(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116113440 A
(43)申请公布日 2023.05.12

(21)申请号 202180056305.2
(22)申请日 2021.06.16
(30)优先权数据
63/040,400 2020.06.17 US
63/159,003 2021.03.10 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.02.09
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/037557 2021.06.16
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/257655 EN 2021.12.23
(71)申请人 阿塞勒隆制药公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 R·N·V·S·苏拉加尼 J·李 P·安德烈 R·库马尔
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴
(51)Int.Cl.
A61K 47/68(2006.01)

权利要求书29页 说明书244页 附图23页

(54)发明名称

ACTRII-ALK4拮抗剂和治疗心力衰竭的方法

(57)摘要

在一些方面,本公开文本涉及ActRII-ALK4拮抗剂和使用ActRII-ALK4拮抗剂治疗、预防心力衰竭(HF)或降低心力衰竭(HF)的进展率和/或严重性,特别是治疗、预防一种或多种HF相关共病或降低一种或多种HF相关共病的进展率和/或严重性的方法。本公开文本还提供使用ActRII-ALK4拮抗剂治疗、预防与多种病症相关的心力衰竭或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法,所述病症包括但不限于遗传性心肌病、肌肉萎缩疾病和肌营养不良。

CN 116113440 A

1.一种治疗与扩张型心肌病(DCM)相关的心力衰竭的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂。

2.一种治疗、预防与扩张型心肌病(DCM)相关的心力衰竭的一种或多种共病或降低所述一种或多种共病的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂。

3.根据权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述扩张型心肌病是DCM的遗传形式。

4.根据权利要求3所述的方法,其中所述扩张型心肌病选自常染色体隐性DCM、X连锁DCM和线粒体DCM。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述扩张型心肌病与迪谢内肌营养不良(DMD)相关。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述扩张型心肌病与抗肌萎缩蛋白(DMD)基因中的一个或多个突变相关。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述患者患有HFrEF心力衰竭。

8.根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中还向所述患者施用选自以下的一种或多种药剂:终止密码子连读疗法、基于病毒载体的基因疗法、针对外显子跳读的反义寡核苷酸(AON)疗法、Ataluren has、肌营养相关蛋白过表达疗法、他达拉非、肌生成抑制蛋白抑制剂和细胞疗法。

9.根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中还向所述患者施用选自以下的一种或多种药剂:rAAV2.5-CMV-微小抗肌萎缩蛋白、SGT-001、rAAVrh74.MHCK7.微型抗肌萎缩蛋白、SRP-9001和GALGT2。

10.根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中还向所述患者施用选自以下的一种或多种药剂:依特普森(SRP-4051)、戈洛迪森(SRP-4053)、卡西默森(SRP-4045)、肽缀合的依特普森(SRP-5051)、SRP-5053、SRP-5045、SRP-5052、SRP-5044、SRP-5050、维托拉森(NS-065/NCNP-01)、NS-089/NCNP-02(外显子跳读44)、DS-5141b(外显子跳读45)、苏沃迪森(WVE-210,201)、德瑞萨泼森(PRO051)、PNA-ssODN、M12-PMO(外显子23跳读)和M12-PMO(外显子10跳读)。

11.根据权利要求10所述的方法,其中还向所述患者施用依特普森。

12.根据权利要求10所述的方法,其中还向所述患者施用戈洛迪森。

13.一种治疗与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂。

14.一种治疗、预防与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭的一种或多种共病或降低所述一种或多种共病的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂。

15.根据权利要求13-14中任一项所述的方法,其中所述患者患有HFrEF心力衰竭。

16.根据权利要求13-14中任一项所述的方法,其中所述肌肉萎缩疾病是肌营养不良。

17.根据权利要求14-16中任一项所述的方法,其中所述肌肉萎缩疾病是选自以下的肌营养不良:贝克肌营养不良(BMD)、先天性肌营养不良(CMD)、迪谢内肌营养不良(DMD)、埃默里-德赖弗斯肌营养不良(EDMD)、面肩胛肱型肌营养不良(FSHD)、肢带型肌营养不良(LGMD)、强直性肌营养不良(DM)、眼咽型肌营养不良(OPMD)和弗里德赖希共济失调肌营养

不良。

18.根据权利要求13-17中任一项所述的方法,其中所述肌营养不良是迪谢内肌营养不良(DMD)。

19.根据权利要求13-18中任一项所述的方法,其中所述肌营养不良与抗肌萎缩蛋白(DMD)基因中的一个或多个突变相关。

20.根据权利要求13-19中任一项所述的方法,其中还向所述患者施用选自以下的一种或多种药剂:终止密码子连读疗法、基于病毒载体的基因疗法、针对外显子跳读的反义寡核苷酸(AON)疗法、Ataluren has、肌营养相关蛋白过表达疗法、他达拉非、肌生成抑制蛋白抑制剂和细胞疗法。

21.根据权利要求13-20中任一项所述的方法,其中还向所述患者施用选自以下的一种或多种药剂:rAAV2.5-CMV-微小抗肌萎缩蛋白、SGT-001、rAAVrh74.MHCK7.微型抗肌萎缩蛋白、SRP-9001和GALGT2。

22.根据权利要求13-20中任一项所述的方法,其中还向所述患者施用选自以下的药剂中的一种或多种:依特普森(SRP-4051)、戈洛迪森(SRP-4053)、卡西默森(SRP-4045)、肽缀合的依特普森(SRP-5051)、SRP-5053、SRP-5045、SRP-5052、SRP-5044、SRP-5050、维托拉森(NS-065/NCNP-01)、NS-089/NCNP-02(外显子跳读44)、DS-5141b(外显子跳读45)、苏沃迪森(WVE-210,201)、德瑞萨泼森(PRO051)、PNA-ssODN、M12-PMO(外显子23跳读)和M12-PMO(外显子10跳读)。

23.根据权利要求22所述的方法,其中还向所述患者施用依特普森。

24.根据权利要求22所述的方法,其中还向所述患者施用戈洛迪森。

25.根据权利要求13-15中任一项所述的方法,其中所述肌肉萎缩疾病与选自以下的障碍中的一种或多种相关:肌肉萎缩(例如,脊髓灰质炎后肌肉萎缩(PPMA))、恶病质(例如,心脏性恶病质、AIDS恶病质和癌症恶病质)、营养不良、麻风、糖尿病、肾病、慢性阻塞性肺病(COPD)、癌症、终末期肾衰竭、肌少症、肺气肿、骨质软化、HIV感染和AIDS。

26.根据权利要求13-17中任一项所述的方法,其中所述肌营养不良是肢带型肌营养不良(LGMD)。

27.根据权利要求13-17中任一项所述的方法,其中所述肌营养不良与选自以下的基因中的一个或多个突变相关:肌收缩蛋白(MYOT)、核纤层蛋白A/C(LMNA)、小窝蛋白-3(CAV3)、卡配因-3(CAPN3)、Dysferlin(DYSF)、γ-肌聚糖蛋白(SGCG)、α-肌聚糖蛋白(SGCA)、β-肌聚糖蛋白(SGCB)、和/或δ-肌聚糖蛋白(SGCD)、fukutin相关蛋白(FKRP)、阿诺他明-5(ANO5)。

28.根据权利要求13-17中任一项所述的方法,其中还向所述患者施用选自以下的药剂中的一种或多种:SRP-9003、SRP-9004、SRP-9005、SRP-6004、SRP-9006和LGMD2A。

29.根据权利要求13-17中任一项所述的方法,其中所述肌营养不良是弗里德赖希共济失调肌营养不良。

30.根据权利要求13-17中任一项所述的方法,其中所述肌营养不良与共济蛋白基因(FXN)中的一个或多个突变相关。

31.根据权利要求13-17中任一项所述的方法,其中所述肌营养不良是强直性肌营养不良。

32.根据权利要求13-17中任一项所述的方法,其中所述肌营养不良与选自以下的基因

中的一个或多个突变相关:强直性肌营养不良蛋白激酶(DMPK)和CCHC型锌指核酸结合蛋白(CNBP)基因。

33.一种治疗与遗传性心肌病相关的心力衰竭的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂。

34.一种治疗、预防与遗传性心肌病相关的心力衰竭的一种或多种共病或降低所述一种或多种共病的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂。

35.根据权利要求33-34中任一项所述的方法,其中所述遗传性心肌病选自扩张型心肌病、肥厚型心肌病、致心律失常性心肌病、左心室致密化不全性心肌病和限制型心肌病。

36.根据权利要求33-35中任一项所述的方法,其中所述遗传性心肌病是扩张型心肌病。

37.一种治疗心力衰竭(HF)的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂。

38.一种治疗、预防心力衰竭的一种或多种共病或降低所述一种或多种共病的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂。

39.根据权利要求37-38中任一项所述的方法,其中所述心力衰竭是遗传性心肌病。

40.根据权利要求37-39中任一项所述的方法,其中所述心力衰竭是扩张型心肌病(DCM)。

41.根据权利要求37-40中任一项所述的方法,其中所述心力衰竭与迪谢内肌营养不良(DMD)相关。

42.根据权利要求37-41中任一项所述的方法,其中所述心力衰竭与抗肌萎缩蛋白(DMD)基因中的一个或多个突变相关。

43.根据权利要求37-42中任一项所述的方法,其中还向所述患者施用选自以下的一种或多种药剂:终止密码子连读疗法、基于病毒载体的基因疗法、针对外显子跳读的反义寡核苷酸(AON)疗法、Ataluренhas、肌营养相关蛋白过表达疗法、他达拉非、肌生成抑制蛋白抑制剂和细胞疗法。

44.根据权利要求37-43中任一项所述的方法,其中还向所述患者施用选自以下的一种或多种药剂:rAAV2.5-CMV-微小抗肌萎缩蛋白、SGT-001、rAAVrh74.MHCK7.微型抗肌萎缩蛋白、SRP-9001和GALGT2。

45.根据权利要求37-43中任一项所述的方法,其中还向所述患者施用选自以下的一种或多种药剂:依特普森(SRP-4051)、戈洛迪森(SRP-4053)、卡西默森(SRP-4045)、肽缀合的依特普森(SRP-5051)、SRP-5053、SRP-5045、SRP-5052、SRP-5044、SRP-5050、维托拉森(NS-065/NCNP-01)、NS-089/NCNP-02(外显子跳读44)、DS-5141b(外显子跳读45)、苏沃迪森(WVE-210,201)、德瑞萨泼森(PRO051)、PNA-ssODN、M12-PMO(外显子23跳读)和M12-PMO(外显子10跳读)。

46.根据权利要求45所述的方法,其中还向所述患者施用依特普森。

47.根据权利要求45所述的方法,其中还向所述患者施用戈洛迪森。

48.根据权利要求37-38中任一项所述的方法,其中所述心力衰竭与肢带型肌营养不良(LGMD)相关。

49.根据权利要求48所述的方法，其中所述心力衰竭与选自以下的基因中的一个或多个突变相关：肌收缩蛋白(MYOT)、核纤层蛋白A/C(LMNA)、小窝蛋白-3(CAV3)、卡配因-3(CAPN3)、Dysferlin(DYSF)、γ-肌聚糖蛋白(SGCG)、α-肌聚糖蛋白(SGCA)、β-肌聚糖蛋白(SGCB)、和/或δ-肌聚糖蛋白(SGCD)、fukutin相关蛋白(FKRP)、阿诺他明-5(ANO5)。

50.根据权利要求48-49中任一项所述的方法，其中还向所述患者施用选自以下的一种或多种药剂：SRP-9003、SRP-9004、SRP-9005、SRP-6004、SRP-9006和LGMD2A。

51.根据权利要求37-38中任一项所述的方法，其中所述心力衰竭与弗里德赖希共济失调肌营养不良相关。

52.根据权利要求37-38中任一项所述的方法，其中所述心力衰竭与共济蛋白基因(FXN)中的一个或多个突变相关。

53.根据权利要求37-38中任一项所述的方法，其中所述心力衰竭与强直性肌营养不良相关。

54.根据权利要求37-38中任一项所述的方法，其中所述心力衰竭与选自以下的基因中的一个或多个突变相关：强直性肌营养不良蛋白激酶(DMPK)和CCHC型锌指核酸结合蛋白(CNBP)基因。

55.根据权利要求37-38中任一项所述的方法，其中所述心力衰竭与肥厚型心肌病(HCM)相关。

56.根据权利要求37-38中任一项所述的方法，其中所述心力衰竭与致心律失常性心肌病(AC)相关。

57.根据权利要求37-38中任一项所述的方法，其中所述心力衰竭与左心室致密化不全性心肌病(LVNC)相关。

58.根据权利要求37-38中任一项所述的方法，其中所述心力衰竭与限制型心肌病(RC)相关。

59.根据权利要求37-58中任一项所述的方法，其中所述心力衰竭是射血分数保留的心力衰竭(HFpEF)。

60.根据权利要求59所述的方法，其中所述患者具有正常LVEF和≥50％的LVEF。

61.根据权利要求59-60中任一项所述的方法，其中所述患者具有升高水平的利尿钠肽。

62.根据权利要求37-58中任一项所述的方法，其中所述心力衰竭是射血分数降低的心力衰竭(HFrEF)。

63.根据权利要求62所述的方法，其中所述患者具有降低的LVEF和<40％的LVEF。

64.根据权利要求37-58中任一项所述的方法，其中所述心力衰竭是中间范围射血分数的心力衰竭(HFmrEF)。

65.根据权利要求62所述的方法，其中所述患者具有中间范围LVEF和在约40％与约49％之间的LVEF。

66.根据权利要求64-65中任一项所述的方法，其中所述患者具有升高水平的利尿钠肽。

67.根据权利要求1-66中任一项所述的方法，其中所述患者患有纽约心脏协会(NYHA)I级HF、NYHA II级HF、NYHA III级HF或NYHA IV级HF。

68.根据权利要求1-66中任一项所述的方法,其中所述方法降低所述患者的NYHA等级。

69.根据权利要求1-66中任一项所述的方法,其中所述方法将所述患者的NYHA等级从IV级降低至III级,从IV级降低至II级,从IV级降低至I级,从III级降低至II级,从III级降低至I级或者从II级降低至I级。

70.根据权利要求1-66中任一项所述的方法,其中所述患者患有美国心脏病学会基金会/美国心脏协会(ACCF/AHA)A期心力衰竭、ACCF/AHA B期心力衰竭、ACCF/AHA C期心力衰竭或ACCF/AHA D期心力衰竭。

71.根据权利要求1-66中任一项所述的方法,其中所述患者降低所述患者的ACCF/AHA分期。

72.根据权利要求1-66中任一项所述的方法,其中所述方法将所述患者的ACCF/AHA分期从D期降低至C期,从D期降低至B期,从D期降低至A期,从C期降低至B期,从C期降低至A期或者从B期降低至A期。

73.根据权利要求1-66中任一项所述的方法,其中所述患者患有HF合并AMI的Killip分级为I级的心力衰竭、HF合并AMI的Killip分级为II级的心力衰竭、HF合并AMI的Killip分级为III级的心力衰竭或HF合并AMI的Killip分级为IV级的心力衰竭。

74.根据权利要求1-66中任一项所述的方法,其中所述方法降低所述患者的HF合并AMI的Killip分级等级。

75.根据权利要求1-66中任一项所述的方法,其中所述方法将所述患者的Killip等级从IV级降低至III级,从IV级降低至II级,从IV级降低至I级,从III级降低至II级,从III级降低至I级或者从II级降低至I级。

76.根据权利要求1-66中任一项所述的方法,其中所述患者具有用于诊断HF的一项或多项主要弗雷明汉标准。

77.根据权利要求1-66中任一项所述的方法,其中所述患者患有选自以下的一种或多种病症:夜间阵发性呼吸困难或端坐呼吸、颈静脉怒张、啰音、X射线摄影心脏肥大、急性肺水肿、S3奔马律、大于16cm水柱的增加的静脉压、大于或等于25秒的循环时间、肝颈静脉反流以及响应于治疗在5天中大于或等于4.5kg的体重减轻。

78.根据权利要求1-66中任一项所述的方法,其中所述患者具有用于诊断HF的一项或多项次要弗雷明汉标准。

79.根据权利要求1-66中任一项所述的方法,其中所述患者患有选自以下的一种或多种病症:双侧踝水肿、夜间咳嗽、普通劳作时呼吸困难、肝肿大、胸腔积液、肺活量从最高记录减小1/3以及心动过速(心率大于120/min)。

80.根据权利要求1-66中任一项所述的方法,其中所述患者具有至少两项弗雷明汉主要标准。

81.根据权利要求1-66中任一项所述的方法,其中所述患者具有至少一项主要弗雷明汉标准和至少两项次要弗雷明汉标准。

82.根据权利要求1-66中任一项所述的方法,其中所述方法减少所述患者具有的用于心力衰竭的弗雷明汉标准的数量。

83.根据权利要求1-66中任一项所述的方法,其中所述方法减少所述患者具有的用于心力衰竭的主要弗雷明汉标准的数量。

84.根据权利要求1-66中任一项所述的方法，其中所述方法减少所述患者具有的用于心力衰竭的次要弗雷明汉标准的数量。

85.根据权利要求1-66中任一项所述的方法，其中所述患者患有选自以下的一种或多种病症：HF的典型症状、不太典型的症状、特异性体征和较低特异性体征。

86.根据权利要求1-66中任一项所述的方法，其中所述患者具有选自以下的一种或多种症状：呼吸急促、端坐呼吸、夜间阵发性呼吸困难、运动耐力降低、疲劳、疲乏、运动后恢复时间延长以及踝肿胀。

87.根据权利要求1-66中任一项所述的方法，其中所述患者具有选自以下的一种或多种不太典型的症状：夜间咳嗽、哮鸣、胀气感、食欲不振、意识错乱(尤其在老年人中)、抑郁、心悸、头晕、晕厥和俯身呼吸困难。

88.根据权利要求1-66中任一项所述的方法，其中所述患者具有HF的一种或多种体征。

89.根据权利要求1-66中任一项所述的方法，其中所述患者具有选自以下的HF的一种或多种体征：颈静脉压升高、肝颈静脉反流、第三心音(奔马律)、心尖冲动侧移位。在一些实施方案中，患者具有HF的一种或多种较低特异性体征。

90.根据权利要求1-66中任一项所述的方法，其中所述患者具有HF的一种或多种较低特异性体征。

91.根据权利要求1-66中任一项所述的方法，其中所述患者具有选自以下的HF的一种或多种较低特异性体征：体重增加(>2kg/周)、体重减轻(在晚期HF中)、组织消耗(恶病质)、心脏杂音、外周性水肿(踝、骶骨、阴囊)、肺捻发音、进气减少和肺底叩诊浊音(胸腔积液)、心动过速、不规则脉搏、呼吸急促、陈-施呼吸、肝肿大、腹水、手足厥冷、少尿和脉压窄。

92.根据权利要求1-66中任一项所述的方法，其中所述方法减少所述患者具有的心力衰竭的体征和/或症状的数量。

93.根据权利要求1-66中任一项所述的方法，其中所述患者减少所述患者具有的心力衰竭的体征的数量。

94.根据权利要求1-66中任一项所述的方法，其中所述方法减少所述患者具有的心力衰竭的症状的数量。

95.根据权利要求1-94中任一项所述的方法，其中所述患者具有如与健康患者相比升高的脑利尿钠肽(BNP)水平。

96.根据权利要求95所述的方法，其中所述患者的BNP水平为至少35pg/mL(例如，35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、300、400、500、1000、3000、5000、10,000、15,000或20,000pg/mL)。

97.根据权利要求95或权利要求96所述的方法，其中所述方法将所述患者的BNP水平降低至少5％(例如，5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％或至少80％)。

98.根据权利要求95-97中任一项所述的方法，其中所述方法将所述患者的BNP水平降低至少5pg/mL(例如，5、10、50、100、200、500、1000或5000pg/mL)。

99.根据权利要求1-98中任一项所述的方法，其中所述方法将BNP水平降低至正常水平(即，<100pg/ml)。

100.根据权利要求1-95中任一项所述的方法，其中所述患者具有如与健康患者相比升

高的N末端pro-BNP(NT-proBNP)水平。

101.根据权利要求100所述的方法,其中所述患者的NT-proBNP水平为至少10pg/mL(例如,10、25、50、100、150、200、300、400、500、1000、3000、5000、10,000、15,000或20,000pg/mL)。

102.根据权利要求100或权利要求101所述的方法,其中所述方法将所述患者的NT-proBNP水平降低至少5%(例如,5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或至少80%)。

103.根据权利要求95-97中任一项所述的方法,其中所述方法将所述患者的NT-proBNP水平降低至少10pg/mL(例如,10、25、50、100、200、500、1000、5000、10,000、15,000、20,000或25,000pg/mL)。

