肌肉形成、骨骼形成、代謝參數、和與此等組織、細胞網路、腎臟、及內分泌系統相關的病症。

【英文】

In certain aspects, the disclosure provides soluble heteromeric polypeptide complexes comprising an extracellular domain of an ALK4 receptor and an extracellular domain of ActRIIB. In certain aspects, such soluble ALK4:ActRIIB complexes may be used to regulate (promote or inhibit) growth of tissues or cells including, for example, muscle, bone, cartilage, fat, neural tissue, tumors, and/or cancerous cells. In certain aspects, such ALK4:ActRIIB complexes are can be used to improve muscle formation, bone formation, metabolic parameters, and disorders associated with these tissues, cellular networks, kidney, and endocrine systems.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

申請專利範圍

1.一種重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含一或多個改變該 ALK4-Fc 融合蛋白質之等電點（pI）的胺基酸修飾及／或其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含一或多個改變該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾。

2.根據申請專利範圍第 1 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中：

- a)該一或多個 ALK4-Fc 融合蛋白質中的胺基酸修飾使得該 ALK4-Fc 融合蛋白質和該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質間有增加的 pI 差異；
- b)該一或多個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質中的胺基酸修飾使得該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質和該 ALK4-Fc 融合蛋白質間有增加的 pI 差異；或
- c)該一或多個 ALK4-Fc 融合蛋白質中的胺基酸修飾使得該 ALK4-Fc 融合蛋白質和該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質間有增加的 pI 差異，且該一或多個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質中的胺基酸修飾使得該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質和該 ALK4-Fc 融合蛋白質間有增加的 pI 差異。

3.根據申請專利範圍第 2 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中：

- a)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含一或多個提高該 ALK4-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾；和
- b)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含一或多個降低該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾。

4.根據申請專利範圍第 1-3 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域是 IgG1 Fc 域，且其中該 IgG1 Fc 域包含一

或多個改變該 ALK4-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾。

5.根據申請專利範圍第 4 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。

6.根據申請專利範圍第 5 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 N162 的位置的胺基酸取代；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 D179 的位置的胺基酸取代；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 N162 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 D179 的位置的胺基酸取代。

7.根據申請專利範圍第 6 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 N162 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (N162R、N162K、或 N162H)；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 D179 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D179R、D179K、或 D179H)；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 N162 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (N162R、N162K、或 N162H) 和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 D179 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D179R、D179K、或 D179H)。

8.根據申請專利範圍第 7 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 N162 的位置的精胺酸取代 (N162R)；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 D179 的位置的精胺酸取代 (D179R)；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 N162 的位置的精胺酸取代 (N162R) 和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 D179 的位置的精胺酸取代 (D179R)。

9.根據申請專利範圍第 1-3 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域是 IgG2 Fc 域，且其中該 IgG2 Fc 域包含一或多個改變該 ALK4-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾。

10.根據申請專利範圍第 9 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 32 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。

11.根據申請專利範圍第 10 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 N160 的位置的胺基酸取代；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 D177 的位置的胺基酸取代；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 N160 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 D177 的位置的胺基酸取代。

12.根據申請專利範圍第 11 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 N160 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (N160R、N160K、或 N160H)；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 D177 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸

取代 (D177R、D177K、或 D177H)；和

c)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 N160 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (N160R、N160K、或 N160H) 和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 D177 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D177R、D177K、或 D177H)。

13.根據申請專利範圍第 1-3 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域是 IgG3 Fc 域，且其中該 IgG3 Fc 域包含一或多個改變該 ALK4-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾。

14.根據申請專利範圍第 13 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 33 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。

15.根據申請專利範圍第 14 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG3Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 S169 的位置的胺基酸取代；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 D186 的位置的胺基酸取代；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 S169 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 D186 的位置的胺基酸取代。

16.根據申請專利範圍第 15 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 S169 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (S169R、S169K、或 S169H)；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 D186 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸

取代 (D186R、D186K、或 D186H)；和

c)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 S169 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (S169R、S169K、或 S169H) 和位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 D186 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D186R、D186K、或 D186H)。

17.根據申請專利範圍第 1-3 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域是 IgG4 Fc 域，且其中該 IgG4 Fc 域包含一或多個改變該 ALK4-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾。

18.根據申請專利範圍第 17 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。

19.根據申請專利範圍第 18 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 N166 的位置的胺基酸取代；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 D183 的位置的胺基酸取代；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 N166 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 D183 的位置的胺基酸取代。

20.根據申請專利範圍第 19 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 N166 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (N166R、N166K、或 N166H)；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 D183 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸

取代 (D183R、D183K、或 D183H)；和

c)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 N166 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (N166R、N166K、或 N166H) 和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 D183 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D183R、D183K、或 D183H)。

21.根據申請專利範圍第 3 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中：

a)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含以一或多個帶正電的胺基酸 (例如精胺酸 (R)、離胺酸 (K)、或組胺酸 (H)) 取代一或多個電中性或帶負電的胺基酸；和

b)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含以一或多個帶負電的胺基酸 (例如天門冬胺酸 (E) 或麩胺酸 (D)) 取代一或多個電中性或帶正電的胺基酸。

22.根據申請專利範圍第 1-21 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域是 IgG1 Fc 域，且其中該 IgG1 Fc 域包含一或多個改變該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾。

23.根據申請專利範圍第 22 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。

24.根據申請專利範圍第 23 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

a)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K138 的位置的胺基酸取代；

b)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K217 的位置的胺基酸取代；和

c)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K138 的位置的胺基酸取代和位於對應於

SEQ ID NO: 31 之 K217 的位置的胺基酸取代。

25.根據申請專利範圍第 24 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K138 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K138E 或 K138D)；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K217 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K217E 或 K217D)；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K138 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K138E 或 K138D) 和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K217 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K217E 或 K217D)。

26.根據申請專利範圍第 25 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K138 的位置的麩胺酸取代 (K138E)；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K217 的位置的天門冬胺酸取代 (K217D)；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K138 的位置的麩胺酸取代 (K138E) 和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K217 的位置的天門冬胺酸取代 (K217D)。

27.根據申請專利範圍第 1-21 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域是 IgG2 Fc 域，且其中該 IgG2 Fc 域包含一或多個改變該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾。

28.根據申請專利範圍第 27 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 32 之胺基酸序列至少

75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。

29.根據申請專利範圍第 28 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG2 融合 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 K136 的位置的胺基酸取代；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 K215 的位置的胺基酸取代；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 K136 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 K215 的位置的胺基酸取代。

30.根據申請專利範圍第 29 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 K136 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K136E 或 K136D)；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 K215 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K215E 或 K215D)；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 K136 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K136E 或 K136D) 和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 K215 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K215E 或 K215D)。

31.根據申請專利範圍第 1-21 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域是 IgG3 Fc 域，且其中該 IgG3 Fc 域包含一或多個改變該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾。

32.根據申請專利範圍第 31 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該

ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 33 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。

33.根據申請專利範圍第 32 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG3 融合 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K145 的位置的胺基酸取代；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K224 的位置的胺基酸取代；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K145 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K224 的位置的胺基酸取代。

34.根據申請專利範圍第 33 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該經修飾的 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K145 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K145E 或 K145D)；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K224 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K224E 或 K224D)；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K145 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K145E 或 K145D) 和位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K224 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K224E 或 K224D)。

35.根據申請專利範圍第 1-21 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域是 IgG4 Fc 域，且其中該 IgG4 Fc

域包含一或多個改變該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾。

36.根據申請專利範圍第 35 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。

37.根據申請專利範圍第 36 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG4 融合 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K142 的位置的胺基酸取代；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K221 的位置的胺基酸取代；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K142 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K221 的位置的胺基酸取代。

38.根據申請專利範圍第 37 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K142 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K142E 或 K142D)；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K221 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K221E 或 K221D)；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K142 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K142E 或 K142D) 和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K221 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K221E 或 K221D)。

39.根據申請專利範圍第 2 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中：

a)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含一或多個提高該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾；和

b)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含一或多個降低該 ALK4-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾。

40.根據申請專利範圍第 39 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中：

a)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含以一或多個帶正電的胺基酸（例如精胺酸（R）、離胺酸（K）、或組胺酸（H））取代一或多個電中性或帶負電的胺基酸；和

b)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含以一或多個帶負電的胺基酸（例如天門冬胺酸（E）或麩胺酸（D））取代一或多個電中性或帶正電的胺基酸。

41.根據申請專利範圍第 39 或 40 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域是 IgG1 Fc 域，且其中該 IgG1 Fc 域包含一或多個改變該 ALK4-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾。

42.根據申請專利範圍第 41 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。

43.根據申請專利範圍第 42 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

a)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 N162 的位置的胺基酸取代；

b)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 D179 的位置的胺基酸取代；和

c)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 N162 的位置的胺基酸取代和位於對應於

SEQ ID NO: 31 之 D179 的位置的胺基酸取代。

44.根據申請專利範圍第 43 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

a)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 N162 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (N162R、N162K、或 N162H)；

b)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 D179 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D179R、D179K、或 D179H)；和

c)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 N162 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (N162R、N162K、或 N162H) 和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 D179 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D179R、D179K、或 D179H)。

45.根據申請專利範圍第 44 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

a)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 N162 的位置的精胺酸取代 (N162R)；

b)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 D179 的位置的精胺酸取代 (D179R)；和

c)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 N162 的位置的精胺酸取代 (N162R) 和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 D179 的位置的精胺酸取代 (D179R)。

46.根據申請專利範圍第 39 或 40 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域是 IgG2 Fc 域，且其中該 IgG2 Fc 域包含一或多個改變該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾。

47.根據申請專利範圍第 46 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 32 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。