104.根据权利要求1-103中任一项所述的方法,其中所述方法将NT-proBNP水平降低至正常水平(即,<100pg/ml)。

105.根据权利要求1-104中任一项所述的方法,其中所述方法具有如与健康患者相比升高的肌钙蛋白水平。

106.根据权利要求105所述的方法,其中所述方法将所述患者的肌钙蛋白水平降低至少1%(例如,1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或至少80%)。

107.根据权利要求1-106中任一项所述的方法,其中所述方法降低所述患者的左心室肥大。

108.根据权利要求107所述的方法,其中所述方法将所述患者的左心室肥大降低至少1%(例如,1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或至少50%)。

109.根据权利要求1-108中任一项所述的方法,其中所述方法将所述患者的住院率降低至少1%(例如,1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。

110.根据权利要求1-109中任一项所述的方法,其中所述方法将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少1%(例如,1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。

111.根据权利要求1-110中任一项所述的方法,其中所述患者患有左心室(LV)的舒张功能障碍。

112.根据权利要求1-111中任一项所述的方法,其中所述患者患有左心室(LV)的收缩功能障碍。

113.根据权利要求1-112中任一项所述的方法,其中所述方法将所述患者的LV舒张功能增加至少5%(例如,5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。

114.根据权利要求1-113中任一项所述的方法,其中所述患者的射血分数小于45%(例如,10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%或45%)。

115.根据权利要求1-114中任一项所述的方法,其中所述患者将射血分数增加至正常水平(即,>45%)。

116.根据权利要求114或权利要求115所述的方法,其中所述方法将所述患者的心排血

量增加至少5％(例如,5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％或至少80％)。

117.根据权利要求1-116中任一项所述的方法,其中所述方法将所述患者的射血分数增加至少1％(例如,1％、5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％或至少80％)。

118.根据权利要求1-117中任一项所述的方法,其中所述方法增加所述患者的运动能力。

119.根据权利要求1-118中任一项所述的方法,其中所述患者的6分钟步行距离为150至400米。

120.根据权利要求1-119中任一项所述的方法,其中所述方法增加所述患者的6分钟步行距离。

121.根据权利要求1-120中任一项所述的方法,其中所述方法将所述患者的6分钟步行距离增加至少10米(例如,至少10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、250、300或超过400米)。

122.根据权利要求1-121中任一项所述的方法,其中所述方法降低所述患者的博格呼吸困难指数(BDI)。

123.根据权利要求1-122中任一项所述的方法,其中所述方法将所述患者的BDI降低至少0.5个指数点(例如,至少0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10个指数点)。

124.根据权利要求1-123中任一项所述的方法,其中使用超声心动图显像、心脏磁共振成像(CMR)和/或具有心肌延迟强化(LGE)的CMR评估所述患者的心力衰竭。

125.根据权利要求1-124中任一项所述的方法,其中针对选自以下的条件中的一种或多种来评估所述患者:LV结构和收缩功能(例如,在乳头肌水平上在胸骨旁短轴观中通过M模式测量),包括但不限于LV壁厚度(LVWT)、LV质量(LVM)、LV舒张末径(LVEDD)、LV收缩末径(LVESD)、缩短分数(FS)(使用等式FS＝100％×[(EDD-ESD)/EDD]来计算)、LV舒张末期容积(LVEDV)、LV收缩末期容积(LVESV)、射血分数(使用等式EF＝100％×[(EDV-ESV)/EDV]来计算)、肥大指数(计算为LVM与LVESV的比率)以及相对壁厚度(计算为LVWT与LVESD的比率)。

126.根据权利要求1-125中任一项所述的方法,其中使用选自以下的心脏成像来评估所述患者的心力衰竭:多闸门式造影(MUGA)、胸部X线检查、单光子发射计算机体层摄影(SPECT)和放射性核苷酸心室造影、正电子发射体层摄影(PET)、冠状动脉造影以及心脏计算机体层摄影(CT)。

127.根据权利要求1-126中任一项所述的方法,所述方法还包括向所述患者施用另外的支持疗法或活性剂。

128.根据权利要求127所述的方法,其中所述另外的支持疗法或活性剂选自:血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂、β阻断剂、血管紧张素II受体阻断剂(ARB)、盐皮质激素/醛固酮受体拮抗剂(MRA)、糖皮质激素、他汀、钠-葡萄糖协同转运蛋白2(SGLT2)抑制剂、植入型心律转复除颤器(ICD)、血管紧张素受体肾胰岛素残基溶酶抑制剂(ARNI)和利尿剂。

129.根据权利要求127所述的方法,其中所述另外的活性剂和/或支持疗法选自:苯扎普利、卡托普利、依那普利、赖诺普利、培哚普利、雷米普利(例如,雷米平)、群多普利、佐芬

普利、醋丁洛尔、阿替洛尔、倍他洛尔、比索洛尔、卡替洛尔、卡维地洛、拉贝洛尔、美托洛尔、纳多洛尔、奈必洛尔、喷布洛尔、吲哚洛尔、普萘洛尔、索他洛尔、噻吗洛尔;氯沙坦、厄贝沙坦、奥美沙坦、坎地沙坦、缬沙坦、非马沙坦、阿齐沙坦、沙普利沙坦、替米沙坦、孕酮、依普利酮and螺内酯、倍氯米松、倍他米松、布地奈德、可的松、地夫可特、地塞米松、氢化可的松、甲泼尼龙、泼尼松龙、甲基泼尼松、泼尼松、曲安西龙、非奈利酮、阿托伐他汀(Lipitor)、氟伐他汀(Lescol)、洛伐他汀(Mevacor、Altocor)、普伐他汀(Pravachol)、匹伐他汀(Livalo)、斯伐他汀(Zocor)、瑞舒伐他汀(Crestor)、卡格列净、达格列净(例如,Farxiga)、恩格列净、缬沙坦和沙库必曲(肾胰岛素残基溶酶抑制剂)、呋塞米、布美他尼、托拉塞米、苄氟噻嗪、氢氯噻嗪、美托拉宗、吲达帕胺、螺内酯/依普利酮、阿米洛利氨苯蝶啶、肼屈嗪和硝酸异山梨酯、地高辛、洋地黄、N-3多不饱和脂肪酸(PUFA)以及I_f通道抑制剂(例如,伊伐布雷定)。

130.根据权利要求1-129中任一项所述的方法,其中所述患者患有选自以下的共病:高龄、贫血、动脉高血压、心房颤动、认知功能障碍、糖尿病、高胆固醇血症、铁缺乏、肾功能障碍、代谢综合征、肥胖症、身体去适应作用、钾紊乱、肺病(例如,COPD)和睡眠呼吸暂停。

131.根据权利要求1-130中任一项所述的方法,其中所述ActRII-ALK4拮抗剂包括ActRIIA多肽。

132.根据权利要求1-130中任一项所述的方法,其中所述ActRII-ALK4拮抗剂是异多聚体。

133.根据权利要求1-132中任一项所述的方法,其中所述ActRIIA多肽包含与在SEQ ID NO:366的氨基酸21、22、23、24、25、26、27、28、29或30中的任一个处开始并且在SEQ ID NO:366的氨基酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134或135中的任一个处结束的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

134.根据权利要求1-132中任一项所述的方法,其中所述ActRIIA多肽包含与在SEQ ID NO:366的氨基酸21、22、23、24、25、26、27、28、29或30中的任一个处开始并且在SEQ ID NO:367的氨基酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134或135中的任一个处结束的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

135.根据权利要求1-132中任一项所述的方法,其中所述ActRIIA多肽包含与在SEQ ID NO:366的氨基酸21、22、23、24、25、26、27、28、29或30中的任一个处开始并且在SEQ ID NO:368的氨基酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134或135中的任一个处结束的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

136.根据权利要求1-135中任一项所述的方法,其中所述ActRIIA多肽是包含ActRIIA多肽结构域和一个或多个异源结构域的融合多肽。

137.根据权利要求1-136中任一项所述的方法,其中所述ActRIIA多肽是ActRIIA-Fc融合多肽。

138.根据权利要求136或137中任一项所述的方法，其中所述融合多肽还包含定位于所述ActRIIA多肽结构域与所述一个或多个异源结构域或Fc结构域之间的接头结构域。

139.根据权利要求138所述的方法，其中所述接头结构域选自：TGGG、TGGGG、SGGGG、GGGGS、GGG、GGGG、SGGG和GGGGS。

140.根据权利要求137-139中任一项所述的方法，其中所述多肽包含与SEQ ID NO:380的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

141.根据权利要求137-139中任一项所述的方法，其中所述多肽包含与SEQ ID NO:378的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

142.根据权利要求1-141中任一项所述的方法，其中所述ActRII-ALK4拮抗剂是同二聚体多肽。

143.根据权利要求1-141中任一项所述的方法，其中所述ActRII-ALK4拮抗剂是异多聚体多肽。

144.根据权利要求143所述的方法，其中所述异多聚体多肽包含ActRIIA多肽和ALK4多肽。

145.根据权利要求143所述的方法，其中所述异多聚体多肽包含ActRIIA多肽和ALK7多肽。

146.根据权利要求144所述的方法，其中所述ALK4多肽包含与选自SEQ ID NO:84、85、86、87、88、89、92、93、247、249、421、422的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

147.根据权利要求145所述的方法，其中所述ALK7多肽包含与选自SEQ ID NO:120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、133和134的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

148.根据权利要求144或146中任一项所述的方法，其中所述ALK4多肽是包含ALK4多肽结构域和一个或多个异源结构域的融合多肽。

149.根据权利要求145或147中任一项所述的方法，其中所述ALK7多肽是包含ALK7多肽结构域和一个或多个异源结构域的融合多肽。

150.根据权利要求148所述的方法，其中所述ALK4多肽是ALK4-Fc融合多肽。

151.根据权利要求149所述的方法，其中所述ALK7多肽是ALK7-Fc融合多肽。

152.根据权利要求150所述的方法，其中所述ALK4-Fc融合多肽还包含定位于所述ALK4多肽结构域与所述一个或多个异源结构域或Fc结构域之间的接头结构域。

153.根据权利要求151所述的方法，其中所述ALK7-Fc融合多肽还包含定位于所述ALK7多肽结构域与所述一个或多个异源结构域或Fc结构域之间的接头结构域。

154.根据权利要求152-153中任一项所述的方法，其中所述接头结构域选自：TGGG、TGGGG、SGGGG、GGGGS、GGG、GGGG、SGGG和GGGGS。

155.根据权利要求136、137、148、150或152中任一项所述的方法，其中所述异多聚体包含选自以下的Fc结构域：

a.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域；

b.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域；

c.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域；

d.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域；以及

e.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域。

156.根据权利要求136、137、149、151或153中任一项所述的方法，其中所述异多聚体包含选自以下的Fc结构域：

a.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域；

b.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域；

c.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所

述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域；

d.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域；以及

e.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域。

157.根据权利要求136、137、148、150或152中任一项所述的方法，其中所述异多聚体包含选自以下的Fc结构域：

a.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域；以及

b.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域。

158.根据权利要求136、137、149、151或153中任一项所述的方法，其中所述异多聚体包含选自以下的Fc结构域：

a.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域；以及

b.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域。

159.根据权利要求136、137、148、150或152中任一项所述的方法，其中所述异多聚体包含选自以下的Fc结构域：

a.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域;以及

b.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域。

160.根据权利要求136、137、149、151或153中任一项所述的方法，其中所述异多聚体包含选自以下的Fc结构域：

a.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域;以及

b.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域。

161.根据权利要求136、137、148、150或152中任一项所述的方法，其中所述异多聚体包含选自以下的Fc结构域：

a.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域;以及

b.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域。

162.根据权利要求136、137、149、151或153中任一项所述的方法，其中所述异多聚体包含选自以下的Fc结构域：

a.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、

92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域;以及

b.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域。

163.根据权利要求136、137、148、150或152中任一项所述的方法,其中所述异多聚体包含选自以下的Fc结构域:

a.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域;以及

b.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域。

164.根据权利要求136、137、149、151或153中任一项所述的方法,其中所述异多聚体包含选自以下的Fc结构域:

a.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域;以及

b.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域。

165.根据权利要求136、137、148、150或152中任一项所述的方法,其中所述异多聚体包含选自以下的Fc结构域:

a.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域;以及

b.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少75%、80%、85%、

90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、

99％或100％相同的Fc结构域。

166.根据权利要求136、137、149、151或153中任一项所述的方法，其中所述异多聚体包含选自以下的Fc结构域：

a.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、

99％或100％相同的Fc结构域；以及

b.所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、

99％或100％相同的Fc结构域。

167.根据权利要求136、137、148、150或152中任一项所述的方法，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

168.根据权利要求136、137、149、151或153中任一项所述的方法，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

169.根据权利要求167所述的方法，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置138处的谷氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置217处的天冬氨酸，并且其中所述ALK4-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在位置146处的丙氨酸、在氨基酸位置162处的精氨酸、在氨基酸位置179处的精氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

170.根据权利要求168所述的方法，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置138处的谷氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置217处的天冬氨酸，并且其中所述ALK7-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在位置146处的丙氨酸、在氨基酸位置162处的精氨酸、在氨基酸位置179处的精氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

171.根据权利要求136、137、148、150或152中任一项所述的方法，其中所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ActRIIA-Fc融合多肽

包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

172.根据权利要求136、137、149、151或153中任一项所述的方法，其中所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

173.根据权利要求171所述的方法，其中所述ALK4-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置138处的谷氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置217处的天冬氨酸，并且其中所述ActRIIA-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在位置146处的丙氨酸、在氨基酸位置162处的精氨酸、在氨基酸位置179处的精氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

174.根据权利要求172所述的方法，其中所述ALK7-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置138处的谷氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置217处的天冬氨酸，并且其中所述ActRIIA-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在位置146处的丙氨酸、在氨基酸位置162处的精氨酸、在氨基酸位置179处的精氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

175.根据权利要求136、137、148、150或152中任一项所述的方法，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

176.根据权利要求136、137、149、151或153中任一项所述的方法，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

177.根据权利要求175所述的方法，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置435处的精氨酸，并且其中所述ALK4-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

178.根据权利要求176所述的方法，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置435处的精氨酸，并且其中所述ALK7-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

179.根据权利要求136、137、148、150或152中任一项所述的方法，其中所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、

95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

180.根据权利要求136、137、149、151或153中任一项所述的方法，其中所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

181.根据权利要求179所述的方法，其中所述ALK4-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置435处的精氨酸，并且其中所述ActRIIA-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

182.根据权利要求180所述的方法，其中所述ALK7-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置435处的精氨酸，并且其中所述ActRIIA-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

183.根据权利要求1-130中任一项所述的方法，其中所述ActRII-ALK4拮抗剂包括ActRIIB多肽。

184.根据权利要求1-130中任一项所述的方法，其中所述ActRII-ALK4拮抗剂是异多聚体。

185.根据权利要求1-130或183中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽包含与在SEQ ID NO:2的氨基酸20-29中的任一个(例如，氨基酸残基20、21、22、23、24、25、26、27、28或29)处开始并且在SEQ ID NO:2的氨基酸109-134中的任一个(例如，氨基酸残基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)处结束的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

186.根据权利要求1-130、183或185中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:2的氨基酸29-109至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

187.根据权利要求1-130、183、185或186中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:2的氨基酸25-131至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

188.根据权利要求1-130、183、185、186或187中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:2的氨基酸20-134至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

189.根据权利要求1-130、183、185、186、187中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:53的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

190.根据权利要求1-130、183、185、186、187中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:388的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

191.根据权利要求1-130、183、185、186、187中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:389的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

192.根据权利要求1-130、183、185、186、187、188、189、190或191中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽是包含ActRIIB多肽结构域和一个或多个异源结构域的融合多肽。

193.根据权利要求1-130、183、185、186、187、188、189、190、191或192中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽是ActRIIB-Fc融合多肽。

194.根据权利要求192或193中任一项所述的方法，其中所述融合多肽还包含定位于所述ActRIIB多肽结构域与所述一个或多个异源结构域或Fc结构域之间的接头结构域。

195.根据权利要求194所述的方法，其中所述接头结构域选自：TGGG、TGGGG、SGGGG、GGGGS、GGG、GGGG、SGGG和GGGGS。

196.根据权利要求193-195中任一项所述的方法，其中所述多肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

197.根据权利要求193-195中任一项所述的方法，其中所述多肽包含与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

198.根据权利要求1-130、183、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196或197中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽包含关于SEQ ID NO:2的氨基酸序列选自以下的一个或多个氨基酸取代：L38N、E50L、E52N、L57E、L57I、L57R、L57T、L57V、Y60D、G68R、K74E、W78Y、L79F、L79S、L79T、L79W、F82D、F82E、F82L、F82S、F82T、F82Y、N83R、E94K和V99G。

199.根据权利要求1-130、183、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196或197中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽包含关于SEQ ID NO:2的氨基酸序列选自以下的一个或多个氨基酸取代：L38N、E50L、E52D、E52N、E52Y、L57E、L57I、L57R、L57T、L57V、Y60D、G68R、K74E、W78Y、L79E、L79F、L79H、L79R、L79S、L79T、L79W、F82D、F82E、F82I、F82K、F82L、F82S、F82T、F82Y、N83R、E94K和V99G。

200.根据权利要求1-130或183-2199中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的E50的位置处的L取代。

201.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L38的位置处的N取代。

202.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的V99的位置处的G取代。

203.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的N83的位置处的R取代。

204.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的T取代。

205.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的H取代。

206.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法，其中所述多肽包含与SEQ ID NO:276的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

207.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法，其中所述多肽包含与SEQ ID NO:278的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

208.根据权利要求1-130、183-199、220或221中任一项所述的方法，其中所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的I取代和在对应于N83的位置处的R取代。

209.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法，其中所述多肽包含与SEQ ID NO:279的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

210.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法，其中所述多肽包含与SEQ ID NO:332的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

211.根据权利要求1-130、183-199、209或210中任一项所述的方法，其中所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的K取代和在对应于N83的位置处的R取代。

212.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法，其中所述多肽包含与SEQ ID NO:333的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

213.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法，其中所述多肽包含与SEQ ID NO:335的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

214.根据权利要求1-130、183-199、212或213中任一项所述的方法，其中所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的T取代和在对应于N83的位置处的R取代。

215.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法，其中所述多肽包含与SEQ ID NO:336的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

216.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法，其中所述多肽包含与SEQ ID NO:338的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

217.根据权利要求1-130、183-199、215或216中任一项所述的方法，其中所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的T取代。

218.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法，其中所述多肽包含与SEQ ID NO:339的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

219.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法，其中所述多肽包含与SEQ ID NO:341的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

220.根据权利要求1-130、183-199、218或219中任一项所述的方法，其中所述多肽包含

在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的H取代和在对应于F82的位置处的I取代。

221.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:342的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

222.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:344的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

223.根据权利要求1-130、183-199、221或222中任一项所述的方法,其中所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的H取代。

224.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:345的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

225.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:347的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

226.根据权利要求1-130、183-199、224或225中任一项所述的方法,其中所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的H取代和在对应于F82位置处的K取代。

227.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:348的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

228.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:350的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

229.根据权利要求1-130、183-199、227或228中任一项所述的方法,其中所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的E50的位置处的L取代。

230.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:351的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

231.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:353的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

232.根据权利要求1-130或183-199、230或231中任一项所述的方法,其中所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L38的位置处的N取代和在对应于L79的位置处的R取代。

233.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:354的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

234.根据权利要求1-130或183-199中任一项所述的方法,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:356的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

235.根据权利要求1-130或183-199、233或234中任一项所述的方法，其中所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的V99的位置处的G取代。

236.根据权利要求1-130或183-235中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽是同二聚体多肽。

237.根据权利要求1-130或183-235中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽是异二聚体多肽。

238.根据权利要求1-130或183-237中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽包含与在SEQ ID NO:2的氨基酸20-29中的任一个(例如，氨基酸残基20、21、22、23、24、25、26、27、28或29)处开始并且在SEQ ID NO:2的氨基酸109-134中的任一个(例如，氨基酸残基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)处结束的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列；以及在SEQ ID NO:2的选自以下的位置处的一个或多个氨基酸取代：L38N、E50L、E52N、L57E、L57I、L57R、L57T、L57V、Y60D、G68R、K74E、W78Y、L79F、L79S、L79T、L79W、F82D、F82E、F82L、F82S、F82T、F82Y、N83R、E94K和V99G。

239.根据权利要求1-130或183-237中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽包含与在SEQ ID NO:2的氨基酸20-29中的任一个(例如，氨基酸残基20、21、22、23、24、25、26、27、28或29)处开始并且在SEQ ID NO:2的氨基酸109-134中的任一个(例如，氨基酸残基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)处结束的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列；以及在SEQ ID NO:2的选自以下的位置处的一个或多个氨基酸取代：L38N、E50L、E52D、E52N、E52Y、L57E、L57I、L57R、L57T、L57V、Y60D、G68R、K74E、W78Y、L79E、L79F、L79H、L79R、L79S、L79T、L79W、F82D、F82E、F82I、F82K、F82L、F82S、F82T、F82Y、N83R、E94K和V99G。