48.根據申請專利範圍第 47 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 N160 的位置的胺基酸取代；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 D177 的位置的胺基酸取代；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 N160 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 D177 的位置的胺基酸取代。

49.根據申請專利範圍第 48 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 N160 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (N160R、N160K、或 N160H)；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 D177 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D177R、D177K、或 D177H)；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 N160 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (N160R、N160K、或 N160H) 和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 D177 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D177R、D177K、或 D177H)。

50.根據申請專利範圍第 39 或 40 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域是 IgG3 Fc 域，且其中該 IgG3 Fc 域包含一或多個改變該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾。

51.根據申請專利範圍第 50 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 33 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。

52.根據申請專利範圍第 51 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 S169 的位置的胺基酸取代；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 D186 的位置的胺基酸取代；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 S169 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 D186 的位置的胺基酸取代。

53.根據申請專利範圍第 52 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該經修飾的 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 S169 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (S169R、S169K、或 S169H)；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 D186 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D186R、D186K、或 D186H)；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 S169 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (S169R、S169K、或 S169H) 和位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 D186 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D186R、D186K、或 D186H)。

54.根據申請專利範圍第 39 或 40 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 Fc 域是 IgG4 Fc 域，且其中該 IgG4 Fc 域包含一或多個改變該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾。

55.根據申請專利範圍第 54 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列至少

75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。

56.根據申請專利範圍第 55 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 N166 的位置的胺基酸取代；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 D183 的位置的胺基酸取代；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 N166 的位置的胺基酸取代和位於 SEQ ID NO: 35 之位置 D183 的胺基酸取代。

57.根據申請專利範圍第 56 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 N166 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (N166R、N166K、或 N166H)；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 D183 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D183R、D183K、或 D183H)；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 N166 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (N166R、N166K、或 N166H) 和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 D183 的位置的精胺酸、離胺酸、或組胺酸取代 (D183R、D183K、或 D183H)。

58.根據申請專利範圍第 2 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該一或多個 ALK4-Fc 融合蛋白質中的胺基酸修飾降低該 ALK4-Fc 融合蛋白質之 pI。

59.根據申請專利範圍第 2 或 39-40 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域是 IgG1 Fc 域，且其中該 IgG1 Fc 域包含一或

多個改變該 ALK4-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾。

60.根據申請專利範圍第 59 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。

61.根據申請專利範圍第 59 或 60 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG1 融合 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K138 的位置的胺基酸取代；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K217 的位置的胺基酸取代；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K138 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K217 的位置的胺基酸取代。

62.根據申請專利範圍第 61 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K138 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K138E 或 K138D)；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K217 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K217E 或 K217D)；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K138 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K138E 或 K138D) 和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K217 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K217E 或 K217D)。

63.根據申請專利範圍第 62 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該

ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K138 的位置的麩胺酸取代 (K138E)；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K217 的位置的天門冬胺酸取代 (K217D)；
- 和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K138 的位置的麩胺酸取代 (K138E) 和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 K217 的位置的天門冬胺酸取代 (K217D)。

64.根據申請專利範圍第 2 或 39-40 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域是 IgG2 Fc 域，且其中該 IgG2 Fc 域包含一或多個改變該 ALK4-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾。

65.根據申請專利範圍第 64 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 32 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。

66.根據申請專利範圍第 64 或 65 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG2 融合 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 K136 的位置的胺基酸取代；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 K215 的位置的胺基酸取代；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 K136 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 K215 的位置的胺基酸取代。

67.根據申請專利範圍第 66 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 K136 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K136E 或 K136D)；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 K215 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K215E 或 K215D)；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 K136 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K136E 或 K136D) 和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 K215 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K215E 或 K215D)。

68.根據申請專利範圍第 2 或 39-40 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域是 IgG3 Fc 域，且其中該 IgG3 Fc 域包含一或多個改變該 ALK4-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾。

69.根據申請專利範圍第 68 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 33 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。

70.根據申請專利範圍第 68 或 69 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG3 融合 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K145 的位置的胺基酸取代；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K224 的位置的胺基酸取代；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K145 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K224 的位置的胺基酸取代。

71.根據申請專利範圍第 70 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該

ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K145 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K145E 或 K145D)；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K224 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K224E 或 K224D)；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K145 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K145E 或 K145D) 和位於對應於 SEQ ID NO: 33 之 K224 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K224E 或 K224D)。

72.根據申請專利範圍第 2 或 39-40 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 Fc 域是 IgG4 Fc 域，且其中該 IgG4 域包含一或多個改變該 ALK4-Fc 融合蛋白質之 pI 的胺基酸修飾。

73.根據申請專利範圍第 72 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含與 SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致的胺基酸序列。

74.根據申請專利範圍第 72 或 73 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG4 融合 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K142 的位置的胺基酸取代；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K221 的位置的胺基酸取代；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K142 的位置的胺基酸取代和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K221 的位置的胺基酸取代。

75.根據申請專利範圍第 74 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K142 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K142E 或 K142D)；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K221 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K221E 或 K221D)；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K142 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K142E 或 K142D) 和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 K221 的位置的天門冬胺酸或麩胺酸取代 (K221E 或 K221D)。

76.根據申請專利範圍第 4-8 和 22-26 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中：

- a)該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 31 之位置 S132 的半胱胺酸取代 (S132C) 和位於 SEQ ID NO: 31 之位置 T144 的色胺酸取代 (T144W)；和
- b)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 31 之位置 Y127 的半胱胺酸取代 (Y127C)、位於 SEQ ID NO: 31 之位置 T144 的絲胺酸取代 (T144S)、位於 SEQ ID NO: 31 之位置 L146 的丙胺酸取代 (L146A)、和位於 SEQ ID NO: 31 之位置 Y185 的纈胺酸取代 (Y185V)。

77.根據申請專利範圍第 4-8 和 22-26 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中：

- a)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 31 之位置 S132 的半胱胺酸取代 (S132C) 和位於 SEQ ID NO: 31 之位置 T144 的色胺酸取

代 (T144W); 和

b) 該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 31 之位置 Y127 的半胱胺酸取代 (Y127C)、位於 SEQ ID NO: 31 之位置 T144 的絲胺酸取代 (T144S)、位於 SEQ ID NO: 31 之位置 L146 的丙胺酸取代 (L146A)、和位於 SEQ ID NO: 31 之位置 Y185 的纈胺酸取代 (Y185V)。

78. 根據申請專利範圍第 41-45 和 59-63 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中：

a) 該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 31 之位置 S132 的半胱胺酸取代 (S132C) 和位於 SEQ ID NO: 31 之位置 T144 的色胺酸取代 (T144W); 和

b) 該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 31 之位置 Y127 的半胱胺酸取代 (Y127C)、位於 SEQ ID NO: 31 之位置 T144 的絲胺酸取代 (T144S)、位於 SEQ ID NO: 31 之位置 L146 的丙胺酸取代 (L146A)、和位於 SEQ ID NO: 31 之位置 Y185 的纈胺酸取代 (Y185V)。

79. 根據申請專利範圍第 41-45 和 59-63 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中：

a) 該經修飾的 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 31 之位置 S132 的半胱胺酸取代 (S132C) 和位於 SEQ ID NO: 31 之位置 T144 的色胺酸取代 (T144W); 和

b) 該經修飾的 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG1 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 31 之位置 Y127 的半胱胺酸取代 (Y127C)、位於 SEQ ID NO: 31 之位置 T144 的絲胺酸取代 (T144S)、位於 SEQ ID NO: 31 之位置 L146 的丙胺酸取代

(L146A)、和位於 SEQ ID NO: 31 之位置 Y185 的纈胺酸取代 (Y185V)。

80.根據申請專利範圍第 9-12 和 27-30 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中：

a)該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 32 之位置 S130 的半胱胺酸取代 (S130C) 和位於 SEQ ID NO: 32 之位置 T142 的色胺酸取代 (T142W)；和

b)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 32 之位置 Y125 的半胱胺酸取代 (Y125C)、位於 SEQ ID NO: 32 之位置 T142 的絲胺酸取代 (T142S)、位於 SEQ ID NO: 32 之位置 L144 的丙胺酸取代 (L144A)、和位於 SEQ ID NO: 32 之位置 Y183 的纈胺酸取代 (Y183V)。

81.根據申請專利範圍第 9-12 和 27-30 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中：

a)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 32 之位置 S130 的半胱胺酸取代 (S130C) 和位於 SEQ ID NO: 32 之位置 T142 的色胺酸取代 (T142W)；和

b)該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 32 之位置 Y125 的半胱胺酸取代 (Y125C)、位於 SEQ ID NO: 32 之位置 T142 的絲胺酸取代 (T142S)、位於 SEQ ID NO: 32 之位置 L144 的丙胺酸取代 (L144A)、和位於 SEQ ID NO: 32 之位置 Y183 的纈胺酸取代 (Y183V)。

82.根據申請專利範圍第 46-49 和 64-67 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中：

a)該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 32 之位置 S130

的半胱胺酸取代 (S130C) 和位於 SEQ ID NO: 32 之位置 T142 的色胺酸取代 (T142W); 和

b)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 32 之位置 Y125 的半胱胺酸取代 (Y125C)、位於 SEQ ID NO: 32 之位置 T142 的絲胺酸取代 (T142S)、位於 SEQ ID NO: 32 之位置 L144 的丙胺酸取代 (L144A)、和位於 SEQ ID NO: 32 之位置 Y183 的纈胺酸取代 (Y183V)。