240.根据权利要求238或239所述的方法，其中所述ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:2的氨基酸29-109至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

241.根据权利要求238或239所述的方法，其中所述ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:2的氨基酸25-131至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

242.根据权利要求238或239所述的方法，其中所述ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:2的氨基酸20-134至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

243.根据权利要求238或239所述的方法，其中所述ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:53的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

244.根据权利要求1-130、183、185、186、187中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:388的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

245.根据权利要求1-130、183、185、186、187中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:389的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

246.根据权利要求1-130或238-245中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽包含关于SEQ ID NO:2的氨基酸序列选自以下的一个或多个氨基酸取代：L38N、E50L、E52D、E52N、E52Y、L57E、L57I、L57R、L57T、L57V、Y60D、G68R、K74E、W78Y、L79E、L79F、L79H、L79R、L79S、L79T、L79W、F82D、F82E、F82I、F82K、F82L、F82S、F82T、F82Y、N83R、E94K和V99G。

247.根据权利要求1-130或183-246所述的方法，其中所述异多聚体多肽包含ActRIIA多肽和ALK4多肽。

248.根据权利要求1-130或183-246所述的方法，其中所述异多聚体多肽包含ActRIIA多肽和ALK7多肽。

249.根据权利要求247所述的方法，其中所述ALK4多肽包含与选自SEQ ID NO:84、85、86、87、88、89、92、93、247、249、421、422的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

250.根据权利要求248所述的方法，其中所述ALK7多肽包含与选自SEQ ID NO:120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、133和134的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

251.根据权利要求1-130或183-246中任一项所述的方法，其中所述ActRIIB多肽是包含ActRIIB多肽结构域和一个或多个异源结构域的融合多肽。

252.根据权利要求247或249中任一项所述的方法，其中所述ALK4多肽是包含ALK4多肽结构域和一个或多个异源结构域的融合多肽。

253.根据权利要求248或250中任一项所述的方法，其中所述ALK7多肽是包含ALK7多肽结构域和一个或多个异源结构域的融合多肽。

254.根据权利要求251所述的方法，其中所述ActRIIB多肽是ActRIIB-Fc融合多肽。

255.根据权利要求252所述的方法，其中所述ALK4多肽是ALK4-Fc融合多肽。

256.根据权利要求253所述的方法，其中所述ALK7多肽是ALK7-Fc融合多肽。

257.根据权利要求251或权利要求254所述的方法，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽还包含定位于所述ActRIIB多肽结构域与所述一个或多个异源结构域或Fc结构域之间的接头结构域。

258.根据权利要求252或权利要求255所述的方法，其中所述ALK4-Fc融合多肽还包含定位于所述ALK4多肽结构域与所述一个或多个异源结构域或Fc结构域之间的接头结构域。

259.根据权利要求253或权利要求256所述的方法，其中所述ALK7-Fc融合多肽还包含定位于所述ALK7多肽结构域与所述一个或多个异源结构域或Fc结构域之间的接头结构域。

260.根据权利要求257-259中任一项所述的方法，其中所述接头结构域选自：TGGG、TGGGG、SGGGG、GGGGS、GGG、GGGG、SGGG和GGGGS。

261.根据权利要求254、255、257、或258中任一项的方法，其中所述异多聚体包含选自以下的Fc结构域：

a.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少75％、80％、85％、

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域；

b.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域；

c.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域；

d.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域；以及

e.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

262.根据权利要求254、256、257、或259中任一项的方法，其中所述异多聚体包含选自以下的Fc结构域：

a.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域；

b.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域；

c.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域；

d.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域；以及

e.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所

述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

263.根据权利要求254、255、257、或258中任一项的方法，其中所述异多聚体包含选自以下的Fc结构域：

a.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域；以及

b.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

264.根据权利要求254、256、257、或259中任一项的方法，其中所述异多聚体包含选自以下的Fc结构域：

a.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域；以及

b.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

265.根据权利要求254、255、257、或258中任一项的方法，其中所述异多聚体包含选自以下的Fc结构域：

a.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域；以及

b.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

266.根据权利要求254、256、257、或259中任一项的方法，其中所述异多聚体包含选自以下的Fc结构域：

a.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域；以及

b.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少75%、80%、85%、

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

267.根据权利要求254、255、257、或258中任一项的方法，其中所述异多聚体包含选自以下的Fc结构域：

a.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域；以及

b.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

268.根据权利要求254、256、257、或259中任一项的方法，其中所述异多聚体包含选自以下的Fc结构域：

a.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域；以及

b.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

269.根据权利要求254、255、257、或258中任一项的方法，其中所述异多聚体包含选自以下的Fc结构域：

a.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域；以及

b.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

270.根据权利要求254、256、257、或259中任一项的方法，其中所述异多聚体包含选自以下的Fc结构域：

a.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域;以及

b.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域。

271.根据权利要求254、255、257、或258中任一项的方法,其中所述异多聚体包含选自以下的Fc结构域:

a.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域;以及

b.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域。

272.根据权利要求254、256、257、或259中任一项的方法,其中所述异多聚体包含选自以下的Fc结构域:

a.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域;以及

b.所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%相同的Fc结构域。

273.根据权利要求254、255、257、或258中任一项的方法,其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

274.根据权利要求254、256、257、或259中任一项的方法,其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、

96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

275.根据权利要求273所述的方法，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置138处的谷氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置217处的天冬氨酸，并且其中所述ALK4-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在位置146处的丙氨酸、在氨基酸位置162处的精氨酸、在氨基酸位置179处的精氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

276.根据权利要求274所述的方法，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置138处的谷氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置217处的天冬氨酸，并且其中所述ALK7-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在位置146处的丙氨酸、在氨基酸位置162处的精氨酸、在氨基酸位置179处的精氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

277.根据权利要求254、255、257、或258中任一项的方法，其中所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

278.根据权利要求254、256、257、或259中任一项的方法，其中所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

279.根据权利要求277所述的方法，其中所述ALK4-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置138处的谷氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置217处的天冬氨酸，并且其中所述ActRIIB-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在位置146处的丙氨酸、在氨基酸位置162处的精氨酸、在氨基酸位置179处的精氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

280.根据权利要求278所述的方法，其中所述ALK7-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置138处的谷氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置217处的天冬氨酸，并且其中所述ActRIIB-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在位置146处的丙氨酸、在氨基酸位置162处的精氨酸、在氨基酸位置179处的精氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

281.根据权利要求254、255、257、或258中任一项的方法，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

282.根据权利要求254、256、257、或259中任一项的方法，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与

SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

283.根据权利要求281所述的方法，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置435处的精氨酸，并且其中所述ALK4-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

284.根据权利要求282所述的方法，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置435处的精氨酸，并且其中所述ALK7-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

285.根据权利要求254、255、257、或258中任一项的方法，其中所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

286.根据权利要求254、256、257、或259中任一项的方法，其中所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

287.根据权利要求285所述的方法，其中所述ALK4-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置435处的精氨酸，并且其中所述ActRIIB-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

288.根据权利要求286所述的方法，其中所述ALK7-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置435处的精氨酸，并且其中所述ActRIIB-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

289.根据权利要求1-130中任一项所述的方法，其中所述ActRII-ALK4拮抗剂是卵泡抑制素多肽。

290.根据权利要求289所述的方法，其中所述卵泡抑制素多肽与选自SEQ ID NO:390、391、392、393和394的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

291.根据权利要求1-290中任一项所述的方法，其中所述ActRII-ALK4拮抗剂抑制选自以下的一种或多种配体：激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10、ALK4、ActRIIA和ActRIIB。

292.根据权利要求1-130中任一项所述的方法，其中所述ActRII-ALK4拮抗剂是抗体或抗体组合。

293.根据权利要求292所述的方法，其中所述抗体或抗体组合与选自以下的一种或多

种配体结合:激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10、ALK4、ActRIIA和ActRIIB。

294.根据权利要求292-293中任一项所述的方法,其中所述抗体是多特异性抗体。

295.根据权利要求292-293所述的方法,所述抗体是双特异性抗体。

296.根据权利要求1-130中任一项所述的方法,其中所述ActRII-ALK4拮抗剂是小分子或小分子组合。

297.根据权利要求296所述的方法,其中所述小分子或小分子组合抑制选自以下的一种或多种配体:激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10、ALK4、ActRIIA和ActRIIB。

298.根据权利要求1-130中任一项所述的方法,其中所述ActRII-ALK4拮抗剂是多核苷酸或多核苷酸组合。

299.根据权利要求298所述的方法,其中所述多核苷酸或多核苷酸组合抑制选自以下的一种或多种配体:激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10、ALK4、ActRIIA和ActRIIB。

ACTRII-ALK4拮抗剂和治疗心力衰竭的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年6月17日提交的美国临时申请号63/040,400和2021年3月10日提交的美国临时申请号63/159,003的优先权权益。将前述申请的说明书通过引用以其整体并入本文。

背景技术

[0003] 心力衰竭(HF)的患病率取决于应用的定义,但是其影响发达国家大约1-2%的成人群体,在年龄为70岁的人中上升至≥10%。在用力时呼吸困难的就诊于基层医疗保健的年龄为65岁的人中,六个中有一个将患有未被认知的HF(主要是HFpEF)。HF在年龄55岁时的终身风险对于男性为33%且对于女性为28%。患有HFpEF的患者的比例的范围为22%至73%,根据以下而定:应用的定义、临床环境(基层医疗保健、医院门诊和入院)、所研究群体的年龄和性别、既往心肌梗死以及公布年份。

[0004] 扩张型心肌病,心力衰竭中涉及的许多遗传性心肌病中的一种,定义为左心室扩张和收缩功能障碍的存在。尤其涉及编码细胞骨架、肌节和核被膜蛋白的基因的基因突变占病例的高达35%。最常见的主要症状涉及充血性心力衰竭,但是还可以包括循环衰竭、心律失常和血栓栓塞事件。具有最低射血分数或严重舒张功能障碍的个体的预后最差。慢性心力衰竭的治疗包括改善存活并减少入院的一般心力衰竭药物,即,血管紧张素转换酶抑制剂和β阻断剂。

[0005] 因此,存在对用于治疗心力衰竭(例如,遗传性心肌病,包括DCM)的有效疗法的未满足的高需求。因此,本公开文本的目标是提供用于治疗、预防心力衰竭或降低心力衰竭的进展率和/或严重性,特别是治疗、预防一种或多种心力衰竭相关共病或降低一种或多种心力衰竭相关共病的进展率和/或严重性的方法。

发明内容

[0006] 如本文所述,ActRII-ALK4拮抗剂在治疗心力衰竭方面是有效的。特定地,在与射血分数降低相关的心力衰竭的鼠Mdx模型中,ActRIIB-ALK4异二聚体蛋白质显示心脏保护作用。例如,本文所呈现数据显示,用ActRIIB-ALK4异二聚体治疗对与该心力衰竭模型相关的多种并发症具有积极作用,包括但不限于LV收缩性、肥大、LV壁厚度、心脏重量、收缩功能和心脏损伤的血清生物标记物(例如,cTnI血清水平)。尽管不希望受限于任何具体机制,预期ActRIIB-ALK4异二聚体对心力衰竭的作用主要通过拮抗如由一种或多种配体介导的配体信号传导而引起,所述一种或多种配体与所述ActRIIB-ALK4异二聚体蛋白质结合,并且包括但不限于激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6和/或BMP10(本文中称为"ActRII-ALK4配体"或"ActRII-ALK4配体")。不管机制如何,根据本文所呈现数据明显的是,ActRIIB-ALK4异二聚体在改善与心力衰竭相关的多种并发症方面具有显著积极作用,并且进一步表明,其他ActRII-ALK4拮抗剂可能也可用于治疗心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)。

[0007] 如本文所公开,术语“ActRII-ALK4拮抗剂”是指可以用于抑制一种或多种ActRII-ALK4配体的信号传导的多种药剂,所述药剂包括例如抑制一种或多种ActRII-ALK4配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6和/或BMP10)的拮抗剂;抑制一种或多种ActRII-ALK4配体相关受体(例如,ActRIIA、ActRIIB、ALK4和ALK7)的拮抗剂;以及抑制一种或多种下游信号传导组分(例如,Smad蛋白,如Smad2和Smad 3)的拮抗剂。要根据本公开文本的方法和用途使用的ActRII-ALK4拮抗剂包括多种形式,例如,ActRII-ALK4配体陷阱(例如,可溶ActRIIA多肽或ActRIIB多肽,包括其变体以及异多聚体和同多聚体)、ActRII-ALK4抗体拮抗剂(例如,抑制激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10、ActRIIB、ActRIIA、ALK4和/或ALK7中的一种或多种的抗体)、小分子拮抗剂(例如,抑制激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10、ActRIIB、ActRIIA、ALK4和/或ALK7中的一种或多种的小分子)以及核苷酸拮抗剂(例如,抑制激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10、ActRIIB、ActRIIA、ALK4和/或ALK7中的一种或多种的核苷酸序列)。

[0008] 在某些方面,本公开文本提供包括可溶ActRIIB、ActRIIA、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽的ActRII-ALK4拮抗剂,其用于通常在与心力衰竭相关的任何过程(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)中拮抗ActRII-ALK4配体的信号传导。本公开文本的ActRII-ALK4拮抗剂可以拮抗ActRII-ALK4的一种或多种配体,如激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6或BMP10,并且因此可以用于治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或者心力衰竭的一种或多种共病(例如动脉高血压、心房颤动、认知功能障碍、糖尿病、高胆固醇血症、铁缺乏、肾功能障碍、代谢综合征、肥胖症、身体去适应作用、钾紊乱、肺病(例如,COPD)和睡眠呼吸暂停),或降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种共病的进展率和/或严重性。

[0009] 在某些方面,要根据本文公开的方法和用途(例如,治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或者心力衰竭的一种或多种并发症,或降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的进展率和/或严重性)使用的ActRII-ALK4拮抗剂是ActRII-ALK4配体陷阱多肽拮抗剂(包括其变体以及其异二聚体和异多聚体)、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂。ActRII-ALK4配体陷阱多肽包括能够与一种或多种ActRII-ALK4配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)结合的TGF-β超家族相关蛋白,包括其变体。因此,ActRII-ALK4配体陷阱通常包括能够拮抗一种或多种ActRII-ALK4配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)的多肽。如本文所用,术语“ActRII”是指II型激活素受体的家族。该家族包括激活素受体IIA型(ActRIIA)和激活素受体IIB型(ActRIIB)。在一些实施方案中,ActRII-ALK4拮抗剂包括ActRII-ALK4配体陷阱。在一些实施方案中,ActRII-ALK4配体陷阱包括ActRIIB多肽,包括其变体,还具有同多聚体(例如,ActRIIB同二聚体)和异多聚体(例如,ActRIIB-ALK4或ActRIIB-ALK7异二聚体)。在一些实施方案中,ActRII-ALK4配体陷阱包括ActRIIA多肽,包括其变体,还具有同多聚体(例如,ActRIIA同二聚体)和异多聚体(例如,ActRIIA-ALK4或ActRIIA-ALK7异二聚体)。在其他实施方案中,ActRII-ALK配体陷阱包括可溶配体陷阱蛋白,包括但不限于或者卵泡抑制素多肽以及其变体。在一些实施方案中,ActRII-ALK4拮抗剂包括ActRII-ALK4抗体拮抗剂。在一些实施方案中,ActRII-ALK4拮抗剂包括ActRII-ALK4小分子拮抗剂。在一些实施方案中,ActRII-ALK4拮抗

剂包括ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂。

[0010] 部分地，本公开文本提供治疗与扩张型心肌病(DCM)相关的心力衰竭的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂。本公开文本还提供治疗、预防与扩张型心肌病(DCM)相关的心力衰竭的一种或多种共病或降低所述一种或多种共病的进展率和/或严重性的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂。

[0011] 在一些实施方案中，扩张型心肌病是DCM的遗传形式。在一些实施方案中，扩张型心肌病选自常染色体隐性DCM、X连锁DCM和线粒体DCM。

[0012] 在一些实施方案中，扩张型心肌病与迪谢内肌营养不良(DMD)相关。在一些实施方案中，扩张型心肌病与抗肌萎缩蛋白(DMD)基因中的一个或多个突变相关。

[0013] 在本公开文本的一些实施方案中，患者患有HFrEF心力衰竭。在一些实施方案中，还向患者施用选自以下的一种或多种药剂：终止密码子连读疗法、基于病毒载体的基因疗法、针对外显子跳读的反义寡核苷酸(AON)疗法、Ataluren has、肌营养相关蛋白过表达疗法、他达拉非、肌生成抑制蛋白抑制剂和细胞疗法。在一些实施方案中，还向患者施用选自以下的一种或多种药剂：rAAV2.5-CMV-微小抗肌萎缩蛋白、SGT-001、rAAVrh74.MHCK7.微型抗肌萎缩蛋白、SRP-9001和GALGT2。在一些实施方案中，还向患者施用选自以下的一种或多种药剂：依特普森(SRP-4051)、戈洛迪森(SRP-4053)、卡西默森(SRP-4045)、肽缀合的依特普森(SRP-5051)、SRP-5053、SRP-5045、SRP-5052、SRP-5044、SRP-5050、维托拉森(NS-065/NCNP-01)、NS-089/NCNP-02(外显子跳读44)、DS-5141b(外显子跳读45)、苏沃迪森(WVE-210,201)、德瑞萨泼森(PRO051)、PNA-ssODN、M12-PMO(外显子23跳读)和M12-PMO(外显子10跳读)。在一些实施方案中，还向患者施用依特普森。在一些实施方案中，还向患者施用戈洛迪森。在一些实施方案中，还向患者施用卡西默森。在一些实施方案中，还向患者施用维托拉森。在一些实施方案中，还向患者施用肽缀合的依特普森。在一些实施方案中，还向患者施用苏沃迪森。在一些实施方案中，还向患者施用德瑞萨泼森。

[0014] 部分地，本公开文本提供治疗与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂。本公开文本还提供治疗、预防与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭的一种或多种共病或降低所述一种或多种共病的进展率和/或严重性的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂。在本公开文本的一些实施方案中，患者患有HFrEF心力衰竭。

[0015] 在本公开文本的一些实施方案中，所述肌肉萎缩疾病是肌营养不良。在一些实施方案中，所述肌肉萎缩疾病是选自以下的肌营养不良：贝克肌营养不良(BMD)、先天性肌营养不良(CMD)、迪谢内肌营养不良(DMD)、埃默里-德赖弗斯肌营养不良(EDMD)、面肩胛肱型肌营养不良(FSHD)、肢带型肌营养不良(LGMD)、强直性肌营养不良(DM)、眼咽型肌营养不良(OPMD)和弗里德赖希共济失调肌营养不良。在一些实施方案中，所述肌营养不良是迪谢内肌营养不良(DMD)。在一些实施方案中，所述肌营养不良与抗肌萎缩蛋白(DMD)基因中的一个或多个突变相关。

[0016] 在本公开文本的一些实施方案中，还向患者施用选自以下的一种或多种药剂：终止密码子连读疗法、基于病毒载体的基因疗法、针对外显子跳读的反义寡核苷酸(AON)疗法、Ataluren has、肌营养相关蛋白过表达疗法、他达拉非、肌生成抑制蛋白抑制剂和细胞疗

法。在一些实施方案中，还向患者施用选自以下的一种或多种药剂：rAAV2.5-CMV-微小抗肌萎缩蛋白、SGT-001、rAAVrh74.MHCK7.微型抗肌萎缩蛋白、SRP-9001和GALGT2。在一些实施方案中，还向患者施用选自以下的药剂中的一种或多种：依特普森(SRP-4051)、戈洛迪森(SRP-4053)、卡西默森(SRP-4045)、肽缀合的依特普森(SRP-5051)、SRP-5053、SRP-5045、SRP-5052、SRP-5044、SRP-5050、维托拉森(NS-065/NCNP-01)、NS-089/NCNP-02(外显子跳读44)、DS-5141b(外显子跳读45)、苏沃迪森(WVE-210,201)、德瑞萨泼森(PRO051)、PNA-ssODN、M12-PMO(外显子23跳读)和M12-PMO(外显子10跳读)。在一些实施方案中，还向患者施用依特普森。在一些实施方案中，还向患者施用戈洛迪森。在一些实施方案中，还向患者施用卡西默森。在一些实施方案中，还向患者施用维托拉森。在一些实施方案中，还向患者施用肽缀合的依特普森。在一些实施方案中，还向患者施用苏沃迪森。在一些实施方案中，还向患者施用德瑞萨泼森。