83.根據申請專利範圍第 46-49 和 64-67 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中：

a)該經修飾的 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 32 之位置 S130 的半胱胺酸取代 (S130C) 和位於 SEQ ID NO: 32 之位置 T142 的色胺酸取代 (T142W); 和

b)該經修飾的 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG2 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 32 之位置 Y125 的半胱胺酸取代 (Y125C)、位於 SEQ ID NO: 32 之位置 T142 的絲胺酸取代 (T142S)、位於 SEQ ID NO: 32 之位置 L144 的丙胺酸取代 (L144A)、和位於 SEQ ID NO: 32 之位置 Y183 的纈胺酸取代 (Y183V)。

84.根據申請專利範圍第 13-16 和 31-34 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中：

a)該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 33 之位置 S139 的半胱胺酸取代 (S139C) 和位於 SEQ ID NO: 33 之位置 T151 的色胺酸取代 (T151W); 和

b)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 33 之位置 Y134 的半胱胺酸取代 (Y134C)、位於 SEQ ID NO: 33 之位置 T151 的絲胺

酸取代(T151S)、位於 SEQ ID NO: 33 之位置 L153 的丙胺酸取代(L153A)、和位於 SEQ ID NO: 33 之位置 Y192 的纈胺酸取代(Y192V)。

85.根據申請專利範圍第 13-16 和 31-34 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中：

a)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 33 之位置 S139 的半胱胺酸取代(S139C)和位於 SEQ ID NO: 33 之位置 T151 的色胺酸取代(T151W)；和

b)該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 33 之位置 Y134 的半胱胺酸取代(Y134C)、位於 SEQ ID NO: 33 之位置 T151 的絲胺酸取代(T151S)、位於 SEQ ID NO: 33 之位置 L153 的丙胺酸取代(L153A)、和位於 SEQ ID NO: 33 之位置 Y192 的纈胺酸取代(Y192V)。

86.根據申請專利範圍第 50-53 和 68-71 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中：

a)該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 33 之位置 S139 的半胱胺酸取代(S139C)和位於 SEQ ID NO: 33 之位置 T151 的色胺酸取代(T151W)；和

b)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 33 之位置 Y134 的半胱胺酸取代(Y134C)、位於 SEQ ID NO: 33 之位置 T151 的絲胺酸取代(T151S)、位於 SEQ ID NO: 33 之位置 L153 的丙胺酸取代(L153A)、和位於 SEQ ID NO: 33 之位置 Y192 的纈胺酸取代(Y192V)。

87.根據申請專利範圍第 50-53 和 68-71 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中：

a)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 33 之位置 S139 的半胱胺酸取代 (S139C) 和位於 SEQ ID NO: 33 之位置 T151 的色胺酸取代 (T151W); 和

b)該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG3 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 33 之位置 Y134 的半胱胺酸取代 (Y134C)、位於 SEQ ID NO: 33 之位置 T151 的絲胺酸取代 (T151S)、位於 SEQ ID NO: 33 之位置 L153 的丙胺酸取代 (L153A)、和位於 SEQ ID NO: 33 之位置 Y192 的纈胺酸取代 (Y192V)。

88.根據申請專利範圍第 17-20 和 35-38 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中：

a)該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 35 之位置 S136 的半胱胺酸取代 (S136C) 和位於 SEQ ID NO: 35 之位置 T148 的色胺酸取代 (T148W); 和

b)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 35 之位置 Y131 的半胱胺酸取代 (Y131C)、位於 SEQ ID NO: 35 之位置 T148 的絲胺酸取代 (T148S)、位於 SEQ ID NO: 35 之位置 L150 的丙胺酸取代 (L150A)、和位於 SEQ ID NO: 35 之位置 Y189 的纈胺酸取代 (Y189V)。

89.根據申請專利範圍第 17-20 和 35-38 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中：

a)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 35 之位置 S136 的半胱胺酸取代 (S136C) 和位於 SEQ ID NO: 35 之位置 T148 的色胺酸取代 (T148W); 和

b)該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 35 之位置 Y131

的半胱胺酸取代 (Y131C)、位於 SEQ ID NO: 35 之位置 T148 的絲胺酸取代 (T148S)、位於 SEQ ID NO: 35 之位置 L150 的丙胺酸取代 (L150A)、和位於 SEQ ID NO: 35 之位置 Y189 的纈胺酸取代 (Y189V)。

90.根據申請專利範圍第 54-58 和 72-75 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中：

a)該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 35 之位置 S136 的半胱胺酸取代 (S136C) 和位於 SEQ ID NO: 35 之位置 T148 的色胺酸取代 (T148W)；和

b)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 35 之位置 Y131 的半胱胺酸取代 (Y131C)、位於 SEQ ID NO: 35 之位置 T148 的絲胺酸取代 (T148S)、位於 SEQ ID NO: 35 之位置 L150 的丙胺酸取代 (L150A)、和位於 SEQ ID NO: 35 之位置 Y189 的纈胺酸取代 (Y189V)。

91.根據申請專利範圍第 54-58 和 72-75 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中：

a)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 35 之位置 S136 的半胱胺酸取代 (S136C) 和位於 SEQ ID NO: 35 之位置 T148 的色胺酸取代 (T148W)；和

b)該 ALK4-Fc 融合蛋白質 IgG4 Fc 域包含位於 SEQ ID NO: 35 之位置 Y131 的半胱胺酸取代 (Y131C)、位於 SEQ ID NO: 35 之位置 T148 的絲胺酸取代 (T148S)、位於 SEQ ID NO: 35 之位置 L150 的丙胺酸取代 (L150A)、和位於 SEQ ID NO: 35 之位置 Y189 的纈胺酸取代 (Y189V)。

92.根據申請專利範圍第 22 或 59 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中

該 IgG1 Fc 域與 SEQ ID NO: 66 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致。

93.根據申請專利範圍第 92 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 IgG1 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 66 之 138 的位置的麩胺酸；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 66 之 217 的位置的天門冬胺酸；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 66 之 138 的位置的麩胺酸和位於對應於 SEQ ID NO: 66 之 217 的位置的天門冬胺酸。

94.根據申請專利範圍第 92 或 93 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該經修飾的 IgG1 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 66 之 132 的位置的半胱胺酸和位於對應於 SEQ ID NO: 66 之 144 的位置的色胺酸。

95.根據申請專利範圍第 4 或 41 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 IgG1 Fc 域與 SEQ ID NO: 67 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致。

96.根據申請專利範圍第 95 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 IgG1 Fc 域包含一或多個選自以下者的胺基酸取代：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 67 之 162 的位置的精胺酸；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 67 之 179 的位置的精胺酸；和
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 67 之 162 的位置的精胺酸和位於對應於 SEQ ID NO: 67 之 179 的位置的精胺酸。

97.根據申請專利範圍第 95 或 96 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該經修飾的 IgG1 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 67 之 127 的位置的半胱

胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 67 之 144 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 67 之 146 的位置的丙胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 67 之 185 的位置的纈胺酸。

98.一種重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中：

a)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 IgG1 Fc 域，該 IgG1 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 S132 的位置的半胱胺酸(S132C)、位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 T144 的位置的色胺酸(T144W)、和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 H213 的位置的酸性胺基酸；和

b)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 IgG1 Fc 域，該 IgG1 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 Y127 的位置的半胱胺酸(Y127C)、位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 T144 的位置的絲胺酸(T144S)、位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 L146 的位置的丙胺酸(L146A)、和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 Y185 的位置的纈胺酸(Y185V)。

99.一種重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中：

a)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 IgG1 Fc 域，該 IgG1 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 S132 的位置的半胱胺酸(S132C)、位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 T144 的位置的色胺酸(T144W)、和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 H213 的位置的酸性胺基酸；和

b)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 IgG1 Fc 域，該 IgG1 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 Y127 的位置的半胱胺酸(Y127C)、位於對應於 SEQ ID

NO: 31 之 T144 的位置的絲胺酸 (T144S)、位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 L146 的位置的丙胺酸 (L146A)、和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 Y185 的位置的纈胺酸 (Y185V)。

100.一種重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中：

a)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 IgG1 Fc 域，該 IgG1 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 S132 的位置的半胱胺酸 (S132C)、和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 T144 的位置的色胺酸 (T144W)；和

b)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 IgG1 Fc 域，該 IgG1 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 Y127 的位置的半胱胺酸 (Y127C)、位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 T144 的位置的絲胺酸 (T144S)、位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 L146 的位置的丙胺酸 (L146A)、位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 Y185 的位置的纈胺酸 (Y185V)、和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 H213 的位置的酸性胺基酸。

101.一種重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中：

a)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 IgG1 Fc 域，該 IgG1 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 S132 的位置的半胱胺酸 (S132C)、和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 T144 的位置的色胺酸 (T144W)；和

b)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 IgG1 Fc 域，該 IgG1 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 Y127 的位置的半胱胺酸 (Y127C)、位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 T144 的位置的絲胺酸 (T144S)、位於對應於 SEQ ID NO: 31 之

L146 的位置的丙胺酸 (L146A)、和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 Y185 的位置的纈胺酸 (Y185V)、和位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 H213 的位置的酸性胺基酸。

102.根據申請專利範圍第 98-101 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 H213 的位置的酸性胺基酸是天門冬胺酸。

103.根據申請專利範圍第 98-101 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該位於對應於 SEQ ID NO: 31 之 H213 的位置的酸性胺基酸是麩胺酸。

104.根據申請專利範圍第 98-103 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 IgG1 Fc 域與 SEQ ID NO: 31 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致。

105.一種重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中：

a)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 IgG2 Fc 域，該 IgG2 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 S130 的位置的半胱胺酸(S130C)、位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 T142 的位置的色胺酸(T142W)、和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 H211 的位置的酸性胺基酸；和

b)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 IgG2 Fc 域，該 IgG2 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 Y125 的位置的半胱胺酸 (Y125C)、位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 T142 的位置的絲胺酸 (T142S)、位於對應於 SEQ ID NO: 32 之

L144 的位置的丙胺酸 (L144A)、和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 Y183 的位置的纈胺酸 (Y183V)。

106.一種重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中：

a)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 IgG2 Fc 域，該 IgG2 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 S130 的位置的半胱胺酸(S130C)、位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 T142 的位置的色胺酸(T142W)、和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 H211 的位置的酸性胺基酸；和

b)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 IgG2 Fc 域，該 IgG2 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 Y125 的位置的半胱胺酸 (Y125C)、位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 T142 的位置的絲胺酸 (T142S)、位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 L144 的位置的丙胺酸 (L144A)、和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 Y183 的位置的纈胺酸 (Y183V)。

107.一種重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中：

a)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 IgG2 Fc 域，該 IgG2 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 S130 的位置的半胱胺酸(S130C)、和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 T142 的位置的色胺酸 (T142W)；和

b)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 IgG2 Fc 域，該 IgG2 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 Y125 的位置的半胱胺酸 (Y125C)、位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 T142 的位置的絲胺酸 (T142S)、位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 L144 的位置的丙胺酸 (L144A)、位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 Y183 的位

置的纈胺酸 (Y183V)、和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 H211 的位置的酸性胺基酸。

108.一種重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中：

a)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 IgG2 Fc 域，該 IgG2 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 S130 的位置的半胱胺酸 (S130C)、和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 T142 的位置的色胺酸 (T142W)；和

b)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 IgG2 Fc 域，該 IgG2 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 Y125 的位置的半胱胺酸 (Y125C)、位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 T142 的位置的絲胺酸 (T142S)、位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 L144 的位置的丙胺酸 (L144A)、位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 Y183 的位置的纈胺酸 (Y183V)、和位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 H211 的位置的酸性胺基酸。

109.根據申請專利範圍第 105-108 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 H211 的位置的酸性胺基酸是天門冬胺酸。

110.根據申請專利範圍第 105-108 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該位於對應於 SEQ ID NO: 32 之 H211 的位置的酸性胺基酸是麩胺酸。

111.根據申請專利範圍第 105-110 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該經修飾的 IgG2 Fc 域與 SEQ ID NO: 32 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%、或更高百分比地一致。

112.一種重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中：

a)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 IgG4 Fc 域，該 IgG4 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 S136 的位置的半胱胺酸(S136C)、位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 T148 的位置的色胺酸(T148W)、和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 H217 的位置的酸性胺基酸；和

b)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 IgG4 Fc 域，該 IgG4 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 Y131 的位置的半胱胺酸(Y131C)、位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 T148 的位置的絲胺酸(T148S)、位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 L150 的位置的丙胺酸(L150A)、和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 Y189 的位置的纈胺酸(Y189V)。

113.一種重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中：

a)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 IgG4 Fc 域，該 IgG4 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 S136 的位置的半胱胺酸(S136C)、位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 T148 的位置的色胺酸(T148W)、和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 H217 的位置的酸性胺基酸；和

b)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 IgG4 Fc 域，該 IgG4 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 Y131 的位置的半胱胺酸(Y131C)、位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 T148 的位置的絲胺酸(T148S)、位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 L150 的位置的丙胺酸(L150A)、和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 Y189 的

位置的纈胺酸 (Y189V)。

114.一種重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中：

a)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 IgG4 Fc 域，該 IgG4 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 S136 的位置的半胱胺酸 (S136C)、和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 T148 的位置的色胺酸 (T148W)；和

b)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 IgG4 Fc 域，該 IgG4 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 Y131 的位置的半胱胺酸 (Y131C)、位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 T148 的位置的絲胺酸 (T148S)、位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 L150 的位置的丙胺酸 (L150A)、位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 Y189 的位置的纈胺酸 (Y189V)、和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 H217 的位置的酸性胺基酸。

115.一種重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中：

a)該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 IgG4 Fc 域，該 IgG4 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 S136 的位置的半胱胺酸 (S136C)、和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 T148 的位置的色胺酸 (T148W)；和

b)該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 IgG4 Fc 域，該 IgG4 Fc 域包含位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 Y131 的位置的半胱胺酸 (Y131C)、位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 T148 的位置的絲胺酸 (T148S)、位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 L150 的位置的丙胺酸 (L150A)、位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 Y189 的位置的纈胺酸 (Y189V)、和位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 H217 的位置的酸

性胺基酸。

116.根據申請專利範圍第 112-115 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 H217 的位置的酸性胺基酸是天門冬胺酸。

117.根據申請專利範圍第 112-115 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該位於對應於 SEQ ID NO: 35 之 H217 的位置的酸性胺基酸是麩胺酸。

118.根據申請專利範圍第 112-117 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該經修飾的 IgG4 Fc 域與 SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高百分比地一致。

119.根據申請專利範圍第 1-118 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 ALK4 多肽域，該 ALK4 多肽域包含選自以下者的胺基酸序列：

a)與以下多肽至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的胺基酸序列：

i)於 SEQ ID NO: 9 24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、或 34 之胺基酸之任一者起始，並

ii)於 SEQ ID NO: 9 之胺基酸 101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、或 126 之任一者結束；

- b)與 SEQ ID NO: 9 之胺基酸 34-101 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的胺基酸序列；
- c)與 SEQ ID NO: 10 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的胺基酸序列；
- d)與以下多肽至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的胺基酸序列：
- i)於 SEQ ID NO: 19 24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、或 34 之胺基酸之任一者起始，並
- ii)於 SEQ ID NO: 19 之胺基酸 101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、或 126 之任一者結束；
- e)與 SEQ ID NO: 19 之胺基酸 34-101 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的胺基酸序列；和
- f)與 SEQ ID NO: 20 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的胺基酸序列。

120.根據申請專利範圍中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 ActRIIB 多肽域，該 ActRIIB 多肽域包含選自

以下者的胺基酸序列：

a)與以下多肽至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的胺基酸序列：

i)於 SEQ ID NO: 1 20、21、22、23、24、25、26、27、28、或 29 之胺基酸之任一者起始，並

ii)於 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、或 134 之任一者結束；

b)與 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 29-109 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的胺基酸序列；

c)與 SEQ ID NO: 1 之胺基酸 25-131 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的胺基酸序列；

d)與 SEQ ID NO: 2 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的胺基酸序列；

e)與 SEQ ID NO: 3 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的胺基酸序列；

f)與 SEQ ID NO: 5 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 一致的胺基酸序列；和

g)與 SEQ ID NO: 6 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 一致的胺基酸序列。

121.根據申請專利範圍第 120 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB 多肽域不包含位於對應於 SEQ ID NO: 1 之 L79 的位置的酸性胺基酸。

122.根據申請專利範圍第 1-121 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質進一步包含位置在該 ALK4 域和該 Fc 域之間的連接子域及／或該 ActRIIB 融合蛋白質進一步包含位置在該 ActRIIB 域和該 Fc 域之間的連接子域。

123.根據申請專利範圍第 122 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該連接子域係選自：TGGG(SEQ ID NO: 17)、TGGGG(SEQ ID NO: 15)、SGGGG(SEQ ID NO: 16)、GGGGS(SEQ ID NO: 58)、GGG(SEQ ID NO: 13)、GGGG(SEQ ID NO: 14)、SGGG(SEQ ID NO: 18)、和 GGGGS(SEQ ID NO: 58)。

124.一種重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含與 SEQ ID NO: 76 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%的胺基酸序列，且其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含與 SEQ

ID NO: 72 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%的胺基酸序列。

125.根據申請專利範圍第 124 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含一或多個選自以下者的胺基酸：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 234 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 251 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 253 的位置的丙胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 292 的位置的纈胺酸；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 269 的位置的帶正電的胺基酸；
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 D286 的位置的帶正電的胺基酸；
- d)位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 269 的位置的帶正電的胺基酸和位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 286 的位置的帶正電的胺基酸；
- e)位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 234 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 251 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 253 的位置的丙胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 292 的位置的纈胺酸（Y292V）、和位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 269 的位置的帶正電的胺基酸；
- f)位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 234 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 251 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 253 的位置的丙胺酸、位於 SEQ ID NO: 76 之位置 292 的纈胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 286 的位置的帶正電的胺基酸；和
- g)位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 234 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 251 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 253 的位置

的丙胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 292 的位置的纈胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 269 的位置的帶正電的胺基酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 286 的位置的帶正電的胺基酸。

126.根據申請專利範圍第 124 或 125 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含一或多個選自以下者的胺基酸：

- a)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 250 的位置的半胱胺酸、和位於 SEQ ID NO: 72 之位置 262 的色胺酸；
- b)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 256 的位置的帶負電的胺基酸；
- c)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 335 的位置的帶負電的胺基酸；
- d)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 256 的位置的帶負電的胺基酸和位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 335 的位置的帶負電的胺基酸；
- e)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 250 的位置的半胱胺酸、位於 SEQ ID NO: 72 之位置 262 的色胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 256 的位置的帶負電的胺基酸；
- f)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 250 的位置的半胱胺酸、位於 SEQ ID NO: 72 之位置 262 的色胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 335 的位置的帶負電的胺基酸；和
- g)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 250 的位置的半胱胺酸、位於 SEQ ID NO: 72 之位置 262 的色胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 256 的位置的帶負電的胺基酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 335 的位置的帶負電的胺基酸。

127.一種重組 ALK4-Fc 融合蛋白質，其包含與 SEQ ID NO: 76 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、