[0017] 在本公开文本的一些实施方案中，所述肌肉萎缩疾病与选自以下的障碍中的一种或多种相关：肌肉萎缩(例如，脊髓灰质炎后肌肉萎缩(PPMA))、恶病质(例如，心脏性恶病质、AIDS恶病质和癌症恶病质)、营养不良、麻风、糖尿病、肾病、慢性阻塞性肺病(COPD)、癌症、终末期肾衰竭、肌少症、肺气肿、骨质软化、HIV感染和AIDS。

[0018] 在本公开文本的一些实施方案中，所述肌营养不良是肢带型肌营养不良(LGMD)。

[0019] 在本公开文本的一些实施方案中，所述肌营养不良与选自以下的基因中的一个或多个突变相关：肌收缩蛋白(MYOT)、核纤层蛋白A/C(LMNA)、小窝蛋白-3(CAV3)、卡配因-3(CAPN3)、Dysferlin(DYSF)、γ-肌聚糖蛋白(SGCG)、α-肌聚糖蛋白(SGCA)、β-肌聚糖蛋白(SGCB)、和/或δ-肌聚糖蛋白(SGCD)、fukutin相关蛋白(FKRP)、阿诺他明-5(ANO5)。在本公开文本的一些实施方案中，还向患者施用选自以下的药剂中的一种或多种：SRP-9003、SRP-9004、SRP-9005、SRP-6004、SRP-9006和LGMD2A。

[0020] 在本公开文本的一些实施方案中，所述肌营养不良是弗里德赖希共济失调肌营养不良。在一些实施方案中，所述肌营养不良与共济蛋白基因(FXN)中的一个或多个突变相关。

[0021] 在本公开文本的一些实施方案中，所述肌营养不良是强直性肌营养不良。在一些实施方案中，所述肌营养不良与选自以下的基因中的一个或多个突变相关：强直性肌营养不良蛋白激酶(DMPK)和CCHC型锌指核酸结合蛋白(CNBP)基因。

[0022] 部分地，本公开文本提供治疗与遗传性心肌病相关的心力衰竭的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂。本公开文本还提供治疗、预防与遗传性心肌病相关的心力衰竭的一种或多种共病或降低所述一种或多种共病的进展率和/或严重性的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂。

[0023] 在本公开文本的一些实施方案中，所述遗传性心肌病选自扩张型心肌病、肥厚型心肌病、致心律失常性心肌病、左心室致密化不全性心肌病和限制型心肌病。在一些实施方案中，所述遗传性心肌病是扩张型心肌病。

[0024] 部分地，本公开文本提供治疗心力衰竭(HF)的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂。本公开文本还提供治疗、预防心力衰竭的一种或多种共病或降低所述一种或多种共病的进展率和/或严重性的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂。

[0025] 在一些实施方案中,所述心力衰竭是遗传性心肌病。在一些实施方案中,所述心力衰竭是扩张型心肌病(DCM)。在一些实施方案中,所述心力衰竭与迪谢内肌营养不良(DMD)相关。在一些实施方案中,所述心力衰竭与抗肌萎缩蛋白(DMD)基因中的一个或多个突变相关。

[0026] 在本公开文本的一些实施方案中,还向患者施用选自以下的一种或多种药剂:终止密码子连读疗法、基于病毒载体的基因疗法、针对外显子跳读的反义寡核苷酸(AON)疗法、Ataluren has、肌营养相关蛋白过表达疗法、他达拉非、肌生成抑制蛋白抑制剂和细胞疗法。在一些实施方案中,还向患者施用选自以下的一种或多种药剂:rAAV2.5-CMV-微小抗肌萎缩蛋白、SGT-001、rAAVrh74.MHCK7.微型抗肌萎缩蛋白、SRP-9001和GALGT2。在一些实施方案中,还向患者施用选自以下的一种或多种药剂:依特普森(SRP-4051)、戈洛迪森(SRP-4053)、卡西默森(SRP-4045)、肽缀合的依特普森(SRP-5051)、SRP-5053、SRP-5045、SRP-5052、SRP-5044、SRP-5050、维托拉森(NS-065/NCNP-01)、NS-089/NCNP-02(外显子跳读44)、DS-5141b(外显子跳读45)、苏沃迪森(WVE-210,201)、德瑞萨泼森(PRO051)、PNA-ssODN、M12-PMO(外显子23跳读)和M12-PMO(外显子10跳读)。在一些实施方案中,还向患者施用依特普森。在一些实施方案中,还向患者施用戈洛迪森。在一些实施方案中,还向患者施用卡西默森。在一些实施方案中,还向患者施用维托拉森。在一些实施方案中,还向患者施用肽缀合的依特普森。在一些实施方案中,还向患者施用苏沃迪森。在一些实施方案中,还向患者施用德瑞萨泼森。

[0027] 在本公开文本的一些实施方案中,所述心力衰竭与肢带型肌营养不良(LGMD)相关。在一些实施方案中,所述心力衰竭与选自以下的基因中的一个或多个突变相关:肌收缩蛋白(MYOT)、核纤层蛋白A/C(LMNA)、小窝蛋白-3(CAV3)、卡配因-3(CAPN3)、Dysferlin(DYSF)、γ-肌聚糖蛋白(SGCG)、α-肌聚糖蛋白(SGCA)、β-肌聚糖蛋白(SGCB)、和/或δ-肌聚糖蛋白(SGCD)、fukutin相关蛋白(FKRP)、阿诺他明-5(ANO5)。在一些实施方案中,还向患者施用选自以下的一种或多种药剂:SRP-9003、SRP-9004、SRP-9005、SRP-6004、SRP-9006和LGMD2A。

[0028] 在本公开文本的一些实施方案中,所述心力衰竭与弗里德赖希共济失调肌营养不良相关。在一些实施方案中,所述心力衰竭与共济蛋白基因(FXN)中的一个或多个突变相关。

[0029] 在本公开文本的一些实施方案中,所述心力衰竭与强直性肌营养不良相关。在一些实施方案中,所述心力衰竭与选自以下的基因中的一个或多个突变相关:强直性肌营养不良蛋白激酶(DMPK)和CCHC型锌指核酸结合蛋白(CNBP)基因。

[0030] 在本公开文本的一些实施方案中,所述心力衰竭与肥厚型心肌病(HCM)相关。在一些实施方案中,所述心力衰竭与致心律失常性心肌病(AC)相关。在一些实施方案中,所述心力衰竭与左心室致密化不全性心肌病(LVNC)相关。在一些实施方案中,所述心力衰竭与限制型心肌病(RC)相关。

[0031] 在本公开文本的一些实施方案中,所述心力衰竭是射血分数保留的心力衰竭(HFpEF)。在一些实施方案中,患者具有正常LVEF和≥50%的LVEF。在一些实施方案中,患者具有升高水平的利尿钠肽。

[0032] 在本公开文本的一些实施方案中,所述心力衰竭是射血分数降低的心力衰竭

(HFrEF)。在一些实施方案中,患者具有降低的LVEF和<40%的LVEF。

[0033] 在本公开文本的一些实施方案中,所述心力衰竭是中间范围射血分数的心力衰竭(HFmrEF)。在一些实施方案中,患者具有中间范围LVEF和在约40%与约49%之间的LVEF。在一些实施方案中,患者具有升高水平的利尿钠肽。

[0034] 在本公开文本的一些实施方案中,患者患有纽约心脏协会(NYHA)I级HF。在一些实施方案中,患者患有NYHA II级HF。或者。在一些实施方案中,患者患有NYHA III级HF。在一些实施方案中,患者患有NYHA IV级HF。

[0035] 在一些实施方案中,本公开文本的方法降低患者的NYHA等级。在一些实施方案中,所述方法将患者的NYHA等级从IV级降低至III级。在一些实施方案中,所述方法将患者的NYHA等级从IV级降低至II级。在一些实施方案中,所述方法将患者的NYHA等级从IV级降低至I级。在一些实施方案中,所述方法将患者的NYHA等级从III级降低至II级。在一些实施方案中,所述方法将患者的NYHA等级从III级降低至I级。在一些实施方案中,所述方法将患者的NYHA等级从II级降低至I级。

[0036] 在本公开文本的一些实施方案中,患者患有美国心脏病学会基金会/美国心脏协会(ACCF/AHA)A期心力衰竭。在一些实施方案中,患者患有ACCF/AHA B期心力衰竭。在一些实施方案中,患者患有ACCF/AHA C期心力衰竭。在一些实施方案中,患者患有ACCF/AHA D期心力衰竭。

[0037] 在一些实施方案中,本公开文本的方法降低患者的ACCF/AHA分期。在一些实施方案中,所述方法将患者的ACCF/AHA分期从D期降低至C期。在一些实施方案中,所述方法将患者的ACCF/AHA分期从D期降低至B期。在一些实施方案中,所述方法将患者的ACCF/AHA分期从D期降低至A期。在一些实施方案中,所述方法将患者的ACCF/AHA分期从C期降低至B期。在一些实施方案中,所述方法将患者的ACCF/AHA分期从C期降低至A期。在一些实施方案中,所述方法将患者的ACCF/AHA分期从B期降低至A期。

[0038] 在本公开文本的一些实施方案中,患者患有HF合并AMI的Killip分级为I级的心力衰竭。在一些实施方案中,患者患有HF合并AMI的Killip分级为II级的心力衰竭。在一些实施方案中,患者患有HF合并AMI的Killip分级为III级的心力衰竭。在一些实施方案中,患者患有HF合并AMI的Killip分级为IV级的心力衰竭。

[0039] 在一些实施方案中,本公开文本的方法降低患者的HF合并AMI的Killip分级等级。在一些实施方案中,所述方法将患者的Killip等级从IV级降低至III级。在一些实施方案中,所述方法将患者的Killip等级从IV级降低至II级。在一些实施方案中,所述方法将患者的Killip等级从IV级降低至I级。在一些实施方案中,所述方法将患者的Killip等级从III级降低至II级。在一些实施方案中,所述方法将患者的Killip等级从III级降低至I级。在一些实施方案中,所述方法将患者的Killip等级从II级降低至I级。

[0040] 在本公开文本的一些实施方案中,患者具有用于诊断HF的一项或多项主要弗雷明汉标准。在一些实施方案中,患者患有选自以下的一种或多种病症:夜间阵发性呼吸困难或端坐呼吸、颈静脉怒张、啰音、X射线摄影心脏肥大、急性肺水肿、S3奔马律、大于16cm水柱的增加的静脉压、大于或等于25秒的循环时间、肝颈静脉反流以及响应于治疗在5天中大于或等于4.5kg的体重减轻。

[0041] 在本公开文本的一些实施方案中,患者具有用于诊断HF的一项或多项次要弗雷明

汉标准。在一些实施方案中，患者患有选自以下的一种或多种病症：双侧踝水肿、夜间咳嗽、普通劳作时呼吸困难、肝肿大、胸腔积液、肺活量从最高记录减小1/3以及心动过速(心率大于120/min)。

[0042] 在本公开文本的一些实施方案中，患者具有至少两项弗雷明汉主要标准。在一些实施方案中，患者具有至少一项主要弗雷明汉标准和至少两项次要弗雷明汉标准。

[0043] 在一些实施方案中，本公开文本的方法减少患者具有的用于心力衰竭的弗雷明汉标准的数量。在一些实施方案中，所述方法减少患者具有的用于心力衰竭的主要弗雷明汉标准的数量。在一些实施方案中，所述方法减少患者具有的用于心力衰竭的次要弗雷明汉标准的数量。

[0044] 在本公开文本的一些实施方案中，患者患有选自以下的一种或多种病症：HF的典型症状、不太典型的症状、特异性体征和较低特异性体征。在一些实施方案中，患者具有选自以下的一种或多种症状：呼吸急促、端坐呼吸、夜间阵发性呼吸困难、运动耐力降低、疲劳、疲乏、运动后恢复时间延长以及踝肿胀。在一些实施方案中，患者具有选自以下的一种或多种不太典型的症状：夜间咳嗽、哮鸣、胀气感、食欲不振、意识错乱(尤其在老年人中)、抑郁、心悸、头晕、晕厥和俯身呼吸困难。

[0045] 在本公开文本的一些实施方案中，患者具有HF的一种或多种体征。在一些实施方案中，患者具有选自以下的HF的一种或多种体征：颈静脉压升高、肝颈静脉反流、第三心音(奔马律)、心尖冲动侧移位。在一些实施方案中，患者具有HF的一种或多种较低特异性体征。在一些实施方案中，患者具有HF的一种或多种较低特异性体征。在一些实施方案中，患者具有选自以下的HF的一种或多种较低特异性体征：体重增加(>2kg/周)、体重减轻(在晚期HF中)、组织消耗(恶病质)、心脏杂音、外周性水肿(踝、骶骨、阴囊)、肺捻发音、进气减少和肺底叩诊浊音(胸腔积液)、心动过速、不规则脉搏、呼吸急促、陈-施呼吸、肝肿大、腹水、手足厥冷、少尿和脉压窄。

[0046] 在一些实施方案中，本公开文本的方法减少患者具有的心力衰竭的体征和/或症状的数量。在一些实施方案中，所述方法减少患者具有的心力衰竭的体征的数量。在一些实施方案中，所述方法减少患者具有的心力衰竭的症状的数量。

[0047] 在本公开文本的一些实施方案中，患者具有如与健康患者相比升高的脑利尿钠肽(BNP)水平。在一些实施方案中，患者的BNP水平为至少35pg/mL(例如，35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、300、400、500、1000、3000、5000、10,000、15,000或20,000pg/mL)。在一些实施方案中，本公开文本的方法将患者的BNP水平降低至少5％(例如，5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％或至少80％)。在一些实施方案中，本公开文本的方法将患者的BNP水平降低至少5pg/mL(例如，5、10、50、100、200、500、1000或5000pg/mL)。在一些实施方案中，本公开文本的方法将BNP水平降低至正常水平(即，<100pg/ml)。

[0048] 在本公开文本的一些实施方案中，患者具有如与健康患者相比升高的N末端pro-BNP(NT-proBNP)水平。在一些实施方案中，患者的NT-proBNP水平为至少10pg/mL(例如，10、25、50、100、150、200、300、400、500、1000、3000、5000、10,000、15,000或20,000pg/mL)。在一些实施方案中，本公开文本的方法将患者的NT-proBNP水平降低至少5％(例如，5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％或至少80％)。

在一些实施方案中，本公开文本的方法将患者的NT-proBNP水平降低至少10pg/mL(例如，10、25、50、100、200、500、1000、5000、10,000、15,000、20,000或25,000pg/mL)。在一些实施方案中，本公开文本的方法将NT-proBNP水平降低至正常水平(即，<100pg/ml)。

[0049] 在本公开文本的一些实施方案中，患者具有如与健康患者相比升高的肌钙蛋白水平。

[0050] 在一些实施方案中，本公开文本的方法将患者的肌钙蛋白水平降低至少1％(例如，1％、5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％或至少80％)。

[0051] 在一些实施方案中，本公开文本的方法降低患者的左心室肥大。在一些实施方案中，本公开文本的方法将患者的左心室肥大降低至少1％(例如，1％、5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％或至少50％)。在一些实施方案中，本公开文本的方法将患者的住院率减少至少1％(例如，1％、2％、3％、4％、5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或100％)。在一些实施方案中，本公开文本的方法将患者的心力衰竭的恶化率减少至少1％(例如，1％、2％、3％、4％、5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或100％)。

[0052] 在本公开文本的一些实施方案中，患者患有左心室(LV)的舒张功能障碍。在一些实施方案中，患者患有左心室(LV)的收缩功能障碍。在一些实施方案中，本公开文本的方法将患者的LV舒张功能增加至少5％(例如，5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或100％)。

[0053] 在本公开文本的一些实施方案中，患者的射血分数小于45％(例如，10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％或45％)。在一些实施方案中，本公开文本的方法将射血分数增加至正常水平(即，>45％)。

[0054] 在一些实施方案中，本公开文本的方法将患者的心排血量增加至少5％(例如，5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％或至少80％)。

[0055] 在一些实施方案中，本公开文本的方法将患者的射血分数增加至少1％(例如，1％、5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％或至少80％)。

[0056] 在一些实施方案中，本公开文本的方法增加患者的运动能力。在一些实施方案中，患者的6分钟步行距离为150至400米。在一些实施方案中，本公开文本的方法增加患者的6分钟步行距离。在一些实施方案中，本公开文本的方法将患者的6分钟步行距离增加至少10米(例如，至少10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、250、300或超过400米)。

[0057] 在一些实施方案中，本公开文本的方法降低患者的博格呼吸困难指数(BDI)。在一些实施方案中，本公开文本的方法将患者的BDI降低至少0.5个指数点(例如，至少0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10个指数点)。

[0058] 在本公开文本的一些实施方案中，使用超声心动图显像评估患者的心力衰竭。在一些实施方案中，使用心脏磁共振成像(CMR)评估患者的心力衰竭。在一些实施方案中，使

用具有心肌延迟强化(LGE)的CMR评估患者的心力衰竭。在一些实施方案中,针对选自以下的条件中的一种或多种来评估患者:LV结构和收缩功能(例如,在乳头肌水平上在胸骨旁短轴观中通过M模式测量),包括但不限于LV壁厚度(LVWT)、LV质量(LVM)、LV舒张末径(LVEDD)、LV收缩末径(LVESD)、缩短分数(FS)(使用等式FS=100%×[(EDD-ESD)/EDD]来计算)、LV舒张末期容积(LVEDV)、LV收缩末期容积(LVESV)、射血分数(使用等式EF=100%×[(EDV-ESV)/EDV]来计算)、肥大指数(计算为LVM与LVESV的比率)以及相对壁厚度(计算为LVWT与LVESD的比率)。在一些实施方案中,使用选自以下的心脏成像来评估患者的心力衰竭:多闸门式造影(MUGA)、胸部X线检查、单光子发射计算机体层摄影(SPECT)和放射性核苷酸心室造影、正电子发射体层摄影(PET)、冠状动脉造影以及心脏计算机体层摄影(CT)。

[0059] 在一些实施方案中,本公开文本的方法还包括向患者施用另外的支持疗法或活性剂。在一些实施方案中,所述另外的支持疗法或活性剂选自:血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂、β阻断剂、血管紧张素II受体阻断剂(ARB)、盐皮质激素/醛固酮受体拮抗剂(MRA)、糖皮质激素、他汀、钠-葡萄糖协同转运蛋白2(SGLT2)抑制剂、植入型心律转复除颤器(ICD)、血管紧张素受体肾胰岛素残基溶酶抑制剂(ARNI)和利尿剂。在一些实施方案中,所述另外的活性剂和/或支持疗法选自:苯扎普利、卡托普利、依那普利、赖诺普利、培哚普利、雷米普利(例如,雷米平)、群多普利、佐芬普利、醋丁洛尔、阿替洛尔、倍他洛尔、比索洛尔、卡替洛尔、卡维地洛、拉贝洛尔、美托洛尔、纳多洛尔、奈必洛尔、喷布洛尔、吲哚洛尔、普萘洛尔、索他洛尔、噻吗洛尔;氯沙坦、厄贝沙坦、奥美沙坦、坎地沙坦、缬沙坦、非马沙坦、阿齐沙坦、沙普利沙坦、替米沙坦、孕酮、依普利酮and螺内酯、倍氯米松、倍他米松、布地奈德、可的松、地夫可特、地塞米松、氢化可的松、甲泼尼龙、泼尼松龙、甲基泼尼松、泼尼松、曲安西龙、非奈利酮、阿托伐他汀(Lipitor)、氟伐他汀(Lescol)、洛伐他汀(Mevacor、Altocor)、普伐他汀(Pravachol)、匹伐他汀(Livalo)、斯伐他汀(Zocor)、瑞舒伐他汀(Crestor)、卡格列净、达格列净(例如,Farxiga)、恩格列净、缬沙坦和沙库必曲(肾胰岛素残基溶酶抑制剂)、呋塞米、布美他尼、托拉塞米、苄氟噻嗪、氢氯噻嗪、美托拉宗、吲达帕胺、螺内酯/依普利酮、阿米洛利氨苯蝶啶、胼屈嗪和硝酸异山梨酯、地高辛、洋地黄、N-3多不饱和脂肪酸(PUFA)以及I_f通道抑制剂(例如,伊伐布雷定)。

[0060] 在本公开文本的一些实施方案中,患者患有选自以下的共病:高龄、贫血、动脉高血压、心房颤动、认知功能障碍、糖尿病、高胆固醇血症、铁缺乏、肾功能障碍、代谢综合征、肥胖症、身体去适应作用、钾紊乱、肺病(例如,COPD)和睡眠呼吸暂停。