92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%的胺基酸序列。

128.根據申請專利範圍第 127 項的 ALK4-Fc 融合蛋白質，其中該融合蛋白質包含一或多個選自以下者的胺基酸：

a)位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 234 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 251 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 253 的位置的丙胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 292 的位置的纈胺酸；

b)位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 269 的位置的帶正電的胺基酸；

c)位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 286 的位置的帶正電的胺基酸；

d)位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 269 的位置的帶正電的胺基酸和位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 286 的位置的帶正電的胺基酸；

e)位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 234 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 251 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 253 的位置的丙胺酸、位於 SEQ ID NO: 76 之位置 292 的纈胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 269 的位置的帶正電的胺基酸；

f)位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 234 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 251 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 253 的位置的丙胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 292 的位置的纈胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 286 的位置的帶正電的胺基酸；和

g)位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 234 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 251 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 253 的位置的丙胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 292 的位置的纈胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 76 之 269 的位置的帶正電的胺基酸、和位於對應於 SEQ ID

NO: 76 之 286 的位置的帶正電的胺基酸。

129.一種重組 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其包含與 SEQ ID NO: 72 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%的胺基酸序列。

130.根據申請專利範圍第 129 項的 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中該融合蛋白質包含一或多個選自以下者的胺基酸：

a)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 250 的位置的半胱胺酸和位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 262 的位置的色胺酸；

b)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 256 的位置的帶負電的胺基酸；

c)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 335 的位置的帶負電的胺基酸；

d)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 256 的位置的帶負電的胺基酸和位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 335 的位置的帶負電的胺基酸；

e)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 250 的位置的半胱胺酸、位於 SEQ ID NO: 72 之位置 262 的色胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 256 的位置的帶負電的胺基酸；

f)位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 250 的位置的半胱胺酸、位於 SEQ ID NO: 72 之位置 262 的色胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 335 的位置的帶負電的胺基酸；和

g)位於對應於 SEQ ID NO: 7 之 250 的位置的半胱胺酸、位於 SEQ ID NO: 72 之位置 262 的色胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 256 的位置的帶負電的胺基酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 72 之 335 的位置的帶負電的胺基酸。

131.一種重組 ALK4-Fc 融合蛋白質，其包含與 SEQ ID NO: 74 之胺基

酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%的胺基酸序列。

132.根據申請專利範圍第 131 項的 ALK4-Fc 融合蛋白質，其中該融合蛋白質包含一或多個選自以下者的胺基酸：

a)位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 258 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 275 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 277 的位置的丙胺酸、和位於 SEQ ID NO: 74 之位置 316 的纈胺酸；

b)位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 293 的位置的帶正電的胺基酸；

c)位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 310 的位置的帶正電的胺基酸；

d)位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 293 的位置的帶正電的胺基酸和位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 310 的位置的帶正電的胺基酸；

e)位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 258 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 275 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 277 的位置的丙胺酸、位於 SEQ ID NO: 74 之位置 316 的纈胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 293 的位置的帶正電的胺基酸；

f)位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 258 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 275 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 277 的位置的丙胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 316 的位置的纈胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 310 的位置的帶正電的胺基酸

g)位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 258 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 275 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 277 的位置的丙胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 316 的位置的纈胺酸、位於對應

於 SEQ ID NO: 74 之 293 的位置的帶正電的胺基酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 74 之 310 的位置的帶正電的胺基酸。

133.一種重組 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其包含與 SEQ ID NO: 70 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%的胺基酸序列。

134.根據申請專利範圍第 133 項的 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中該融合蛋白質包含一或多個選自以下者的胺基酸：

a)位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 275 的位置的半胱胺酸和位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 287 的位置的色胺酸；

b)位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 281 的位置的帶負電的胺基酸；

c)位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 360 的位置的帶負電的胺基酸；

d)位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 281 的位置的帶負電的胺基酸和位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 360 的位置的帶負電的胺基酸；

e)位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 275 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 287 的位置的色胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 281 的位置的帶負電的胺基酸；

f)位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 275 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 287 的位置的色胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 360 的位置的帶負電的胺基酸；和

g)位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 275 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 287 的位置的色胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 281 的位置的帶負電的胺基酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 70 之 360 的位置的帶負電

的胺基酸。

135.根據申請專利範圍第 125、128、和 132 項中之任一項的異多聚體或融合蛋白質，其中該帶正電的胺基酸殘基是經修飾的或天然存在的（例如 R、K、或 H）胺基酸。

136.根據申請專利範圍第 135 項的異多聚體或融合蛋白質，其中該帶正電的胺基酸殘基是 R。

137.根據申請專利範圍第 126、130、和 134 項中之任一項的異多聚體或融合蛋白質，帶負電的胺基酸殘基是經修飾的或天然存在的（例如 D 或 E）胺基酸。

138.根據申請專利範圍第 137 項的異多聚體或融合蛋白質，其中該帶負電的胺基酸殘基是 D。

139.根據申請專利範圍第 137 項的異多聚體或融合蛋白質，其中該帶負電的胺基酸殘基是 E。

140.一種重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含與 SEQ ID NO: 48 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%的胺基酸序列，且其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含與 SEQ ID NO: 80 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%的胺基酸序列。

141.根據申請專利範圍第 140 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該

ALK4-Fc 融合蛋白質包含位於對應於 SEQ ID NO: 48 之 234 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 48 之 251 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 48 之 253 的位置的丙胺酸、和位於 SEQ ID NO: 48 之位置 292 的纈胺酸。

142.根據申請專利範圍第 140 或 141 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含位於對應於 SEQ ID NO: 80 之 250 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 80 之 262 的位置的色胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 80 之 331 的位置的精胺酸。

143.一種重組 ALK4-Fc 融合蛋白質，其包含與 SEQ ID NO: 48 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%的胺基酸序列。

144.根據申請專利範圍第 143 項的 ALK4-Fc 融合蛋白質，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含位於對應於 SEQ ID NO: 48 之 234 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 48 之 251 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 48 之 253 的位置的丙胺酸、和位於 SEQ ID NO: 48 之位置 292 的纈胺酸。

145.一種重組 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其包含與 SEQ ID NO: 80 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%的胺基酸序列。

146.根據申請專利範圍第 145 項的 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含位於對應於 SEQ ID NO: 80 之 250 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 80 之 262 的位置的色胺酸、和位於對應

於 SEQ ID NO: 80 之 331 的位置的精胺酸。

147.一種重組 ALK4-Fc 融合蛋白質，其包含與 SEQ ID NO: 47 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%的胺基酸序列。

148.根據申請專利範圍第 147 項的 ALK4-Fc 融合蛋白質，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含位於對應於 SEQ ID NO: 47 之 258 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 47 之 275 的位置的絲胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 47 之 277 的位置的丙胺酸、和位於 SEQ ID NO: 47 之位置 316 的纈胺酸。

149.一種重組 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其包含與 SEQ ID NO: 78 之胺基酸序列至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%的胺基酸序列。

150.根據申請專利範圍第 145 項的 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含位於對應於 SEQ ID NO: 78 之 275 的位置的半胱胺酸、位於對應於 SEQ ID NO: 78 之 287 的位置的色胺酸、和位於對應於 SEQ ID NO: 78 之 356 的位置的精胺酸。

151.根據申請專利範圍第 1-150 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體、ALK4-Fc 融合蛋白質、或 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中該異多聚體或融合蛋白質包含一或多個選自由以下者所組成之群組的經修飾的胺基酸殘基：醣苷化胺基酸、PEG 化胺基酸、法尼基化（farnesylated）胺基酸、乙醯化胺基酸、生物素化胺基酸、和與脂質部分共軛的胺基酸。

152.根據申請專利範圍第 151 項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體、ALK4-Fc

融合蛋白質、或 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中該異多聚體或融合蛋白質經醣苷化且具有可自中國倉鼠卵巢（CHO）細胞株獲得的醣苷化模式。

153.根據申請專利範圍第 1-152 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體、ALK4-Fc 融合蛋白質、或 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中該異多聚體或融合蛋白質與一或多種選自由以下者所組成之群組的配體結合：活化素（例如活化素 A 及／或活化素 B）、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10、和 GDF3。

154.根據申請專利範圍第 1-153 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚體、ALK4-Fc 融合蛋白質、或 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中該異多聚體或融合蛋白質實質上不與 BMP9 結合。

155.根據申請專利範圍第 1-126、135-142、和 151-154 項中之任一項的異多聚體，其中該異多聚體相較於對應的 ActRIIB 同多聚體以較弱的親和力與 BMP10 結合。

156.根據申請專利範圍第 1-126、135-142、和 151-155 項中之任一項的異多聚體，其中該異多聚體相較於對應的 ActRIIB 同多聚體以較弱的親和力與 BMP9 結合。

157.根據申請專利範圍第 1-126、135-142、和 151-156 項中之任一項的異多聚體，其中該異多聚體相較於對應的 ActRIIB 同多聚體以較弱的親和力與 GDF3 結合。

158.根據申請專利範圍第 1-126、135-142、和 151-157 項中之任一項的異多聚體，其中該異多聚體相較於對應的 ActRIIB 同多聚體以較強的親和力與活化素 B 結合。

159.根據申請專利範圍第 1-158 項中之任一項的 ALK4:ActRIIB 異多聚

體、ALK4-Fc 融合蛋白質、或 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中該異多聚體或融合蛋白質抑制透過一或多種選自由以下者所組成之群組的配體的傳訊：活化素（例如活化素 A 及／或活化素 B）、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10、和 GDF3。

160.根據申請專利範圍第 1-126、135-142、和 151-154 項中之任一項的異多聚體，其中該異多聚體不可支撐地抑制 BMP9 傳訊。

161.根據申請專利範圍第 1-126、135-142、和 151-160 項中之任一項的異多聚體，其中該異多聚體相較於對應的 ActRIIB 同多聚體是 BMP10 傳訊之較弱的抑制劑。

162.根據申請專利範圍第 1-126、135-142、和 151-161 項中之任一項的異多聚體，其中該異多聚體相較於對應的 ActRIIB 同多聚體是 BMP9 傳訊之較弱的抑制劑。

163.根據申請專利範圍第 1-126、135-142、和 151-162 項中之任一項的異多聚體，其中該異多聚體相較於對應的 ActRIIB 同多聚體是 GDF3 傳訊之較弱的抑制劑。

164.根據申請專利範圍第 1-126、135-142、和 151-163 項中之任一項的異多聚體，其中該異多聚體相較於對應的 ActRIIB 同多聚體是活化素 B 之較強的抑制劑。

165.根據申請專利範圍第 159-164 項中之任一項的異多聚體，其中該配體傳訊是在基於細胞的分析中測量。

166.根據申請專利範圍第 1-126、135-142、和 160-165 項中之任一項的異多聚體，其中該異多聚體是異二聚體。

167.根據申請專利範圍第 1-166 項中之任一項的異多聚體或 Fc 融合蛋白質，其中該一或多個胺基酸修飾改變 pI 達至少 0.1 (例如達至少 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.7、0.8、0.9、1.0、1.3、1.5、1.7、2.0、2.3、2.5、2.7、3.0、3.3、3.5、3.7、或至少達 4.0)。

168.根據前述申請專利範圍請求項中之任一項的異多聚體，其中：

- a)該一或多個 ALK4-Fc 融合蛋白質中的胺基酸修飾使得該 ALK4-Fc 融合蛋白質和該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質間有增加的等電點差異；
- b)該一或多個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質中的胺基酸修飾使得該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質和該 ALK4-Fc 融合蛋白質間有增加的等電點差異；或
- c)該一或多個 ALK4-Fc 融合蛋白質中的胺基酸修飾使得該 ALK4-Fc 融合蛋白質和該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質間有增加的等電點差異，且該一或多個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質中的胺基酸修飾使得該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質和該 ALK4-Fc 融合蛋白質間有增加的等電點差異。

169.根據申請專利範圍第 167 項的異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質和該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質具有至少 0.7 的 pI 差異(例如至少 0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、或至少 4.0 的 pI 之差異)。

170.一種醫藥製劑，其包含根據申請專利範圍第 1-126、135-142、和 160-169 項中之任一項的異多聚體和醫藥上可接受的載劑。

171.根據申請專利範圍第 170 項的醫藥製劑，其中該醫藥製劑是實質上無熱原的。

172.根據申請專利範圍第 170 或 171 項中之任一項的醫藥製劑，其中該醫藥製劑包含少於約 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、或少於約 1% ALK4 同多聚體。

173.根據申請專利範圍第 170-172 項中之任一項的醫藥製劑，其中該醫藥製劑包含少於約 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、或少於約 1% ActRIIB 同多聚體。

174.一種重組核酸，其包含如於申請專利範圍第 1-169 項中之任一項中描述的 ALK4-Fc 融合蛋白質之編碼序列。

175.根據申請專利範圍第 174 項的重組核酸，其中該核酸包含與 SEQ ID NO: 75 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的核酸序列。

176.根據申請專利範圍第 174 項的重組核酸，其中該核酸包含與 SEQ ID NO: 77 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的核酸序列。

177.根據申請專利範圍第 174 項的重組核酸，其中該核酸包含與 SEQ ID NO: 82 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的核酸序列。

178.根據申請專利範圍第 174 項的重組核酸，其中該核酸包含與 SEQ ID NO: 83 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、

92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的核酸序列。

179.一種重組核酸，其包含如於申請專利範圍第 1-169 項中之任一項中描述的 ActRIIB-Fc 融合蛋白質之編碼序列。

180.根據申請專利範圍第 179 項的重組核酸，其中該核酸包含與 SEQ ID NO: 71 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的核酸序列。

181.根據申請專利範圍第 179 項的重組核酸，其中該核酸包含與 SEQ ID NO: 73 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的核酸序列。

182.根據申請專利範圍第 179 項的重組核酸，其中該核酸包含與 SEQ ID NO: 79 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的核酸序列。

183.根據申請專利範圍第 179 項的重組核酸，其中該核酸包含與 SEQ ID NO: 81 至少 70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%一致的核酸序列。

184.一種重組多核苷酸，其包含與根據申請專利範圍第 174-178 項中之任一項的 ALK4 多肽之編碼序列可操作地連接的啟動子序列。

185.一種重組多核苷酸，其包含與根據申請專利範圍第 179-183 項中之任一項的 ActRIIB 多肽之編碼序列可操作地連接的啟動子序列。

186.一種重組多核苷酸，其包含與根據申請專利範圍第 174-178 項中之任一項的 ALK4 多肽之編碼序列和根據申請專利範圍第 179-183 項中之任一項的 ActRIIB 多肽之編碼序列可操作地連接的啟動子序列。

187.一種載體，其包含根據申請專利範圍第 174-186 項中之任一項的重組多核苷酸。

188.一種細胞，其係以根據申請專利範圍第 174-186 項中之任一項的重組多核苷酸或根據申請專利範圍第 187 項的載體轉形。

189.根據申請專利範圍第 186 項的細胞，其中該細胞是 CHO 細胞。

190.一種製造包含 ALK4 多肽和 ActRIIB 多肽的異多聚體的方法，其包含在適合表現 ALK4 多肽和 ActRIIB 多肽的條件下培養細胞，其中該細胞包含根據申請專利範圍第 174-176 項中之任一項的重組多核苷酸和根據申請專利範圍第 179-183 項中之任一項的重組多核苷酸。

191.一種製造包含 ALK4 多肽和 ActRIIB 多肽的異多聚體的方法，其包含在適合表現 ALK4 多肽和 ActRIIB 多肽的條件下培養細胞，其中該細胞包含根據申請專利範圍第 186 項的重組多核苷酸。

192.一種製造包含 ALK4 多肽和 ActRIIB 多肽的異多聚體的方法，其包含：

a)在適合表現 ALK4 多肽的條件下培養第一細胞，其中該第一細胞包含根據申請專利範圍第 174-178 項中之任一項的重組多核苷酸；

b)回收所表現的 ALK4 多肽；

c)在適合表現 ActRIIB 多肽的條件下培養第二細胞，其中該第二細胞包含根據申請專利範圍第 179-183 項中之任一項的重組多核苷酸；

d)回收所表現的 ActRIIB 多肽；

e)在適合 ALK4:ActRIIB 異多聚體形成的條件下組合所回收的 ALK4 多肽和所回收的 ActRIIB 多肽。

193.根據申請專利範圍第 190-192 項中之任一項的方法，其中該方法進一步包含回收該異多聚體的步驟。

194.根據申請專利範圍第 190-193 項中之任一項的方法，其中該 ALK4 多肽係使用 TPA 前導序列表現。

195.根據申請專利範圍第 190-193 項中之任一項的方法，其中該 ActRIIB 多肽係使用 TPA 前導序列表現。

196.根據申請專利範圍第 194 或 195 項的方法，其中該 TPA 前導子包含 SEQ ID NO: 38 之編碼序列。

197.根據申請專利範圍第 190-196 項中之任一項的方法，其中該細胞是 CHO 細胞。

198.根據申請專利範圍第 190-197 項中之任一項的方法，其中該異多聚體是異二聚體。

199.一種重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其包含至少一個 ALK4-Fc 融合蛋白質和至少一個 ActRIIB-Fc 融合蛋白質，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含與 SEQ ID NO: 76 之胺基酸序列至少 90%、95%、97%或 99%一致的胺基酸序列，且其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含與 SEQ ID NO: 72 之胺基酸序列至少 90%、95%、97%或 99%一致的胺基酸序列。

200.根據申請專利範圍第 199 項的重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 SEQ ID NO: 76 之胺基酸序列，且其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 SEQ ID NO: 72 之胺基酸序列。

201.根據申請專利範圍第 199 項的重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 SEQ ID NO: 38 之前導序列。

202.根據申請專利範圍第 199-201 項中之任一項的重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含與 SEQ ID NO: 70 之胺基酸序列至少 90%、95%、97%或 99%一致的胺基酸序列。

203.根據申請專利範圍第 199-202 項中之任一項的重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ActRIIB-Fc 融合蛋白質包含 SEQ ID NO: 70 之胺基酸序列。

204.根據申請專利範圍第 199-203 項中之任一項的重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 SEQ ID NO: 38 之前導序列。

205.根據申請專利範圍第 199-201 項中之任一項的重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含與 SEQ ID NO: 74 之胺基酸序列至少 90%、95%、97%或 99%一致的胺基酸序列。

206.該重組 ALK4:ActRIIB 異多聚體，其中該 ALK4-Fc 融合蛋白質包含 SEQ ID NO: 74 之胺基酸序列。

207.一種用於治療具有與肌肉流失或肌肉生長不足有關的病症的患者的方法，其包含將有效量的根據申請專利範圍第 1-126、135-142、151-169 和 199-206 項中之任一項的異多聚體投予至需要其的患者。