[0061] 在本公开文本的一些实施方案中,ActRII-ALK4拮抗剂包括ActRIIA多肽。在一些实施方案中,ActRII-ALK4拮抗剂是异多聚体。

[0062] 在本公开文本的一些实施方案中,ActRIIA多肽包含与在SEQ ID NO:366的氨基酸21、22、23、24、25、26、27、28、29或30中的任一个处开始并且在SEQ ID NO:366的氨基酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134或135中的任一个处结束的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0063] 在本公开文本的一些实施方案中,ActRIIA多肽包含与在SEQ ID NO:366的氨基酸21、22、23、24、25、26、27、28、29或30中的任一个处开始并且在SEQ ID NO:367的氨基酸110、

111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134或135中的任一个处结束的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

[0064] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIA多肽包含与在SEQ ID NO:366的氨基酸21、22、23、24、25、26、27、28、29或30中的任一个处开始并且在SEQ ID NO:368的氨基酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134或135中的任一个处结束的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

[0065] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIA多肽是包含ActRIIA多肽结构域和一个或多个异源结构域的融合多肽。在一些实施方案中，ActRIIA多肽是ActRIIA-Fc融合多肽。在一些实施方案中，所述融合多肽还包含定位于所述ActRIIA多肽结构域与所述一个或多个异源结构域或Fc结构域之间的接头结构域。在一些实施方案中，接头结构域选自：TGGG、TGGGG、SGGGG、GGGGS、GGG、GGGG、SGGG和GGGGS。

[0066] 在本公开文本的一些实施方案中，所述多肽包含与SEQ ID NO:380的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

[0067] 在本公开文本的一些实施方案中，所述多肽包含与SEQ ID NO:378的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

[0068] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRII-ALK4拮抗剂是同二聚体多肽。在一些实施方案中，ActRII-ALK4拮抗剂是异多聚体多肽。在一些实施方案中，异多聚体多肽包含ActRIIA多肽和ALK4多肽。在一些实施方案中，所述异多聚体多肽包含ActRIIA多肽和ALK7多肽。

[0069] 在本公开文本的一些实施方案中，ALK4多肽包含与选自SEQ ID NO:84、85、86、87、88、89、92、93、247、249、421、422的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

[0070] 在本公开文本的一些实施方案中，ALK7多肽包含与选自SEQ ID NO:120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、133和134的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

[0071] 在本公开文本的一些实施方案中，ALK4多肽是包含ALK4多肽结构域和一个或多个异源结构域的融合多肽。在一些实施方案中，ALK7多肽是包含ALK7多肽结构域和一个或多个异源结构域的融合多肽。在一些实施方案中，ALK4多肽是ALK4-Fc融合多肽。在一些实施方案中，ALK7多肽是ALK7-Fc融合多肽。在一些实施方案中，所述ALK4-Fc融合多肽还包含定位于所述ALK4多肽结构域与所述一个或多个异源结构域或Fc结构域之间的接头结构域。在一些实施方案中，所述ALK7-Fc融合多肽还包含定位于所述ALK7多肽结构域与所述一个或多个异源结构域或Fc结构域之间的接头结构域。在一些实施方案中，所述接头结构域选自：TGGG、TGGGG、SGGGG、GGGGS、GGG、GGGG、SGGG和GGGGS。

[0072] 在本公开文本的一些实施方案中，异多聚体包含选自以下的Fc结构域：a)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域；b)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域；c.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域；d.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域；以及e.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0073] 在本公开文本的一些实施方案中，异多聚体包含选自以下的Fc结构域：a.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域；b.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域；c.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域；d.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域；以及e.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少75％、80％、85％、

90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0074] 在本公开文本的一些实施方案中，异多聚体包含选自以下的Fc结构域：a.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域；以及b.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0075] 在本公开文本的一些实施方案中，异多聚体包含选自以下的Fc结构域：a.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域；以及b.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0076] 在本公开文本的一些实施方案中，异多聚体包含选自以下的Fc结构域：a.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域；以及b.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0077] 在本公开文本的一些实施方案中，异多聚体包含选自以下的Fc结构域：a.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域；以及b.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0078] 在本公开文本的一些实施方案中，异多聚体包含选自以下的Fc结构域：a.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、

92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域；以及b.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0079] 在本公开文本的一些实施方案中，异多聚体包含选自以下的Fc结构域：a.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域；以及b.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0080] 在本公开文本的一些实施方案中，异多聚体包含选自以下的Fc结构域：a.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域；以及b.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0081] 在本公开文本的一些实施方案中，异多聚体包含选自以下的Fc结构域：a.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域；以及b.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0082] 在本公开文本的一些实施方案中，异多聚体包含选自以下的Fc结构域：a.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域；以及b.)所述ActRIIA-Fc融合

多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0083] 在本公开文本的一些实施方案中，异多聚体包含选自以下的Fc结构域：a.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域；以及b.)所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0084] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0085] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0086] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIA-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置138处的谷氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置217处的天冬氨酸，并且其中所述ALK4-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在位置146处的丙氨酸、在氨基酸位置162处的精氨酸、在氨基酸位置179处的精氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

[0087] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIA-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置138处的谷氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置217处的天冬氨酸，并且其中所述ALK7-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在位置146处的丙氨酸、在氨基酸位置162处的精氨酸、在氨基酸位置179处的精氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

[0088] 在本公开文本的一些实施方案中，ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0089] 在本公开文本的一些实施方案中，ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:28的氨基

酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0090] 在本公开文本的一些实施方案中，ALK4-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置138处的谷氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置217处的天冬氨酸，并且其中所述ActRIIA-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在位置146处的丙氨酸、在氨基酸位置162处的精氨酸、在氨基酸位置179处的精氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

[0091] 在本公开文本的一些实施方案中，ALK7-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置138处的谷氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置217处的天冬氨酸，并且其中所述ActRIIA-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在位置146处的丙氨酸、在氨基酸位置162处的精氨酸、在氨基酸位置179处的精氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

[0092] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0093] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0094] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIA-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置435处的精氨酸，并且其中所述ALK4-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

[0095] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIA-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置435处的精氨酸，并且其中所述ALK7-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

[0096] 在本公开文本的一些实施方案中，ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0097] 在本公开文本的一些实施方案中，ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或

100％相同的Fc结构域，并且所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0098] 在本公开文本的一些实施方案中，ALK4-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置435处的精氨酸，并且其中所述ActRIIA-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

[0099] 在本公开文本的一些实施方案中，ALK7-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置435处的精氨酸，并且其中所述ActRIIA-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

[0100] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRII-ALK4拮抗剂包括ActRIIB多肽。

[0101] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRII-ALK4拮抗剂是异多聚体。

[0102] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIB多肽包含与在SEQ ID NO:2的氨基酸20-29中的任一个(例如，氨基酸残基20、21、22、23、24、25、26、27、28或29)处开始并且在SEQ ID NO:2的氨基酸109-134中的任一个(例如，氨基酸残基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)处结束的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

[0103] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:2的氨基酸29-109至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

[0104] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:2的氨基酸25-131至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

[0105] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:2的氨基酸20-134至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

[0106] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:53的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

[0107] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:388的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

[0108] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:389的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

[0109] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIB多肽是包含ActRIIB多肽结构域和一个或多个异源结构域的融合多肽。在一些实施方案中，ActRIIB多肽是ActRIIB-Fc融合多肽。

在一些实施方案中，所述融合多肽还包含定位于所述ActRIIB多肽结构域与所述一个或多个异源结构域或Fc结构域之间的接头结构域。在一些实施方案中，所述接头结构域选自：TGGG、TGGGG、SGGGG、GGGGS、GGG、GGGG、SGGG和GGGGS。在一些实施方案中，所述多肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述多肽包含与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

[0110] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIB多肽包含关于SEQ ID NO:2的氨基酸序列选自以下的一个或多个氨基酸取代：L38N、E50L、E52N、L57E、L57I、L57R、L57T、L57V、Y60D、G68R、K74E、W78Y、L79F、L79S、L79T、L79W、F82D、F82E、F82L、F82S、F82T、F82Y、N83R、E94K和V99G。在一些实施方案中，ActRIIB多肽包含关于SEQ ID NO:2的氨基酸序列选自以下的一个或多个氨基酸取代：L38N、E50L、E52D、E52N、E52Y、L57E、L57I、L57R、L57T、L57V、Y60D、G68R、K74E、W78Y、L79E、L79F、L79H、L79R、L79S、L79T、L79W、F82D、F82E、F82I、F82K、F82L、F82S、F82T、F82Y、N83R、E94K和V99G。

[0111] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的E50的位置处的L取代。在一些实施方案中，ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L38的位置处的N取代。在一些实施方案中，ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的V99的位置处的G取代。在一些实施方案中，ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的N83的位置处的R取代。在一些实施方案中，ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的T取代。在一些实施方案中，ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的H取代。

[0112] 在本公开文本的一些实施方案中，所述多肽包含与SEQ ID NO:276的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述多肽包含与SEQ ID NO:278的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的I取代和在对应于N83的位置处的R取代。

[0113] 在本公开文本的一些实施方案中，所述多肽包含与SEQ ID NO:279的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述多肽包含与SEQ ID NO:332的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的K取代和在对应于N83的位置处的R取代。

[0114] 在本公开文本的一些实施方案中，所述多肽包含与SEQ ID NO:333的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述多肽包含与SEQ ID NO:335的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的T取代和在对应于N83的位置处的R取代。

[0115] 在本公开文本的一些实施方案中，所述多肽包含与SEQ ID NO:336的氨基酸序列

至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述多肽包含与SEQ ID NO:338的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的T取代。

[0116] 在本公开文本的一些实施方案中，所述多肽包含与SEQ ID NO:339的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述多肽包含与SEQ ID NO:341的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的H取代和在对应于F82的位置处的I取代。

[0117] 在本公开文本的一些实施方案中，所述多肽包含与SEQ ID NO:342的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述多肽包含与SEQ ID NO:344的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的H取代。

[0118] 在本公开文本的一些实施方案中，所述多肽包含与SEQ ID NO:345的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述多肽包含与SEQ ID NO:347的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的H取代和在对应于F82的位置处的K取代。

[0119] 在本公开文本的一些实施方案中，所述多肽包含与SEQ ID NO:348的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述多肽包含与SEQ ID NO:350的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的E50的位置处的L取代。

[0120] 在本公开文本的一些实施方案中，所述多肽包含与SEQ ID NO:351的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述多肽包含与SEQ ID NO:353的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L38的位置处的N取代和在对应于L79的位置处的R取代。

[0121] 在本公开文本的一些实施方案中，所述多肽包含与SEQ ID NO:354的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述多肽包含与SEQ ID NO:356的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的

氨基酸序列。在一些实施方案中,所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的V99的位置处的G取代。

[0122] 在本公开文本的一些实施方案中,ActRIIB多肽是同二聚体多肽。在一些实施方案中,ActRIIB多肽是异二聚体多肽。

[0123] 在本公开文本的一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与在SEQ ID NO:2的氨基酸20-29中的任一个(例如,氨基酸残基20、21、22、23、24、25、26、27、28或29)处开始并且在SEQ ID NO:2的氨基酸109-134中的任一个(例如,氨基酸残基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)处结束的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,以及在SEQ ID NO:2的选自以下的位置处的一个或多个氨基酸取代:L38N、E50L、E52N、L57E、L57I、L57R、L57T、L57V、Y60D、G68R、K74E、W78Y、L79F、L79S、L79T、L79W、F82D、F82E、F82L、F82S、F82T、F82Y、N83R、E94K和V99G。

[0124] 在本公开文本的一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与在SEQ ID NO:2的氨基酸20-29中的任一个(例如,氨基酸残基20、21、22、23、24、25、26、27、28或29)处开始并且在SEQ ID NO:2的氨基酸109-134中的任一个(例如,氨基酸残基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)处结束的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,以及在SEQ ID NO:2的选自以下的位置处的一个或多个氨基酸取代:L38N、E50L、E52D、E52N、E52Y、L57E、L57I、L57R、L57T、L57V、Y60D、G68R、K74E、W78Y、L79E、L79F、L79H、L79R、L79S、L79T、L79W、F82D、F82E、F82I、F82K、F82L、F82S、F82T、F82Y、N83R、E94K和V99G。

[0125] 在本公开文本的一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:2的氨基酸29-109至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:2的氨基酸25-131至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:2的氨基酸20-134至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:53的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:388的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:389的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,ActRIIB多肽包含关于SEQ ID NO:2的氨基酸序列选自以下的一个或多个氨基酸取代:L38N、E50L、E52D、E52N、E52Y、L57E、L57I、L57R、L57T、L57V、Y60D、G68R、K74E、W78Y、L79E、L79F、L79H、L79R、L79S、L79T、L79W、F82D、F82E、F82I、F82K、F82L、F82S、F82T、F82Y、N83R、E94K和V99G。

[0126] 在本公开文本的一些实施方案中,异多聚体多肽包含ActRIIA多肽和ALK4多肽。在一些实施方案中,异多聚体多肽包含ActRIIA多肽和ALK7多肽。在一些实施方案中,ALK4多

肽包含与选自SEQ ID NO:84、85、86、87、88、89、92、93、247、249、421、422的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,ALK7多肽包含与选自SEQ IDNO:120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、133和134的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0127] 在本公开文本的一些实施方案中,ActRIIB多肽是包含ActRIIB多肽结构域和一个或多个异源结构域的融合多肽。在一些实施方案中,ALK4多肽是包含ALK4多肽结构域和一个或多个异源结构域的融合多肽。在一些实施方案中,ALK7多肽是包含ALK7多肽结构域和一个或多个异源结构域的融合多肽。在一些实施方案中,ActRIIB多肽是ActRIIB-Fc融合多肽。在一些实施方案中,ALK4多肽是ALK4-Fc融合多肽。在一些实施方案中,ALK7多肽是ALK7-Fc融合多肽。在一些实施方案中,ActRIIB-Fc融合多肽还包含定位于所述ActRIIB多肽结构域与所述一个或多个异源结构域或Fc结构域之间的接头结构域。在一些实施方案中,所述ALK4-Fc融合多肽还包含定位于所述ALK4多肽结构域与所述一个或多个异源结构域或Fc结构域之间的接头结构域。在一些实施方案中,所述ALK7-Fc融合多肽还包含定位于所述ALK7多肽结构域与所述一个或多个异源结构域或Fc结构域之间的接头结构域。在一些实施方案中,所述接头结构域选自:TGGG、TGGGG、SGGGG、GGGGS、GGG、GGGG、SGGG和GGGGS。

[0128] 在本公开文本的一些实施方案中,异多聚体包含选自以下的Fc结构域:a.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域;b.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域;c.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域;d.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域;以及e.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0129] 在本公开文本的一些实施方案中,异多聚体包含选自以下的Fc结构域:a.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK7-Fc

融合多肽包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域;b.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域;c.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域;d.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域;以及e.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0130] 在本公开文本的一些实施方案中,异多聚体包含选自以下的Fc结构域:a.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域;以及b)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0131] 在本公开文本的一些实施方案中,异多聚体包含选自以下的Fc结构域:a.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域;以及b.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0132] 在本公开文本的一些实施方案中,异多聚体包含选自以下的Fc结构域:a.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域;以及b.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0133] 在本公开文本的一些实施方案中,异多聚体包含选自以下的Fc结构域:a.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域;以及b.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0134] 在本公开文本的一些实施方案中,异多聚体包含选自以下的Fc结构域:a.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域;以及b.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0135] 在本公开文本的一些实施方案中,异多聚体包含选自以下的Fc结构域:a.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域;以及b.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0136] 在本公开文本的一些实施方案中,异多聚体包含选自以下的Fc结构域:a.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域;以及b.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ALK4-Fc融合多肽包

含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0137] 在本公开文本的一些实施方案中，异多聚体包含选自以下的Fc结构域：a.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域；以及b.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0138] 在本公开文本的一些实施方案中，异多聚体包含选自以下的Fc结构域：a.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域；以及b.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0139] 在本公开文本的一些实施方案中，异多聚体包含选自以下的Fc结构域：a.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域；以及b.)所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0140] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0141] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0142] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIB-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置138处的谷氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置217处的天冬氨酸，并且其中所述ALK4-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在位置146处的丙氨酸、在氨基酸位置162处的精氨酸、在氨基酸位置179处的精氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

[0143] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIB-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置138处的谷氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置217处的天冬氨酸，并且其中所述ALK7-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在位置146处的丙氨酸、在氨基酸位置162处的精氨酸、在氨基酸位置179处的精氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

[0144] 在本公开文本的一些实施方案中，ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0145] 在本公开文本的一些实施方案中，ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0146] 在本公开文本的一些实施方案中，ALK4-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置138处的谷氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置217处的天冬氨酸，并且其中所述ActRIIB-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在位置146处的丙氨酸、在氨基酸位置162处的精氨酸、在氨基酸位置179处的精氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

[0147] 在本公开文本的一些实施方案中，ALK7-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置138处的谷氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置217处的天冬氨酸，并且其中所述ActRIIB-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在位置146处的丙氨酸、在氨基酸位置162处的精氨酸、在氨基酸位置179处的精氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

[0148] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0149] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同

的Fc结构域。

[0150] 在本公开文本的一些实施方案中,ActRIIB-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置435处的精氨酸,并且其中所述ALK4-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

[0151] 在本公开文本的一些实施方案中,ActRIIB-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置435处的精氨酸,并且其中所述ALK7-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

[0152] 在本公开文本的一些实施方案中,ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0153] 在本公开文本的一些实施方案中,ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域,并且所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0154] 在本公开文本的一些实施方案中,ALK4-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置435处的精氨酸,并且其中所述ActRIIB-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

[0155] 在本公开文本的一些实施方案中,ALK7-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置435处的精氨酸,并且其中所述ActRIIB-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

[0156] 在本公开文本的一些实施方案中,ActRII-ALK4拮抗剂是卵泡抑制素多肽。在一些实施方案中,所述卵泡抑制素多肽与选自SEQ ID NO:390、391、392、393和394的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0157] 在本公开文本的一些实施方案中,ActRII-ALK4拮抗剂抑制选自以下的一种或多种配体:激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10、ALK4、ActRIIA和ActRIIB。

[0158] 在本公开文本的一些实施方案中,ActRII-ALK4拮抗剂是抗体或抗体组合。在一些实施方案中,所述抗体或抗体组合与选自以下的一种或多种配体结合:激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10、ALK4、ActRIIA和ActRIIB。在一些实施方案中,所述抗体是多特异性抗体。在一些实施方案中,所述抗体是双特异性抗体。

[0159] 在本公开文本的一些实施方案中,ActRII-ALK4拮抗剂是小分子或小分子组合。在一些实施方案中,所述小分子或小分子组合抑制选自以下的一种或多种配体:激活素A、激

活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10、ALK4、ActRIIA和ActRIIB。

[0160] 在本公开文本的一些实施方案中，ActRII-ALK4拮抗剂是多核苷酸或多核苷酸组合。在一些实施方案中，所述多核苷酸或多核苷酸组合抑制选自以下的一种或多种配体：激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10、ALK4、ActRIIA和ActRIIB。

附图说明

[0161] 图1显示人ActRIIB(SEQ ID NO:1)与人ActRIIA(SEQ ID NO:367)的细胞外结构域的比对，其中本文基于多个ActRIIB和ActRIIA晶体结构的综合分析推断为直接接触配体的残基用框来指示。

[0162] 图2显示人ActRIIB前体多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)；NCBI参考序列NP_001097.2)。信号肽加下划线，细胞外结构域呈粗体(也称为SEQ ID NO:1)，并且潜在N-连接的糖基化位点加框。在本公开文本中使用SEQ ID NO:2作为人ActRIIB的野生型参考序列，并且本文所述变体的编号是基于SEQ ID NO:2中的编号。

[0163] 图3显示人ActRIIB细胞外结构域多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。

[0164] 图4显示编码人ActRIIB前体多肽的核酸序列。SEQ ID NO:4由NCBI参考序列NM_001106.4的核苷酸434-1972组成。

[0165] 图5显示编码人ActRIIB(20-134)细胞外结构域多肽的核酸序列(SEQ ID NO:3)。

[0166] 图6显示各个不含其细胞内结构域的脊椎动物ActRIIB前体多肽(SEQ ID NO:358-363)、不含其细胞内结构域的人ActRIIA前体多肽(SEQ ID NO:364)和共有ActRII前体多肽(SEQ ID NO:365)的多序列比对。共有序列中的大写字母指示保守的位置。共有序列中的小写字母指示作为该位置的主要形式但并非普遍存在的氨基酸残基。

[0167] 图7显示使用Clustal 2.1对来自人IgG同种型的Fc结构域进行的多序列比对。铰链区由虚线下划线指示。双下划线指示在IgG1(SEQ ID NO:13)Fc中工程化以促进不对称链配对的位置和关于其他同种型IgG4(SEQ ID NO:17)、IgG2(SEQ ID NO:14)和IgG3(SEQ ID NO:15)的相应位置的例子。