208.根據申請專利範圍第 207 項的方法，其中該患者具有肌肉萎縮。

209.根據申請專利範圍第 207 項的方法，其中該患者具有肌肉營養不良。

210.根據申請專利範圍第 208 項的方法，其中該肌肉營養不良是 Duchenne 氏肌肉營養不良。

211.根據申請專利範圍第 210 項的方法，其中該患者是青少年且治療於被診斷出患有 Duchenne 氏肌肉營養不良之日的一至五年內開始。

212.根據申請專利範圍第 208 項的方法，其中該肌肉營養不良是 Becker 氏肌肉營養不良。

213.根據申請專利範圍第 210-212 項中之任一項的方法，其中該異多聚體係與以下者之一或多者組合投予：eteplirsen、皮質類固醇（例如地夫可特（deflazacourt））、類固醇（例如普賴蘇（prednisone））、血壓及／或心臟醫藥（例如血管張力素轉化酶抑制劑、貝他阻斷劑、和利尿劑）、抗氣喘劑（例如阿布帖醇（albuterol））、維生素／營養物（例如胺基酸、肉鹼、輔酶 Q10、肌酸、魚油、綠茶萃取物、維生素 E）、幹細胞療法、基因療法、輔助換氣、手術、物理治療、節食及／或運動。

214.根據申請專利範圍第 209 項的方法，其中該肌肉營養不良是臉肩胛肱骨肌肉營養不良。

215.根據申請專利範圍第 214 項的方法，其中該異多聚體係與以下者之一或多者組合投予：阿布帖醇、語言治療、手術、助行器、腰背護具、T 細胞抑制劑（例如經截短組胺醯基-tRNA 合成酶）、幹細胞療法、基因療法、及／或足部支撐裝置。

216.根據申請專利範圍第 207 項的方法，其中該患者具有肌肉萎縮性脊

髓側索硬化症。

217.根據申請專利範圍第 216 項的方法，其中該患者於被診斷出患有肌肉萎縮性脊髓側索硬化症後接受治療。

218.根據申請專利範圍第 216 或 217 項的方法，其中該異多聚體係與以下者之一或多者組合投予：利魯唑（riluzole）、依達拉奉（edaravone）、馬賽替尼（masitinib）、抗氧化劑、物理治療、語言治療、營養支持、呼吸支持（例如非侵入性呼吸器）、幹細胞療法、及／或基因療法。

219.根據申請專利範圍第 207 項的方法，其中該病症是與癌症或癌症療法相關的惡病質。

220.根據申請專利範圍第 207 項的方法，其中該病症是肌肉減少症。

221.根據申請專利範圍第 220 項的方法，其中該異多聚體係與以下者組合投予：尿皮質素（urocortin）II、激素補充療法（例如睪固酮或人類生長激素）、肌酸、維生素 D、運動、節食、及／或肌力訓練。

222.根據申請專利範圍第 207 項的方法，其中該病症是散發性包涵體肌炎。

223.根據申請專利範圍第 222 項的方法，其中該異多聚體係與以下者之一或多者組合投予：皮質類固醇、普賴蘇、歐生隆（oxandrolone）、胺甲喋呤、黴酚酸嗎啉乙酯（mycophenolate mofetil）、靜脈內免疫球蛋白、貝他干擾素-1a、依那西普（etanercept）、阿倫單抗（alemtuzumab）、抑濾泡素、鋰、bimagrumab、arimoclomol、雷帕黴素（rapamycin）、抗氧化劑、肉鹼、輔酶 Q10、物理治療、職能治療、幹細胞療法、及／或基因療法。

224.一種用於治療具有與神經退化相關的病症的患者的方法，其包含將

有效量的根據申請專利範圍第 1-126、135-142、151-169 和 199-207 項中之任一項的異多聚體投予至需要其的患者。

225.根據申請專利範圍第 224 項的方法，其中該病症是肌肉萎縮性脊髓側索硬化症。

226.根據申請專利範圍第 225 項的方法，其中該異多聚體係與以下者之一或多者組合投予：利魯唑、依達拉奉、馬賽替尼、抗氧化劑、物理治療、語言治療、營養支持、呼吸支持（例如非侵入性呼吸器）、幹細胞療法、及／或基因療法。

227.一種用於治療纖維化或與纖維化相關的病症或病況的方法，其包含將有效量的根據申請專利範圍第 1-126、135-142、151-169 和 199-207 項中之任一項的異多聚體投予至需要其的患者。

228.根據申請專利範圍第 227 項的方法，其中該與纖維化相關的病症或病況係選自：肺纖維化、過敏性肺炎、自發性纖維化、肺結核、肺炎、囊腫性纖維化、氣喘、慢性阻塞性肺病（COPD）、肺氣腫、腎（腎臟）纖維化、腎（腎臟）衰竭、慢性腎（腎臟）疾病、骨骼纖維化、骨髓纖維化、類風濕關節炎、全身性紅斑性狼瘡、硬皮症、類肉瘤病、具有多血管炎的肉芽腫病、Peyronie 氏病、肝纖維化、Wilson 氏病、肝醣蓄積病（特別是第 III、IV、IX、和 X 型）、鐵質過多、Gaucher 氏病、Zellweger 氏症候群、非酒精性和酒精性脂肪肝炎、膽管硬化、硬化性膽管炎、Budd-Chiari 氏症候群、與手術相關的纖維化、Crohn 氏病、Duputren 氏攣縮、縱膈纖維化、腎源性纖維化、腹膜後纖維化、心房纖維化、心肌內膜纖維化、胰纖維化。

229.根據申請專利範圍第 227 項的方法，其中該與纖維化相關的病症或

病況是自發性肺纖維化。

230.一種用於降低一對象之體重的方法，其包含將有效量的根據申請專利範圍第 1-126、135-142、151-169、和 199-207 項中之任一項的異多聚體投予至需要其的對象。

231.一種減少一對象之體重增加的方法，其包含將有效量的根據申請專利範圍第 1-126、135-142、151-169 和 199-207 項中之任一項的異多聚體投予至需要其的對象。

232.一種用於治療或預防糖尿病的方法，其包含將有效量的根據申請專利範圍第 1-126、135-142、151-169、和 199-207 項中之任一項的異多聚體投予至需要其的對象。

233.根據申請專利範圍第 232 項的方法，其中該對象具有第 II 型糖尿病。

234.一種用於治療或預防肥胖的方法，其包含將有效量的根據申請專利範圍第 1-126、135-142、151-169、和 199-207 項中之任一項的異多聚體投予至需要其的對象。

235.一種用於治療或預防脂肪肝病的方法，其包含將有效量的根據申請專利範圍第 1-126、135-142、151-169、和 199-207 項中之任一項的異多聚體投予至需要其的對象。

236.根據申請專利範圍第 235 項的方法，其中該對象具有非酒精性脂肪肝病。

237.一種用於在一對象中降低膽固醇及／或三酸甘油酯的方法，其包含將有效量的根據申請專利範圍第 1-126、135-142、151-169、和 199-207

項中之任一項的異多聚體投予至需要其的對象。

238.根據申請專利範圍第 230-237 項中之任一項的方法，其中該對象具有 25 kg/m² 或更高的身體質量指數 (BMI)。

239.根據申請專利範圍第 230-237 項中之任一項的方法，其中該對象是肥胖的。

240.根據申請專利範圍第 239 項的方法，其中該對象具有 30 kg/m² 或更高的身體質量指數 (BMI)。

241.根據申請專利範圍第 230-240 項中之任一項的方法，其中該對象具有胰島素抗性。

242.根據申請專利範圍第 230-241 項中之任一項的方法，其中該對象具有第 2 型糖尿病。

243.根據申請專利範圍第 230-242 項中之任一項的方法，其中該對象具有選自由以下者所組成之群組的疾病或病況：異常血脂症、高脂血症、高膽固醇血症、低 HDL 血清水平、高 LDL 血清水平、和高三酸甘油脂血症。

244.根據申請專利範圍第 230-243 項中之任一項的方法，其中該對象具有選自由以下者所組成之群組的疾病或病況：高血壓 (高的血壓)、心肌梗塞、周邊動脈疾病、血管調節功能異常、動脈硬化、鬱血性心臟衰竭、動脈粥樣硬化、冠狀動脈心臟病、或微血管疾病。

245.根據申請專利範圍第 230-244 項中之任一項的方法，其中該對象具有脂肪肝病。

246.根據申請專利範圍第 245 項的方法，其中該對象具有非酒精性脂肪肝病。

247.一種用於治療或預防與非所欲的體重增加及／或代謝病症相關的病症或病況的方法，其包含將有效量的根據申請專利範圍第 1-126、135-142、151-169、和 199-207 項中之任一項的異多聚體投予至需要其的對象。

248.根據申請專利範圍第 247 項的方法，其中該病症或病況係選自由以下者所組成之群組：高血糖症、脂質代謝疾病、病症、異常血脂症、低 HDL 水平、高 LDL 水平、高三酸甘油酯水平、高脂血症、脂蛋白異常、葡萄糖代謝疾病、葡萄糖失耐、胰島素抗性、葡萄糖耐受性異常（IGT）、空腹葡萄糖異常（IFG）、高尿酸水平、NAFLD、脂肪肝、NASH、多囊性卵巢症候群、高胰島素血症、肥胖、第 II 型糖尿病、心臟病、高的血壓、動脈粥樣硬化、症候群 X、代謝症候群、和高血壓。

249.一種用於在一對象中治療纖維化或與纖維化相關的病症或病況的方法，其包含將有效量的根據申請專利範圍第 1-126、135-142、151-169、和 199-207 項中之任一項的異多聚體投予至需要其的對象。

250.根據申請專利範圍第 248 項的方法，其中該與纖維化相關的病症或病況係選自：肺纖維化、過敏性肺炎、自發性纖維化、肺結核、肺炎、囊腫性纖維化、氣喘、慢性阻塞性肺病（COPD）、肺氣腫、腎（腎臟）纖維化、腎（腎臟）衰竭、慢性腎（腎臟）疾病、骨骼纖維化、骨髓纖維化、類風濕關節炎、全身性紅斑性狼瘡、硬皮症、類肉瘤病、具有多血管炎的肉芽腫病、Peyronie 氏病、肝纖維化、Wilson 氏病、肝糖蓄積病（特別是第 III、IV、IX、和 X 型）、鐵質過多、Gaucher 氏病、Zellweger 氏症候群、非酒精性和酒精性脂肪肝炎、膽管硬化、硬化性膽管炎、Budd-Chiari 氏症