[0168] 图8A和图8B显示包含变体ActRIIB多肽(指示为“X”)和ALK4多肽(指示为“Y”)或ALK7多肽(指示为“Y”)的异聚多肽复合物的示意性例子。在所说明的实施方案中，所述变体ActRIIB多肽是包含相互作用对的第一成员(“C_1”)的融合多肽的一部分，并且ALK4多肽或ALK7多肽是包含相互作用对的第二成员(“C_2”)的融合多肽的一部分。合适的相互作用对包括例如重链和/或轻链免疫球蛋白相互作用对、截短及其变体，如本文所述的那些[例如，Spiess等人(2015)Molecular Immunology 67(2A):95-106]。在每种融合多肽中，接头可以定位于变体ActRIIB多肽、ALK4多肽或ALK7多肽与相互作用对的相应成员之间。相互作用对的第一成员和第二成员可能是非指导的，意味着所述对的成员可以彼此缔合或自缔合，没有明显偏好，并且它们可以具有相同或不同的氨基酸序列。参见图8A。可替代地，相互作用对可能是指导(不对称的)对，意味着所述对的成员优先彼此缔合而不是自缔合。参见图8B。

[0169] 图9显示多种脊椎动物ALK4蛋白和人ALK4(SEQ ID NO:414-420)的多序列比对。

[0170] 图10显示多种脊椎动物ActRIIA蛋白和人ActRIIA(SEQ ID NO:367、371-377)的多序列比对。

[0171] 图11A和图11B显示包含I型受体和II型受体多肽的异聚蛋白质复合物的两个示意

性例子。图11A描绘了包含一种I型受体融合多肽和一种II型受体融合多肽的异二聚蛋白质复合物，所述融合多肽可以通过含于每条多肽链内的多聚化结构域共价或非共价地组装。两个已组装的多聚化结构域构成相互作用对，其可能是指导的或非指导的。图11B描绘了异四聚蛋白质复合物，其包含如图11A中所描绘的两种异二聚复合物。可以设想更高阶的复合物。

[0172] 图12显示如下异聚蛋白质复合物的示意性例子，所述异聚蛋白质复合物包含I型受体多肽(指示为“I”)(例如，与来自人或其他物种的ALK4蛋白的细胞外结构域至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的多肽，如本文所述的那些)和II型受体多肽(指示为“II”)(例如，与来自人或其他物种的ActRIIB蛋白的细胞外结构域至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的多肽，如本文所述的那些)。在所说明的实施方案中，I型受体多肽是包含相互作用对的第一成员(“C_1”)的融合多肽的一部分，并且II型受体多肽是包含相互作用对的第二成员(“C_2”)的融合多肽的一部分。在每种融合多肽中，接头可以定位于I型或II型受体多肽与相互作用对的相应成员之间。相互作用对的第一成员和第二成员可能是指导(不对称)对，意味着所述对的成员优先彼此缔合而不是自缔合，或者相互作用对可能是非指导的，意味着所述对的成员可以彼此缔合或自缔合，没有明显偏好，并且可以具有相同或不同的氨基酸序列。传统的Fc融合蛋白和抗体是非指导相互作用对的例子，而多种工程化Fc结构域被设计为指导(不对称)相互作用对[例如，Spiess等人(2015)Molecular Immunology 67(2A):95-106]。

[0173] 图13A-图13D显示如下异聚蛋白质复合物的示意性例子，所述异聚蛋白质复合物包含ALK4多肽(例如，与来自人或其他物种的ALK4蛋白的细胞外结构域至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的多肽，如本文所述的那些)和ActRIIB多肽(例如，与来自人或其他物种的ActRIIB蛋白的细胞外结构域至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的多肽，如本文所述的那些)。在所说明的实施方案中，ALK4多肽是包含相互作用对的第一成员(“C_1”)的融合多肽的一部分，并且ActRIIB多肽是包含相互作用对的第二成员(“C_2”)的融合多肽的一部分。合适的相互作用对包括例如重链和/或轻链免疫球蛋白相互作用对、其截短物和变体，如本文所述的那些[例如，Spiess等人(2015)Molecular Immunology 67(2A):95-106]。在每种融合多肽中，接头可以定位于ALK4或ActRIIB多肽与相互作用对的相应成员之间。相互作用对的第一成员和第二成员可能是非指导的，意味着所述对的成员可以彼此缔合或自缔合，没有明显偏好，并且它们可以具有相同或不同的氨基酸序列。参见图13A。可替代地，相互作用对可能是指导(不对称的)对，意味着所述对的成员优先彼此缔合而不是自缔合。参见图13B。可以设想更高阶的复合物。参见图13C和图13D。

[0174] 图14显示在CHO细胞中表达的ActRIIA-hFc的纯化。所述蛋白质纯化为单个的界限清晰的峰，如通过粒度分级柱(上图)和考马斯染色SDS-PAGE(下图)(左图：分子量标准品；右图：ActRIIA-hFc)所可视化的。

[0175] 图15显示ActRIIA-hFc与激活素(上图)和GDF-11(下图)的结合，如通过Biacore™测定所测量。

[0176] 图16A和图16B显示包含变体或未修饰的ActRIIB结构域的同二聚Fc融合多肽的配

体结合动力学的值，如在37℃通过表面等离子体共振所确定。氨基酸编号是基于SEQ ID NO:2。ND#表明，所述值在所测试的浓度范围内无法检测。短暂*表明，所述值由于相互作用的短暂性而是不确定的。对照样品是ActRIIB-G1Fc(SEQ ID NO:5)。

[0177] 图17显示包含变体或未修饰的ActRIIB结构域的同二聚Fc融合多肽的配体结合动力学的值，如在37℃通过表面等离子体共振所确定。氨基酸编号是基于SEQ ID NO:2。ND#表明，所述值在所测试的浓度范围内无法检测。短暂结合*表明，所述值由于相互作用的短暂性而是不确定的。对照样品是ActRIIB-G1Fc(SEQ ID NO:5)。

[0178] 图18显示包含变体或未修饰的ActRIIB结构域的同二聚Fc融合多肽的配体结合动力学的值，如在25℃通过表面等离子体共振所确定。ND#表明，所述值在所测试的浓度范围内无法检测。氨基酸编号是基于SEQ ID NO:2。

[0179] 图19显示与ActRIIB-Fc同二聚体和ALK4-Fc同二聚体相比，ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚蛋白质复合物的比较性配体结合数据。对于每种蛋白质复合物，将配体按k_{off}(它是与配体信号传导抑制密切相关的动力学常数)排序，并且以结合亲和力的降序列出(结合最紧密的配体在顶部列出)。在左侧，黄色、红色、绿色和蓝色线指示解离速率常数的量级。黑色实线指示如下配体，所述配体与异二聚体的结合与同二聚体相比增强或不变，而红色划线指示与同二聚体相比显著降低的结合。如图所示，ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异二聚体展示与任一同二聚体相比增强的与激活素B的结合，保留如用ActRIIB-Fc同二聚体所观察到的与激活素A、GDF8和GDF11的强结合，并且展现显著降低的与BMP9、BMP10和GDF3的结合。与ActRIIB-Fc同二聚体一样，所述异二聚体保留与BMP6的中间水平结合。

[0180] 图20显示比较性ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异二聚体/ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体IC_{50}数据，如本文所述通过A-204报告基因测定所确定。ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异二聚体与ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体类似地抑制激活素A、激活素B、GDF8和GDF11信号传导途径。然而，对BMP9和BMP10信号传导途径的ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异二聚体抑制与ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体相比显著降低。这些数据表明，与相应ActRIIB:ActRIIB同二聚体相比，ActRIIB:ALK4异二聚体是激活素A、激活素B、GDF8和GDF11的更具选择性的拮抗剂。

[0181] 图21显示ActRIIB-Fc:ALK7-Fc异二聚蛋白质复合物与ActRIIB-Fc同二聚体和ALK7-Fc同二聚体相比较的比较性配体结合数据。对于每种蛋白质复合物，将配体按k_{off}(它是与配体信号传导抑制密切相关的动力学常数)排序，并且以结合亲和力的降序列出(结合最紧密的配体在顶部列出)。在左侧，黄色、红色、绿色和蓝色线指示解离速率常数的量级。黑色实线指示如下配体，所述配体与异二聚体的结合与同二聚体相比增强或不变，而红色划线指示与同二聚体相比显著降低的结合。如图所示，具有与ActRIIB-Fc同二聚体的强结合的五种配体中的四种(激活素A、BMP10、GDF8和GDF11)展现与ActRIIB-Fc:ALK7-Fc异二聚体的降低的结合，例外是激活素B，其保留与所述异二聚体的紧密结合。类似地，具有与ActRIIB-Fc同二聚体的中等结合的四种配体中的三种(GDF3、BMP6和特别是BMP9)展现与ActRIIB-Fc:ALK7-Fc异二聚体的降低的结合，而与激活素AC的结合增加至变为总体上与所述异二聚体的第二强的配体相互作用。最后，激活素C和BMP5意外地以中等强度结合ActRIIB-Fc:ALK7异二聚体，但是与ActRIIB-Fc同二聚体无结合(激活素C)或弱结合(BMP5)。所测试的配体都不与ALK7-Fc同二聚体结合。

[0182] 图22显示来源于多种脊椎动物物种的ALK7细胞外结构域(SEQ ID NO:425-430)的

多序列比对。

[0183] 图23在左心重塑期间ActRIIB-Fc:ALK4-Fc校正的左心室结构改变。A.伴随扩张型心肌病的左心重塑的说明。来自Houser等人,2012的修改的图。图B-E显示以下小鼠的结果:接受等体积量的PBS媒介物持续6个月的中年Mdx-媒介物小鼠和接受等体积量的PBS媒介物持续2个月的老年Mdx-媒介物小鼠,或者接受ActRIIB-Fc:ALK4-Fc(10mg/kg)持续6个月的中年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc小鼠和接受ActRIIB-Fc:ALK4-Fc(10mg/kg)持续2个月的老年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc。图B显示,与中年WT-媒介物(n=7,p>0.05)或年幼WT小鼠(n=3,p>0.05)相比,LVESV在中年Mdx-媒介物(n=8)小鼠中有所增加,但是如由中年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc所示,LVESV通过ActRIIB-Fc:ALK4-Fc治疗显著降低(n=6,p<0.5)。与老年WT-媒介物(n=5,p>0.05)或年幼WT小鼠(n=3,p>0.05)相比,LVESV在老年Mdx-媒介物(n=3)小鼠中有所增加,但是如由老年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc所示,LVESV通过ActRIIB-Fc:ALK4-Fc治疗显著降低(n=4,p<0.001)。C.LV离心性肥大参考质量(LVM)与容积(LVESV)的比率,并且被描述为肥大指数。与中年WT-媒介物(n=7,p>0.05)或年幼WT小鼠(n=3,p>0.05)相比,肥大指数在中年Mdx-媒介物(n=8)小鼠中有所降低,但是如由中年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc所示,肥大指数通过ActRIIB-Fc:ALK4-Fc治疗有所增加(n=6,p>0.5)。与老年WT-媒介物(n=5,p>0.05)或年幼WT小鼠(n=3,p>0.05)相比,肥大指数在老年Mdx-媒介物小鼠(n=3)小鼠中有所降低,但是如由老年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc所示,肥大指数通过ActRIIB-Fc:ALK4-Fc治疗有所增加(n=4,p>0.05)。D.LV相对壁厚度参考LV壁厚度(LVWT)与心缩期结束时的LV直径(LVESD)的比率。与中年WT-媒介物(n=7,p>0.05)或年幼WT小鼠(n=3,p>0.05)相比,相对壁厚度在中年Mdx-媒介物(n=8)小鼠中有所降低,但是如由中年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc所示,相对壁厚度通过ActRIIB-Fc:ALK4-Fc治疗有所增加(n=6,p>0.5)。与老年WT-媒介物(n=5,p>0.05)或年幼WT小鼠(n=3,p>0.05)相比,相对壁厚度在老年Mdx-媒介物(n=3)小鼠中有所降低,但是如由老年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc所示,相对壁厚度通过ActRIIB-Fc:ALK4-Fc治疗有所增加(n=4,p>0.05)。E.归一化的心脏重量参考全心重量与体重的比率。与老年WT-媒介物(n=5,p>0.05)或年幼WT小鼠(n=3,p<0.01)相比,归一化的心脏重量在老年Mdx-媒介物(n=3)小鼠中有所增加,但是如由老年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc所示,归一化的心脏重量通过ActRIIB-Fc:ALK4-Fc治疗有所降低(n=4,p>0.05)。与年幼WT小鼠(n=3,p<0.05)相比,归一化的心脏重量在老年WT-媒介物(n=5)小鼠中显著增加。

[0184] 图24ActRIIB-Fc:ALK4-Fc在左心重塑期间挽救左心室收缩功能障碍。图A-D显示以下小鼠的结果:接受等体积量的PBS媒介物持续6个月的中年Mdx-媒介物小鼠和接受等体积量的PBS媒介物持续2个月的老年Mdx-媒介物小鼠,或者接受ActRIIB-Fc:ALK4-Fc(10mg/kg)持续6个月的中年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc小鼠和接受ActRIIB-Fc:ALK4-Fc(10mg/kg)持续2个月的老年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc。A.与中年WT-媒介物(n=7,p>0.05)或年幼WT小鼠(n=3,p>0.05)相比,射血分数在中年Mdx-媒介物(n=8)小鼠中有所降低,但是如由中年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc所示,射血分数通过ActRIIB-Fc:ALK4-Fc治疗显著增加(n=6,p<0.5)。与老年WT-媒介物(n=5,p>0.05)或年幼WT小鼠(n=3,p>0.05)相比,射血分数在老年Mdx-媒介物(n=3)小鼠中有所降低,但是如由老年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc所示,射血分数通过ActRIIB-Fc:ALK4-Fc治疗显著增加(n=4,p<0.01)。B.与中年WT-媒介物(n=7,p>

0.05)或年幼WT小鼠(n＝3,p>0.05)相比,缩短分数在中年Mdx-媒介物(n＝8)小鼠中有所降低,但是如由中年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc所示,缩短分数通过ActRIIB-Fc:ALK4-Fc治疗显著增加(n＝6,p<0.5)。与老年WT-媒介物(n＝5,p>0.05)或年幼WT小鼠(n＝3,p>0.05)相比,缩短分数在老年Mdx-媒介物(n＝3)小鼠中有所降低,但是如由老年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc所示,缩短分数通过ActRIIB-Fc:ALK4-Fc治疗显著增加(n＝4,p<0.01)。C.通过高灵敏度小鼠cTnI ELISA试剂盒测量血清cTnI水平。与中年WT-媒介物(n＝6,p<0.05)或年幼WT小鼠(n＝2,p<0.05)相比,血清cTnI水平在中年Mdx-媒介物(n＝3)小鼠中明显增加,但是如由中年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc所示,血清cTnI水平通过ActRIIB-Fc:ALK4-Fc治疗显著降低(n＝5,p<0.05)。D.在图2A和图2C中呈现的数据的射血分数与血清cTnI之间存在中等反相关(皮尔逊系数,r＝-0.39)(p<0.01)。

具体实施方式

[0185] 1.概述

[0186] 在某些方面,本公开文本涉及使用TGF-β超家族配体拮抗剂、特别是ActRII-ALK4拮抗剂来治疗心力衰竭的方法。例如,如本文所述的ActRII-ALK4拮抗剂可以用于治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或心力衰竭的一种或多种并发症或降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的进展率和/或严重性。

[0187] 心力衰竭(HF)是一种临床综合征,特征为包括呼吸急促、踝肿胀和疲劳的症状,可能伴随由结构性和/或功能性心脏异常引起的包括颈静脉压升高、肺湿啰音和外周性水肿的体征。HF通常导致在静息时或在应激期间心排血量减少和/或心内压升高。

[0188] 在临床症状变明显之前,患者可能呈现无症状的结构性或功能性心脏异常(例如,收缩或舒张左心室(LV)功能障碍),其为HF的前兆。对这些前兆的识别是重要的,因为它们与较差结局相关,并且在前兆阶段开始治疗可以降低患有无症状收缩LV功能障碍的患者的死亡率。

[0189] 潜在心脏原因的证实对于HF的诊断至关重要。这通常包括引起收缩和/或舒张心室功能障碍的心肌异常。然而,瓣膜、心包、心内膜、心律和传导的异常也可能引起HF(并且通常存在超过一种异常)。潜在心脏问题的鉴定对于治疗原因非常重要,因为精确的病理学决定了所用的具体治疗(例如,用于瓣膜疾病的瓣膜修复或置换、用于伴随EF降低的HF的特定药理学疗法、心动过速性心肌病中的降低心率等)。

[0190] TGF-β超家族配体信号由I型和II型丝氨酸/苏氨酸激酶受体的异聚复合物介导,所述异聚复合物在配体刺激后磷酸化并激活下游Smad蛋白(Massagué,2000,Nat.Rev.Mol.Cell Biol.1:169-178)。这些I型和II型受体都是跨膜多肽,由具有富半胱氨酸区域的配体结合细胞外结构域、跨膜结构域和具有预测的丝氨酸/苏氨酸特异性的胞质结构域构成。I型受体是信号传导必需的,并且II型受体为结合配体所需。I型和II型激活素受体在配体结合后形成稳定复合物,从而导致II型受体对I型受体的磷酸化。

[0191] 两种相关的II型受体ActRIIA和ActRIIB已被鉴定为激活素的II型受体(Mathews和Vale,1991,Cell 65:973-982;Attisano等人,1992,Cell 68:97-108)。除了激活素,ActRIIA和ActRIIB可以与几种其他TGF-β家族蛋白质(包括BMP7、Nodal、GDF8和GDF11)进行

生化相互作用(Yamashita等人,1995,J.Cell Biol.130:217-226;Lee和McPherron,2001,Proc.Natl.Acad.Sci.98:9306-9311;Yeo和Whitman,2001,Mol.Cell 7:949-957;Oh等人,2002,Genes Dev.16:2749-54)。申请人已经发现,可溶ActRIIA-Fc融合多肽和ActRIIB-Fc融合多肽在体内具有显著不同的作用,其中ActRIIA-Fc主要作用于骨,并且ActRIIB-Fc主要作用于骨骼肌。

[0192] TGF-β超家族的配体共有相同的二聚体结构,其中一个单体的中心3-1/2转螺旋装在由另一个单体的β-链形成的凹面上。大多数TGF-β家族成员通过分子间二硫键进一步稳定。这种二硫键横穿另外两个二硫键形成的环,生成被称为"半胱氨酸结"基序者[Lin等人(2006)Reproduction 132:179-190;和Hinck等人(2012)FEBS Letters 586:1860-1870]。

[0193] 激活素是TGF-β超家族的成员,并且最初被发现作为促卵泡激素分泌的调节剂,但随后已经表征了多种生殖和非生殖作用。有三种主要的激活素形式(A、B和AB),它们是两个密切相关的β亚基的同二聚体/异二聚体(分别为$\beta_A\beta_A$、$\beta_B\beta_B$和$\beta_A\beta_B$)。人类基因组还编码主要在肝脏中表达的激活素C和激活素E,并且含有β_C或β_E的异二聚体形式也是已知的。在TGF-β超家族中,激活素是独特的多功能因子,其可以刺激在卵巢和胎盘细胞中的激素产生,支持神经元细胞存活,根据细胞类型积极或消极地影响细胞周期进程,并且至少在两栖动物胚胎中诱导中胚层分化[DePaolo等人(1991)Proc Soc Ep Biol Med.198:500-512;Dyson等人(1997)Curr Biol.7:81-84;和Woodruff(1998)Biochem Pharmacol.55:953-963]。在几种组织中,激活素信号传导被其相关的异二聚体抑制素拮抗。例如,在促卵泡激素(FSH)从垂体的分泌的调节中,激活素促进FSH合成和分泌,而抑制素减少FSH合成和分泌。可以调节激活素生物活性和/或与激活素结合的其他蛋白质包括卵泡抑制素(FS)和α_2-巨球蛋白。

[0194] 如本文所述,与"激活素A"结合的药剂是与β_A亚基特异性结合的药剂,无论是在分离的β_A亚基的情况下还是作为二聚复合物(例如,$\beta_A\beta_A$同二聚体或$\beta_A\beta_B$异二聚体)。在异二聚体复合物(例如,$\beta_A\beta_B$异二聚体)的情况下,与"激活素A"结合的药剂对存在于β_A亚基内的表位具有特异性,但是不与复合物的非β_A亚基(例如,复合物的β_B亚基)内存在的表位结合。类似地,本文所公开的拮抗(抑制)"激活素A"的药剂是抑制如由β_A亚基介导的一种或多种活性的药剂,无论是在分离的β_A亚基的情况下还是作为二聚复合物(例如,$\beta_A\beta_A$同二聚体或$\beta_A\beta_B$异二聚体)。在$\beta_A\beta_B$异二聚体的情况下,抑制"激活素A"的药剂是特异性地抑制β_A亚基的一种或多种活性而不抑制复合物的非β_A亚基(例如,复合物的β_B亚基)的活性的药剂。该原理也适用于结合和/或抑制"激活素B"、"激活素C"和"激活素E"的药剂。本文公开的拮抗"激活素AB"的药剂是抑制如由β_A亚基介导的一种或多种活性和如由β_B亚基介导的一种或多种活性的药剂。

[0195] BMP和GDF一起形成共有TGF-β超家族的特征性折叠的半胱氨酸结细胞因子的家族[Rider等人(2010)Biochem J.,429(1):1-12]。该家族包括例如BMP2、BMP4、BMP6、BMP7、BMP2a、BMP3、BMP3b(也称为GDF10)、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8、BMP8a、BMP8b、BMP9(也称为GDF2)、BMP10、BMP11(也称为GDF11)、BMP12(也称为GDF7)、BMP13(也称为GDF6)、BMP14(也称为GDF5)、BMP15、GDF1、GDF3(也称为VGR2)、GDF8(也称为肌生成抑制蛋白)、GDF9、GDF15和生物皮肤生长因子(decapentaplegic)。除了诱导骨形成的能力(这赋予了BMP的名称)之外,BMP/GDF在众多种组织的发育中展示形态发生活性。BMP/GDF同二聚体和异二聚体与I型和II型受体二聚体的组合相互作用以产生多种可能的信号传导复合物,从而导致两组竞争

的SMAD转录因子之一的激活。BMP/GDF具有高度特异性且局限性的功能。这些功能通过许多方式进行调节，包括BMP/GDF表达的发育限制和通过分泌以高亲和力结合至细胞因子的几种特异性BMP拮抗剂蛋白。令人好奇的是，这些拮抗剂中的多种类似于TGF-β超家族配体。

[0196] 生长和分化因子-8(GDF8)也称为肌生成抑制蛋白。GDF8是骨骼肌质量的负调节剂。GDF8在发育中的骨骼肌和成年骨骼肌中高度表达。转基因小鼠中的GDF8无效突变的特征在于骨骼肌的显著肥大和增生(McPherron等人，Nature，1997，387:83-90)。在牛中(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；以及Kambadur等人，Genome Res.，1997，7:910-915)以及引人注意地在人中(Schuelke等人，NEngl J Med 2004;350:2682-8)，骨骼肌质量的类似增加在GDF8的天然存在的突变中是明显的。研究还表明，与人HIV感染相关的肌肉萎缩伴随GDF8多肽表达的增加(Gonzalez-Cadavid等人，PNAS，1998，95:14938-43)。另外，GDF8可以调节肌肉特异性酶(例如，肌酸激酶)的产生并调节成肌细胞增殖(WO 00/43781)。GDF8前肽可以与成熟的GDF8结构域二聚体非共价结合，从而使其生物活性失活(Miyazono等人(1988)J.Biol.Chem.，263:6407-6415；Wakefield等人(1988)J.Biol.Chem.，263；7646-7654；以及Brown等人(1990)Growth Factors，3:35-43)。与GDF8或结构相关多肽结合并抑制其生物活性的其他多肽包括卵泡抑制素以及可能的卵泡抑制素相关多肽(Gamer等人(1999)Dev.Biol.，208:222-232)。

[0197] 生长和分化因子-11(GDF11)也称为BMP11，是一种分泌蛋白(McPherron等人，1999，Nat.Genet.22:260-264)。GDF11在小鼠发育期间在尾芽、肢芽、上颌弓和下颌弓以及背根神经节中表达(Nakashima等人，1999，Mech.Dev.80:185-189)。GDF11在使中胚层和神经组织模式化中起独特作用(Gamer等人，1999，Dev Biol.，208:222-32)。显示GDF11是发育中的小鸡肢体中软骨形成和肌生成的负调节剂(Gamer等人，2001，Dev Biol.229:407-20)。GDF11在肌肉中的表达也表明其在以与GDF8类似的方式调节肌肉生长中的作用。另外，GDF11在脑中的表达表明，GDF11也可以具有与神经系统功能相关的活性。有趣的是，发现GDF11抑制嗅上皮中的神经发生(Wu等人，2003，Neuron.37:197-207)。

[0198] 部分地，本公开文本的实施例证实，在HFrEF的鼠模型(Mdx模型)中，ActRIIB:ALK4异二聚体有效改善左心重塑期间的各种形态和功能缺陷。特定地，与未治疗组相比，在ActRIIB:ALK4异二聚体治疗的小鼠中LV收缩末径显著减小，表明ActRIIB:ALK4异二聚体改进LV收缩性。数据进一步表明，除了ActRIIB:ALK4异多聚体外，其他ActRII-ALK4拮抗剂可以用于治疗心力衰竭。

[0199] 在某些方面，要根据本文公开的方法和用途(例如，治疗、预防心力衰竭(例如，扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或者心力衰竭的一种或多种并发症，或降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的进展率和/或严重性)使用的ActRII-ALK4拮抗剂是ActRII-ALK4配体陷阱多肽拮抗剂(包括其变体以及其异二聚体和异多聚体)、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂。ActRII-ALK4配体陷阱多肽包括能够与一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6和/或BMP10)结合的TGF-β超家族相关蛋白，包括其变体。因此，ActRII-ALK4配体陷阱通常包括能够拮抗一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6和/或BMP10)的多肽。在一些实施方案中，ActRII-ALK4拮抗剂

包括ActRII-ALK4配体陷阱。在一些实施方案中,ActRII-ALK4配体陷阱包括ActRIIB多肽,包括其变体,还具有同多聚体(例如,ActRIIB同二聚体)和异多聚体(例如,ActRIIB-ALK4或ActRIIB-ALK7异二聚体)。在一些实施方案中,ActRII-ALK4配体陷阱包括ActRIIA多肽,包括其变体,还具有同多聚体(例如,ActRIIA同二聚体)和异多聚体(例如,ActRIIA-ALK4或ActRIIA-ALK7异二聚体)。在其他实施方案中,ActRII-ALK配体陷阱包括可溶配体陷阱蛋白,包括但不限于或者卵泡抑制素多肽以及其变体。在一些实施方案中,ActRII-ALK4拮抗剂包括ActRII-ALK4抗体拮抗剂(抑制激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10、ActRIIB、ActRIIA、ALK4和/或ALK7中的一种或多种的抗体)。在一些实施方案中,ActRII-ALK4拮抗剂包括ActRII-ALK4小分子拮抗剂(例如,抑制激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10、ActRIIB、ActRIIA、ALK4和/或ALK7中的一种或多种的小分子)。在一些实施方案中,ActRII-ALK4拮抗剂包括ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂(例如,抑制激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10、ActRIIB、ActRIIA、ALK4和/或ALK7中的一种或多种的核苷酸序列)。

[0200] 本说明书中使用的术语在本公开文本的上下文中以及在使用每个术语的特定上下文中通常具有它们在本领域中的普通含义。某些术语在下文或本说明书的其他地方进行讨论,以向从业者提供关于描述本公开文本的组合物和方法以及如何制备和使用它们的额外指导。术语的任何使用的范围或含义将从使用它的特定上下文中变得清楚。

[0201] 术语“序列相似性”在其所有语法形式中是指核酸或氨基酸序列之间的同一性或对应性程度,所述核酸或氨基酸序列可以或可以不具有共同的进化起源。

[0202] 关于参考多肽(或者核苷酸)序列的“序列同一性百分比(%)”定义为在比对序列并引入空位(如果需要)以实现最大序列同一性百分比后,且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分,候选序列中与参考多肽(核苷酸)序列的氨基酸残基(或者核酸)相同的氨基酸残基(或者核酸)的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以以本领域技术内的多种方式来实现,例如,使用公众可获得的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数,包括在所比较序列的全长中实现最大比对所需的任何算法。然而,为了本文的目的,使用序列比较计算机程序ALIGN-2生成氨基酸(核酸)序列同一性值%。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech,Inc.编写,并且已将源代码与用户文档一起提交到美国版权局(U.S.Copyright Office)(华盛顿特区(Washington D.C.)20559),并在美国版权局以美国版权注册号TXU510087进行了注册。ALIGN-2程序可从加利福尼亚州南旧金山的Genentech,Inc.公开获得,或者可以从源代码编译。应当编译ALIGN-2程序以在UNIX操作系统(包括数字UNIX V4.0D)上使用。所有序列比较参数均由ALIGN-2程序设置,并且不改变。

[0203] 所有语法形式的“激动”是指激活蛋白质和/或基因(例如,通过激活或扩增该蛋白质的基因表达或通过诱导无活性蛋白质进入活性状态)或提高蛋白质和/或基因的活性的过程。

[0204] 所有语法形式的“拮抗”是指抑制蛋白质和/或基因(例如,通过抑制或降低该蛋白质的基因表达或通过诱导活性蛋白质进入无活性状态)或降低蛋白质和/或基因活性的过程。

[0205] 在整个说明书和权利要求书中结合数值使用的术语“约”和“大约”表示本领域技

术人员熟悉并且可接受的精确度区间。通常，这种精确度区间为±10％。可替代地，并且特别是在生物系统中，术语“约”和“大约”可以意指在给定值的数量级内(优选地≤5倍且更优选地≤2倍)的值。

[0206] 本文所公开的数字范围包括限定所述范围的数字。

[0207] 除非使用术语的上下文另外明确规定，否则术语“一个/一种(a)”和“一个/一种(an)”包括复数指示物。术语“一个/一种(a)”(或“一个/一种(an)”)以及术语“一个或多个/一种或多种”和“至少一个/至少一种”可以在本文中互换使用。此外，当在本文中使用时，“和/或”被视为对两个或更多个指定特征或组分中的每一个与或不与其他特征或组分一起的具体公开。因此，在本文中诸如“A和/或B”的短语中使用的术语“和/或”意图包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)和“B”(单独)。同样，如以短语如“A、B和/或C”使用的术语“和/或”旨在涵盖以下方面中的每一个：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(单独)；B(单独)；以及C(单独)。

[0208] 在整个本说明书中，词语“包含”应被理解为暗示包括所述整数或整数组，但不排除任何其他整数或整数组。

[0209] 2.ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂及其变体

[0210] 在某些方面，要根据本文公开的方法和用途(例如，治疗、预防心力衰竭(例如，扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或者心力衰竭的一种或多种并发症，或降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的进展率和/或严重性)使用的ActRII-ALK4拮抗剂是ActRII-ALK4配体陷阱多肽，包括其变体以及其异二聚体和异多聚体。ActRII-ALK4配体陷阱多肽包括能够与一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6和BMP10)结合的TGF-β超家族相关蛋白，包括其变体。因此，ActRII-ALK4配体陷阱通常包括能够拮抗一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6和BMP10)的多肽。例如，在一些实施方案中，ActRII-ALK4配体陷阱包括ActRII多肽，包括其变体，以及其同多聚体和异多聚体(例如，分别为同二聚体和异二聚体)。如本文所用，术语“ActRII”是指II型激活素受体的家族。该家族包括激活素受体IIA型(ActRIIA)和激活素受体IIB型(ActRIIB)。在一些实施方案中，ActRII-ALK4配体陷阱包括ActRIIB多肽，包括其变体，还具有同多聚体(例如，ActRIIB同二聚体)和异多聚体(例如，ActRIIB-ALK4或ActRIIB-ALK7异二聚体)。在一些实施方案中，ActRII-ALK4配体陷阱包括ActRIIA多肽，包括其变体，还具有同多聚体(例如，ActRIIA同二聚体)和异多聚体(例如，ActRIIA-ALK4或ActRIIA-ALK7异二聚体)。在其他实施方案中，ActRII-ALK配体陷阱包括可溶配体陷阱蛋白，包括但不限于或者卵泡抑制素多肽以及其变体。

[0211] A)ActRIIB多肽

[0212] 在某些方面，本公开文本涉及ActRII-ALK4拮抗剂以及其用途(例如，治疗、预防心力衰竭(HF)或HF的一种或多种并发症或降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的进展率和/或严重性的用途)，所述ActRII-ALK4拮抗剂包括ActRIIB多肽，包括其片段、功能变体和修饰的形式。如本文所用，术语“ActRIIB”是指来自任何物种的激活素受体IIB型(ActRIIB)蛋白家族以及通过诱变或其他修饰源自这样的ActRIIB蛋白的保留有用活性的变体多肽(包括例如突变体、片段、融合物和肽模拟物形式)。这样的变体ActRIIB多肽的例子提供于整个本公开文本中以及国际专利申请公开号WO 2006/012627、WO 2008/097541、

WO 2010/151426、WO 2011/020045、WO 2018/009624和WO 2018/067874中，所述申请通过引用以其整体并入本文。本文中提及ActRIIB时应理解为提及当前鉴定的形式中的任一种。ActRIIB家族的成员通常都是跨膜多肽，由具有富半胱氨酸区域的配体结合细胞外结构域、跨膜结构域和具有预测的丝氨酸/苏氨酸激酶特异性的胞质结构域构成。人ActRIIB前体多肽的氨基酸序列显示于图2(SEQ ID NO:2)和下文中。优选地，要根据本公开文本的方法使用的ActRIIB多肽是可溶的。如本文所用的术语“可溶ActRIIB多肽”包括ActRIIB多肽的任何天然存在的细胞外结构域以及其保留有用活性的任何变体(包括突变体、片段和肽模拟物形式)。例如，ActRIIB多肽的细胞外结构域与配体结合并且通常是可溶的。可溶性ActRIIB多肽的例子包括图3中所示的ActRIIB细胞外结构域(SEQ ID NO:1)以及SEQ ID NO:53。该截短的ActRIIB细胞外结构域(SEQ ID NO:53)基于SEQ ID NO:2中的编号被表示为ActRIIB(25-131)。除了ActRIIB多肽的细胞外结构域外，可溶ActRIIB多肽的其他例子包含信号序列(参见实施例4)。所述信号序列可以是ActRIIB的天然信号序列，或来自另一多肽的信号序列，如组织纤溶酶原激活物(TPA)信号序列或蜜蜂褪黑素信号序列。在一些实施方案中，ActRIIB多肽抑制一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)的(例如，Smad信号传导)。在一些实施方案中，ActRIIB多肽与一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)结合。用于确定ActRIIB多肽结合至和/或抑制一种或多种ActRII-ALK4配体的活性的能力的方法和测定的多个例子公开于本文中或者原本是本领域中熟知的，所述方法和测定可以容易地用于确定ActRIIB多肽是否具有所需结合和/或拮抗活性。本文所述的所有ActRIIB相关多肽的氨基酸的编号均基于下文提供的人ActRIIB前体蛋白序列(SEQ ID NO:2)的编号，除非另外特别指出。

[0213] 人ActRIIB前体蛋白序列如下：

[0214]
```
 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: 2，图2）

[0215] 信号肽用单下划线指示；细胞外结构域以粗体字指示；并且潜在的内源N-连接的糖基化位点用双下划线指示。

[0216] 加工的(成熟的)细胞外ActRIIB多肽序列如下：

[0217] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT(SEQ ID NO:1，图3)。

[0218] 在一些实施方案中，可以产生在N末端具有“SGR……”序列的蛋白质。细胞外结构域的C末端“尾部”由单下划线指示。缺失“尾部”的序列(Δ15序列)如下：GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCN

ERFTHLPEA(SEQ ID NO:386).

[0219] 文献中还报道了在SEQ ID NO:2的位置64处具有丙氨酸(A64)的ActRIIB的形式。参见例如,Hilden等人(1994)Blood,83(8):2163-2170。申请人已经确定包含具有A64取代的ActRIIB的细胞外结构域的ActRIIB-Fc融合蛋白对激活素和GDF11具有相对较低的亲和力。相比之下,具有在位置64处的精氨酸(R64)的相同ActRIIB-Fc融合蛋白对激活素和GDF11具有在低纳摩尔至高皮摩尔范围内的亲和力。因此,具有R64的序列在本公开文本中用作人ActRIIB的"野生型"参考序列。

[0220] 具有在位置64处的丙氨酸的ActRIIB如下:

[0221]
```
  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 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: 387)
```

[0222] 信号肽由单下划线指示,并且细胞外结构域由粗体字指示。

[0223] 替代性A64形式的加工的(成熟的)细胞外ActRIIB多肽序列如下:GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT(SEQ ID NO:388)

[0224] 在一些实施方案中,可以产生在N末端具有"SGR……"序列的蛋白质。细胞外结构域的C末端"尾部"由单下划线指示。缺失"尾部"的序列(Δ15序列)如下:GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEA(SEQ ID NO:389)编码人ActRIIB前体蛋白的核酸序列显示于下文中(SEQ ID NO:4),表示GenBank参考序列NM_001106.3的核苷酸25-1560,其编码ActRIIB前体的氨基酸1-513。如所示的序列提供了位置64处的精氨酸,并且可以被修饰以提供丙氨酸来代替。信号序列加下划线。

[0225]

```
   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 GAGCTCGTGA AGAAGGGCTG 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  TGCCCACAGG GACTTTAAAA GTAAGAATGT ATTGCTGAAG AGCGACCTCA
1001  CAGCCGTGCT GGCTGACTTT GGCTTGGCTG TTCGATTTGA 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 GGTTGAAACA 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: 4，
```

图4）

[0226] 编码加工的细胞外人ActRIIB多肽的核酸序列如下(SEQ ID NO:3)。如所示的序列提供位置64处的精氨酸，并且可以被修饰以提供丙氨酸来代替(参见图5，SEQ ID NO:3)。

[0227]

```
   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: 3)

[0228] B)变体ActRIIB多肽

[0229] 在某些具体实施方案中，本公开文本考虑在ActRIIB多肽的细胞外结构域(也称为配体结合结构域)中进行突变，使得变体(或者突变体)ActRIIB多肽具有改变的配体结合活性(例如，结合亲和力或结合选择性)。在某些情形中下，这样的变体ActRIIB多肽对特定配体具有改变的(升高的或降低的)结合亲和力。在其他情形中，变体ActRIIB多肽对其配体具有改变的结合选择性。例如，本公开文本提供多种变体ActRIIB多肽，其具有与未修饰的ActRIIB多肽相比降低的与BMP9的结合亲和力，但是保留对激活素A、激活素B、GDF8、GDF11和BMP10中的一种或多种的结合亲和力。任选地，变体ActRIIB多肽具有其相应野生型

ActRIIB多肽的类似或相同的生物活性。例如，本公开文本的变体ActRIIB多肽可以与ActRIIB配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11或BMP10)结合并抑制其功能。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽治疗、预防心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症，或者降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的进展率和/或严重性。ActRIIB多肽的例子包括人ActRIIB前体多肽(SEQ ID NO:2)和可溶人ActRIIB多肽(例如，SEQ ID NO:1、5、6、12、276、278、279、332、333、335、336、338、339、341、342、344、345、347、348、350、351、353、354、356、357、385、386、387、388、389、396、398、402、403、406、408和409)。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽是同多聚体(例如，同二聚体)的成员。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽是异多聚体(例如，异二聚体)的成员。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽中的任一种可以与任何本文公开的多肽组合(例如，与其异多聚化和/或融合)。

[0230] ActRIIB在几乎所有脊椎动物之间非常保守，其中大段的细胞外结构域完全保守。参见例如，图6。许多与ActRIIB结合的配体也是高度保守的。因此，来自各种脊椎动物生物体的ActRIIB序列的比较使人了解可以改变的残基。因此，活性人ActRIIB变体可以包括在来自另一种脊椎动物ActRIIB的序列的相应位置处的一个或多个氨基酸，或者可以包括与人或其他脊椎动物序列中的残基类似的残基。

[0231] 本公开文本鉴定ActRIIB的功能活性部分和变体。申请人先前已经确定，具有Hilden等人(Blood.1994年4月15日;83(8):2163-70)披露的序列的Fc融合多肽(其具有在对应于SEQ ID NO:2的氨基酸64的位置处的丙氨酸(A64))对激活素和GDF11具有相对低的亲和力。相比之下，在位置64(R64)处具有精氨酸的相同Fc融合多肽具有在低纳摩尔至高皮摩尔范围内的对激活素和GDF-11的亲和力。因此，在本公开文本中使用具有R64的序列(SEQ ID NO:2)作为人ActRIIB的野生型参考序列，并且本文所述变体的编号是基于SEQ ID NO:2中的编号。另外，本领域技术人员可以在A64背景中制备任何本文所述的ActRIIB变体。

[0232] 加工的细胞外ActRIIB多肽序列显示于SEQ ID NO:1中(参见例如，图3)。在一些实施方案中，可以产生在N末端具有“SGR…”序列的加工的ActRIIB多肽。在一些实施方案中，可以产生在N末端具有“GRG…”序列的加工的ActRIIB多肽。例如，预期一些构建体如果用TPA前导序列表达，将会缺少N末端丝氨酸。因此，本文所述的成熟ActRIIB序列可以以N末端丝氨酸或N末端甘氨酸开始(缺少N末端丝氨酸)。