候群、與手術相關的纖維化、Crohn 氏病、Duputren 氏攣縮、縱膈纖維化、腎源性纖維化、腹膜後纖維化、心房纖維化、心肌內膜纖維化、和胰纖維化。

251.根據申請專利範圍第 249 項的方法，其中該與纖維化相關的病症或病況是自發性肺纖維化。

252.一種用於治療腎臟疾病或腎臟疾病之併發症的方法，其包含將有效量的根據申請專利範圍第 1-126、135-142、151-169、和 199-207 項中之任一項的異多聚體投予至需要其的患者。

253.根據申請專利範圍第 252 項的方法，其中該患者具有慢性腎臟疾病或衰竭。

254.根據申請專利範圍第 252 項的方法，其中該患者具有急性腎臟疾病或衰竭。

255.根據申請專利範圍第 252 項的方法，其中該患者具有第 1 期、第 2 期、第 3 期、第 4 期、或第 5 期腎臟疾病。

256.根據申請專利範圍第 255 項的方法，其中該方法延遲或預防自第 1 期進展至第 2 期腎臟疾病、自第 2 期進展至第 3 期腎臟疾病、自第 3 期進展至第 4 期腎臟疾病、或自第 4 期進展至第 5 期腎臟疾病。

257.根據申請專利範圍第 252-256 項中之任一項的方法，其中該方法預防或減少腎臟發炎。

258.根據申請專利範圍第 252-257 項中之任一項的方法，其中該方法預防或減少腎臟組織傷害。

259.根據申請專利範圍第 252-258 項中之任一項的方法，其中該方法預

防或減少腎臟纖維化。

260.根據申請專利範圍第 252-259 項中之任一項的方法，其中該患者具有以下者之一或多者：非糖尿病性腎臟疾病、腎小球性腎炎、間質性腎炎、糖尿病性腎臟疾病、糖尿病性腎病、腎小球硬化、快速進展性腎小球性腎炎、腎纖維化、Alport 氏症候群、IDDM 腎炎、環間膜增生性腎小球性腎炎、膜增生性腎小球性腎炎、新月形腎小球性腎炎、腎間質纖維化、局灶性節段性腎小球硬化、膜性腎病、微小改變疾病、少免疫快速進展性腎小球性腎炎、IgA 腎病、多囊性腎臟疾病、Dent 氏病、腎半胱胺酸積蓄症（nephrocytinosis）、Heymann 氏腎炎、體染色體顯性（成人型）多囊性腎臟疾病、體染色體隱性（幼兒型）多囊性腎臟疾病、急性腎臟損傷、腎病症候群、腎缺血、足細胞疾病或病症、蛋白尿、腎小球疾病、膜性腎小球性腎炎、局灶性節段性腎小球性腎炎、子癇前症、子癇、腎臟病灶、膠原血管病、良性直立性（姿勢性）蛋白尿、IgM 腎病、膜性腎病、類肉瘤病、糖尿病、導因於藥物的腎臟傷害、Fabry 氏病、胺基酸尿、Fanconi 氏症候群、高血壓性腎硬化、間質性腎炎、鐮形血球貧血症、血紅素尿、肌球蛋白尿、華格納氏肉芽病、第 1 型肝醣蓄積病、慢性腎臟疾病、慢性腎衰竭、低腎小球濾過率（GFR）、腎血管硬化、狼瘡性腎炎、ANCA 陽性少免疫新月形腎小球性腎炎、慢性同種異體移植腎病、腎毒性(nephrotoxicity)、腎的毒性(renal toxicity)、腎臟壞死、腎臟傷害、腎小球和腎小管損傷、腎臟功能異常、腎炎症候群、急性腎衰竭（急性腎臟損傷）、慢性腎衰竭、近端小管功能異常、急性腎臟移植排斥、慢性腎臟移植排斥、非 IgA 環間膜增生性腎小球性腎炎、感染後腎小球性腎炎、以任何方式涉及腎的脈管炎、任

何遺傳性腎病、任何間質性腎炎、腎移植失敗、腎臟癌、與其他病況（例如高血壓、糖尿病、和自體免疫疾病）相關的腎臟疾病、Dent 氏病、腎半胱氨酸積蓄症、Heymann 氏腎炎、原發性腎臟疾病、塌陷性腎小球病變、密度沉積病、與冷凝球蛋白血症相關的腎小球性腎炎、Henoch-Schonlein 二氏病、感染後腎小球性腎炎、細菌性心內膜炎、顯微多發性血管炎、Churg-Strauss 二氏症候群、抗 GBM 抗體介導性腎小球性腎炎、類澱粉變性、單株免疫球蛋白沉積病、原纖維性腎小球性腎炎、免疫觸突樣（immunotactoid）腎小球病變、缺血性腎小管損傷、給藥誘發性腎小管-間質性腎炎、毒性腎小管-間質性腎炎、感染性腎小管-間質性腎炎、細菌性腎盂腎炎、導因於多瘤病毒感染或 HIV 感染的病毒感染性腎小管-間質性腎炎、代謝誘發性腎小管-間質性疾病、混合型結締疾病(mixed connective disease)、管型腎病(cast nephropathy)、導因於尿酸鹽或草酸鹽或藥物誘發性結晶沉積的結晶性腎病、急性細胞性腎小管-間質性同種異體移植排斥、導因於淋巴瘤或移植後淋巴增生性疾病的腫瘤浸潤性疾病、腎臟之閉鎖性疾病、血管病、栓塞性微血管病、腎血管硬化、動脈硬化梗塞疾病、混合型結締組織疾病、結節性多動脈炎、鈣調磷酸酶（calcineurin）抑制劑誘發性血管病、急性細胞性血管同種異體移植排斥、急性體液性同種異體移植排斥、早期腎功能衰退（ERFD）、末期腎病（ESRD）、腎靜脈栓塞、急性腎小管壞死、腎阻塞、急性間質性腎炎、已建立的慢性腎臟疾病、腎動脈狹窄、缺血性腎病、尿毒症、藥物和毒素誘發性慢性腎小管間質性腎炎、反流性腎病、腎結石、Goodpasture 氏症候群、正球形(normocytic)正血色性貧血、腎貧血、糖尿病慢性腎臟疾病、與 IgG4 相關的疾病、von Hippel-Lindau

二氏症候群、結節性硬化、腎消耗病 (Nephronophthisis)、腎髓質囊性病 (medullary cystic kidney disease)、腎細胞癌、腺癌、腎胚細胞瘤、淋巴瘤、白血病、唾液酸化不足 (hyposialylation) 病症、慢性環孢素腎病、腎再灌注損傷、腎發育不良、氮血症、兩側動脈阻塞、急性尿酸腎病、低血容、急性兩側阻塞性尿路病變、高血鈣性腎病、溶血性尿毒性症候群、急性尿滯留、惡性腎硬化、分娩後腎小球硬化、硬皮症、非 Goodpasture 氏抗 GBM 疾病、顯微結節性多動脈炎、過敏性肉芽腫病、急性輻射腎炎、鏈球菌後腎小球性腎炎、Waldenstrom 氏巨球蛋白血症、鎮痛劑腎病、動靜脈瘻管、動靜脈移植物、透析、腎臟異位、髓質海綿腎、腎性骨營養不良、單腎、水腎、微白蛋白尿、尿毒症、血尿、高脂血症、低白蛋白血症、脂尿症、酸中毒、和高血鉀症。

261. 根據申請專利範圍第 260 項的方法，其中該患者具有 Alport 氏症候群。

262. 根據申請專利範圍第 261 項的方法，其中該異多聚體係與以下者之一或多者組合投予：血管張力素轉化酶 (ACE) 抑制劑 (例如貝那普利 (benazepril)、西拉普利 (cilazapril)、伊那拉普利 (enalapril)、福辛普利 (fosinopril)、賴諾普利 (lisinopril)、培哚普利 (perinopril)、雷米普利 (ramapril) 和喹那普利 (quinapril))、血管張力素受體阻斷劑 (例如坎地沙坦 (candesartan)、依普沙坦 (epresartan)、艾比沙坦 (irbesartan)、洛沙坦 (losartan)、替米沙坦 (telmisartan) 和巹沙坦 (valsartan))、士他汀 (statin) (例如氟伐他汀 (fluvastatin))、非二氫吡啶鈣離子通道阻斷劑 (例如迪太贊 (diltiazem))、環孢素、及／或醛固酮抑制劑。

IgG1 -----THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF 53
IgG4 ---ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQF 57
IgG2 -----VECPPCPAPPVAG-PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF 51
IgG3 EPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF 60
* * * * * . * * * * * : * * * * * : *

IgG1 NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 113
IgG4 NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT 117
IgG2 NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT 111
IgG3 KWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 120
: * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

IgG1 ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP 173
IgG4 ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP 177
IgG2 ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP 171
IgG3 ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTP 180
* * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

IgG1 PVLDS^uDGSFFLY^uSK^uLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ^uKSLSLSPGK 225
IgG4 PVLDS^uDGSFFLY^uSR^uLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ^uKSLSLSLGK 229
IgG2 PMLDS^uDGSFFLY^uSK^uLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ^uKSLSLSPGK 223
IgG3 PMLDS^uDGSFFLY^uSK^uLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQ^uKSLSLSPGK 232
* : * * * * * : * * * * * : * * : * * * * * : * * * * * * *

圖 3