[0233] Attisano等人(Cell.1992年1月10日;68(1):97-108)显示，在ActRIIB的细胞外结构域的C末端处的脯氨酸结的缺失降低了受体对激活素的亲和力。WO 2008097541中披露的数据显示，相对于包含脯氨酸结区域和完整近膜结构域的ActRIIB(20-134)-Fc，含有SEQ ID NO:2的氨基酸20-119的ActRIIB-Fc融合多肽“ActRIIB(20-119)-Fc”具有降低的与GDF11和激活素的结合。然而，即使脯氨酸结区域被破坏，ActRIIB(20-129)-Fc多肽仍保留相对于野生型类似的但略微降低的活性。因此，预期在氨基酸134、133、132、131、130和129处终止的ActRIIB细胞外结构域都具有活性，但是在134或133处终止的构建体可能是活性最高的。类似地，残基129-134中的任一个处的突变不预期通过大的边缘改变配体结合亲和力。为了支持这一点，P129和P130的突变基本上不会降低配体结合。因此，ActRIIB-Fc融合多肽可以早在氨基酸109(最终的半胱氨酸)结束，然而，预期在109和119处或其间结束的形式具有降低的配体结合。氨基酸119保守性较差，并且因此易于被改变或截短。结束于128或

更晚处的形式保留配体结合活性。结束于119和127处或其间的形式将具有中间结合能力。根据临床或实验环境,可能需要使用这些形式中的任一种。

[0234] 在ActRIIB的N末端,预期始于氨基酸29或之前的多肽将保留配体结合活性。氨基酸29代表初始半胱氨酸。位置24处的丙氨酸至天冬酰胺突变引入N-连接的糖基化序列而实质上不影响配体结合。这证实了信号裂解肽与对应于氨基酸20-29的半胱氨酸交联区域之间的区域中的突变是良好耐受的。具体地说,在位置20、21、22、23和24处开始的构建体将保留活性,并且在位置25、26、27、28和29处开始的构建体也预期保留活性。WO2008097541中显示的数据证实,令人惊讶地,在22、23、24或25处开始的构建体将具有最高活性。

[0235] 总之,ActRIIB的活性部分包含SEQ ID NO:2的氨基酸29-109,并且构建体可以例如在对应于氨基酸20-29的残基处开始并且在对应于氨基酸109-134的位置处结束。其他例子包括在20-29或21-29的位置处开始并在119-134、119-133或129-134、129-133的位置处结束的构建体。其他例子包括在20-24(或21-24或22-25)的位置处开始并在109-134(或109-133)、119-134(或119-133)或129-134(或129-133)的位置处结束的构建体。还考虑在这些范围内的变体,特别是具有与SEQ ID NO:1的相应部分至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的那些。

[0236] 本文所述的变异可以以多种方式组合。在一些实施方案中,ActRIIB变体包含配体结合袋中的不超过1、2、5、6、7、8、9、10或15个保守氨基酸变化,任选地在配体结合袋中的位置40、53、55、74、79和/或82的零个、一个或多个非保守改变。可变性可以特别地良好耐受的结合袋外部的位点包括细胞外结构域的氨基和羧基末端(如上所述)以及位置42-46和65-73(关于SEQ ID NO:2)。在位置65处的天冬酰胺至丙氨酸的改变(N65A)似乎不降低R64背景中的配体结合[美国专利号7,842,663]。这种变化可能消除A64背景中N65处的糖基化,因此证明,这个区域中的显著变化可能耐受。虽然R64A变化的耐受性差,但是R64K是良好耐受的,并且因此另一种碱性残基如H可以在位置64处耐受[美国专利号7,842,663]。另外,本领域描述的诱变程序的结果指示ActRIIB中存在通常有益于保守的氨基酸位置。关于SEQ ID NO:2,这些位置包括位置80(酸性或疏水性氨基酸)、位置78(疏水性氨基酸,并且特别是色氨酸)、位置37(酸性氨基酸,特别是天冬氨酸或谷氨酸)、位置56(碱性氨基酸)、位置60(疏水性氨基酸,特别是苯丙氨酸或酪氨酸)。因此,本公开文本提供了可以在ActRIIB多肽中保守的氨基酸框架。可能需要保守的其他位置如下:位置52(酸性氨基酸)、位置55(碱性氨基酸)、位置81(酸性氨基酸)、98(极性或带电荷的氨基酸,特别是E、D、R或K),所有这些位置都是关于SEQ ID NO:2。

[0237] 先前已经证明,将另一N-连接糖基化位点(N-X-S/T)添加至ActRIIB细胞外结构域中是良好耐受的(参见例如,美国专利号7,842,663)。因此,通常可以在图1中定义的本公开文本的ActRIIB多肽中的配体结合袋外部的位置引入N-X-S/T序列。用于引入非内源N-X-S/T序列的特别合适的位点包括氨基酸20-29、20-24、22-25、109-134、120-134或129-134(关于SEQ ID NO:2)。还可以将N-X-S/T序列引入ActRIIB序列与Fc结构域或其他融合组分之间的接头中,以及任选地引入融合组分本身中。这样的位点可以通过关于预先存在的S或T在正确位置引入N,或者通过在对应于预先存在的N的位置引入S或T,毫不费力地进行引入。因此,会产生N-连接糖基化位点的所需改变是:A24N、R64N、S67N(可能与N65A改变组合)、E105N、R112N、G120N、E123N、P129N、A132N、R112S和R112T(关于SEQ ID NO:2)。由于糖基化

提供的保护作用，预测被糖基化的任何S可以改变为T而不产生免疫原性位点。同样，预测被糖基化的任何T可以改变为S。因此，考虑改变S67T和S44T(关于SEQ ID NO:2)。同样，在A24N变体中，可以使用S26T改变。因此，本公开文本的ActRIIB多肽可以是具有一个或多个如上所述的其他非内源N-连接糖基化共有序列的变体。

[0238] 在某些实施方案中，变体ActRIIB多肽具有与选自SEQ ID NO:1、2和53的氨基酸序列至少75％相同的氨基酸序列。在某些情形中，变体ActRIIB多肽具有与选自SEQ ID NO:1、2和53的氨基酸序列至少80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在某些情形中，变体ActRIIB多肽具有与SEQ ID NO:1至少80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在某些情形中，变体ActRIIB多肽具有与SEQ ID NO:2至少80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在某些情形中，变体ActRIIB多肽具有与SEQ ID NO:53至少80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

[0239] 在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:1、2、5、6、12、31、33、34、36、37、39、40、42、43、45、46、48、49、50、51、52、53、276、278、279、332、333、335、336、338、339、341、342、344、345、347、348、350、351、353、354、356、357、385、386、387、388、389、396、398、402、403、406、408和409中任一个的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:1的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:2的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:5的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:6的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:12的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端

去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:31的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:33的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:33的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:34的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:34的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:36的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:36的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:37的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:37的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:39的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:39的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:40的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:40的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:42的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:42的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:43的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:43的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:45的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、

94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:45的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:46的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:46的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:48的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:48的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:49的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:49的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:50的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:50的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:51的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:51的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:52的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:52的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:53的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:53的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:276的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:276的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:278的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:278的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本

公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:279的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:279的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:332的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:332的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:333的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:333的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:335的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:335的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:336的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:336的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:338的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:338的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:339的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:339的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:341的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:341的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:342的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:342的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:344的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、

95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:344的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:345的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:345的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:347的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:347的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:348的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:348的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:350的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:350的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:351的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:351的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:353的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:353的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:354的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:354的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:356的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:356的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:357的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:357的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施

方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:385的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:385的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:386的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:386的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:387的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:387的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:388的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:388的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:389的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:389的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:396的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:396的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:398的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:398的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:402的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:402的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:403的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:403的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:406的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、

94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:406的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:408的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:408的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。在一些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽或变体ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:409的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。包含SEQ ID NO:409的ActRIIB-Fc融合蛋白可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0240] 在某些方面，本公开文本涉及变体ActRIIB多肽，所述变体ActRIIB多肽包含与在SEQ ID NO:2的氨基酸20-29中的任一个(例如，氨基酸残基20、21、22、23、24、25、26、27、28或29)处开始并且在SEQ ID NO:2的氨基酸109-134中的任一个(例如，氨基酸残基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)处结束的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，并且其中所述多肽包含在SEQ ID NO:2中选自以下的位置处的一个或多个氨基酸取代:K55、F82、L79、A24、K74、R64、P129、P130、E37、R40、D54、R56、W78、D80和F82;以及包含一种或多种这样的变体ActRIIB多肽的异多聚体复合物。在某些方面，本公开文本涉及变体ActRIIB多肽，所述变体ActRIIB多肽包含与在SEQ ID NO:2的氨基酸20-29中的任一个(例如，氨基酸残基20、21、22、23、24、25、26、27、28或29)处开始并且在SEQ ID NO:2的氨基酸109-134中的任一个(例如，氨基酸残基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)处结束的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，并且其中所述多肽包含在SEQ ID NO:2的位置处的一个或多个氨基酸取代，但是其中在对应于SEQ ID NO:2的79的位置处的氨基酸是亮氨酸;以及包含一种或多种这样的变体ActRIIB多肽的异多聚体复合物。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:2的氨基酸29-109至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:2的氨基酸25-131至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:2的氨基酸20-134至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:53的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少75％、80％、85％、

90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的A24的氨基酸位置的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是A24N。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的S26的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是S26T。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的N35的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是N35E。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的E37的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是E37A。在一些实施方案中，所述取代是E37D。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L38的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是L38N。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的R40的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是R40A。在一些实施方案中，所述取代是R40K。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的S44的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是S44T。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L46的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是L46A。例如，在一些实施方案中，所述取代是L46I。例如，在一些实施方案中，所述取代是L46F。例如，在一些实施方案中，所述取代是L46V。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的E50的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是E50K。在一些实施方案中，所述取代是E50L。在一些实施方案中，所述取代是E50P。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的E52的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是E52A。在一些实施方案中，所述取代是E52D。在一些实施方案中，所述取代是E52G。在一些实施方案中，所述取代是E52H。在一些实施方案中，所述取代是E52K。在一些实施方案中，所述取代是E52N。在一些实施方案中，所述取代是E52P。在一些实施方案中，所述取代是E52R。在一些实施方案中，所述取代是E52S。在一些实施方案中，所述取代是E52T。在一些实施方案中，所述取代是E52Y。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的Q53的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是Q53R。例如，在一些实施方案中，所述取代是Q53K。例如，在一些实施方案中，所述取代是Q53N。例如，在一些实施方案中，所述取代是Q53H。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的D54的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是D54A。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的K55的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是K55A。在一些实施方案中，所述取代是K55E。在一些实施方案中，所述取代是K55D。在一些实施方案中，所述取代是K55R。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的R56的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是R56A。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L57的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是L57R。在一些实施方案中，所述取代是L57E。在一些实施方案中，所述取代是L57I。在一些实施方案中，所述取代是L57T。在一些实施方案中，所述取代是L57V。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的Y60的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是Y60F。在一些实施方案中，所述取代是Y60D。在一些实施方案中，所述取代是Y60K。在一些实施方案中，所述取代是Y60P。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:

2的R64的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如,在一些实施方案中,所述取代是R64K。在一些实施方案中,所述取代是R64N。在一些实施方案中,所述取代是R64A。在一些实施方案中,所述取代是R64H。在一些实施方案中,所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的N65的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如,在一些实施方案中,所述取代是N65A。在一些实施方案中,所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的S67的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如,在一些实施方案中,所述取代是S67N。在一些实施方案中,所述取代是S67T。在一些实施方案中,所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的G68的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如,在一些实施方案中,所述取代是G68R。在一些实施方案中,所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的K74的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如,在一些实施方案中,所述取代是K74A。在一些实施方案中,所述取代是K74E。在一些实施方案中,所述取代是K74F。在一些实施方案中,所述取代是K74I。在一些实施方案中,所述取代是K74Y。在一些实施方案中,所述取代是K74R。在一些实施方案中,所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的W78的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如,在一些实施方案中,所述取代是W78A。在一些实施方案中,所述取代是W78Y。在一些实施方案中,所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L79的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如,在一些实施方案中,所述取代是L79D。在一些实施方案中,所述取代不包括在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的酸性氨基酸。在一些实施方案中,所述取代并非在SEQ ID NO:2的位置L79处。在一些实施方案中,SEQ ID NO:2的位置L79未被取代。在一些实施方案中,所述取代不包括在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的天冬氨酸(D)。在一些实施方案中,所述取代是L79A。在一些实施方案中,所述取代是L79E。在一些实施方案中,所述取代是L79F。在一些实施方案中,所述取代是L79H。在一些实施方案中,所述取代是L79K。在一些实施方案中,所述取代是L79P。在一些实施方案中,所述取代是L79R。在一些实施方案中,所述取代是L79S。在一些实施方案中,所述取代是L79T。在一些实施方案中,所述取代是L79W。在一些实施方案中,所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的D80的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如,在一些实施方案中,所述取代是D80A。在一些实施方案中,所述取代是D80F。在一些实施方案中,所述取代是D80K。在一些实施方案中,所述取代是D80G。在一些实施方案中,所述取代是D80M。在一些实施方案中,所述取代是D80I。在一些实施方案中,所述取代是D80N。在一些实施方案中,所述取代是D80R。在一些实施方案中,所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如,在一些实施方案中,所述取代是F82I。在一些实施方案中,所述取代是F82K。在一些实施方案中,所述取代是F82A。在一些实施方案中,所述取代是F82W。在一些实施方案中,所述取代是F82D。在一些实施方案中,所述取代是F82Y。在一些实施方案中,所述取代是F82E。在一些实施方案中,所述取代是F82L。在一些实施方案中,所述取代是F82T。在一些实施方案中,所述取代是F82S。在一些实施方案中,所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的N83的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如,在一些实施方案中,所述取代是N83A。在一些实施方案中,所述取代是N83R。在一些实施方案中,所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的T93的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如,在一些实施方案中,所述取代是T93D。在一些实施方案中,所述取代是T93E。在一些实施方案中,所述取代是T93H。在一些实施方案中,所述取代是T93G。在一些实施方案中,所述取代是T93K。在一些实施方案中,所述取代是T93P。在一些实施方案中,所述取代是T93R。在一些实施方案中,所述取代是T93S。在一些实施方案中,所述取代是T93Y。在一些实施方案中,所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的E94

的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是E94K。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的Q98的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是Q98D。在一些实施方案中，所述取代是Q98E。在一些实施方案中，所述取代是Q98K。在一些实施方案中，所述取代是Q98R。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的V99的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是V99E。在一些实施方案中，所述取代是V99G。在一些实施方案中，所述取代是V99K。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的E105的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是E105N。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的E106的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是E106N。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F108的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是F108I。在一些实施方案中，所述取代是F108L。在一些实施方案中，所述取代是F108V。在一些实施方案中，所述取代是F108Y。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的E111的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是E111K。在一些实施方案中，所述取代是E111D。在一些实施方案中，所述取代是E111R。在一些实施方案中，所述取代是E111H。在一些实施方案中，所述取代是E111Q。在一些实施方案中，所述取代是E111N。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的R112的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是R112H。在一些实施方案中，所述取代是R112K。在一些实施方案中，所述取代是R112N。在一些实施方案中，所述取代是R112S。在一些实施方案中，所述取代是R112T。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的A119的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是A119P。在一些实施方案中，所述取代是A119V。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的G120的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是G120N。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的E123的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是E123N。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的P129的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是P129S。在一些实施方案中，所述取代是P129N。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的P130的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是P130A。在一些实施方案中，所述取代是P130R。在一些实施方案中，所述多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的A132的氨基酸位置处的氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述取代是A132N。

[0241] 在一些实施方案中，任何本文公开的变体ActRIIB多肽包含在SEQ ID NO:2中选自以下的位置处的取代:A24、E37、R40、D54、K55、R56、R64、K74、W78、L79、D80、F82、P129和P130。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在关于SEQ ID NO:2的位置A24处的取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在关于SEQ ID NO:2的位置E37处的取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在关于SEQ ID NO:2的位置R40处的取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在关于SEQ ID NO:2的位置D54处的取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在关于SEQ ID NO:2的位置K55处的取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在关于SEQ ID NO:2的位置R56处的取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在关于SEQ ID NO:2的位置R64处的取

代。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在关于SEQ ID NO:2的位置K74处的取代。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在关于SEQ ID NO:2的位置W78处的取代。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在关于SEQ ID NO:2的位置L79处的取代。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在关于SEQ ID NO:2的位置D80处的取代。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在关于SEQ ID NO:2的位置F82处的取代。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在关于SEQ ID NO:2的位置P129处的取代。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在关于SEQ ID NO:2的位置P130处的取代。

[0242] 在某些方面,本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽,所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的K55的位置处的丙氨酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:31的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0243] 在某些方面,本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽,所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:33的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的K55的位置处的丙氨酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:33的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0244] 在某些方面,本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽,所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:34的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的K55的位置处的谷氨酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:34的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0245] 在某些方面,本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽,所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:36的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的K55的位置处的谷氨酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:36的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0246] 在某些方面,本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽,所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:37的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的异亮氨酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:37的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0247] 在某些方面,本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽,所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:39的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的异亮氨酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:39的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0248] 在某些方面,本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽,所述变体ActRIIB多肽包含

与SEQ ID NO:40的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的赖氨酸。在一些实施方案中，SEQ IDNO:40的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0249] 在某些方面，本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽，所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:42的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的赖氨酸。在一些实施方案中，SEQ ID NO:42的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0250] 在某些方面，本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽，所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:43的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的谷氨酸。在一些实施方案中，SEQ ID NO:43的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0251] 在某些方面，本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽，所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:45的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的谷氨酸。在一些实施方案中，SEQ ID NO:45的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0252] 在某些方面，本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽，所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:336的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的苏氨酸。在一些实施方案中，SEQ ID NO:336的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0253] 在某些方面，本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽，所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:338的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的苏氨酸。在一些实施方案中，SEQ ID NO:338的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0254] 在某些方面，本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽，所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:342的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的组氨酸。在一些实施方案中，SEQ ID NO:342的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0255] 在某些方面，本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽，所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:344的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的组氨酸。在一些实施方案中，SEQ ID NO:344的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0256] 在某些方面，本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽，所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:348的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的E50的位置处的亮氨酸。在一些实施方案中，SEQ ID NO:348的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0257] 在某些方面，本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽，所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:350的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的E50的位置处的亮氨酸。在一些实施方案中，SEQ ID NO:350的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0258] 在某些方面，本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽，所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:354的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的V99的位置处的甘氨酸。在一些实施方案中，SEQ ID NO:354的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0259] 在某些方面，本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽，所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:356的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的V99的位置处的甘氨酸。在一些实施方案中，SEQ ID NO:356的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0260] 在一些实施方案中，任何本文公开的变体ActRIIB多肽包含任何本文公开的氨基酸取代中的至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个。在一些实施方案中，任何本文公开的变体ActRIIB多肽包含任何本文公开的氨基酸取代中的2个。在一些实施方案中，任何本文公开的变体ActRIIB多肽包含任何本文公开的氨基酸取代中的3个。在一些实施方案中，任何本文公开的变体ActRIIB多肽包含任何本文公开的氨基酸取代中的4个。在一些实施方案中，任何本文公开的变体ActRIIB多肽包含任何本文公开的氨基酸取代中的5个。在一些实施方案中，任何本文公开的变体ActRIIB多肽包含任何本文公开的氨基酸取代中的6个。在一些实施方案中，任何本文公开的变体ActRIIB多肽包含任何本文公开的氨基酸取代中的7个。在一些实施方案中，任何本文公开的变体ActRIIB多肽包含任何本文公开的氨基酸取代中的8个。在一些实施方案中，任何本文公开的变体ActRIIB多肽包含任何本文公开的氨基酸取代中的9个。在一些实施方案中，任何本文公开的变体ActRIIB多肽包含任何本文公开的氨基酸取代中的10个。

[0261] 在某些方面，本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽，如与SEQ ID NO:2的参考氨基酸序列相比，其包含两个或更多个氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含A24N取代和K74A取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含L79P取代和K74A取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含P129S取代和P130A取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含L38N取代和L79R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含F82I取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含F82K取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含F82T取代和

N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含L79H取代和F82K取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含L79H取代和F82I取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含F82D取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含F82E取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含L79F取代和F82D取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含L79F取代和F82T取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含E52D取代和F82D取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含E52D取代和F82T取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含L57R取代和F82D取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含L57R取代和F82T取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含F82I取代和E94K取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含F82S取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含L57R取代和F82S取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含K74A取代和L79P取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含K55A取代和F82I取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含L79K取代和F82K取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含F82W取代和N83A取代。

[0262] 在某些方面，本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽，所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:276的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的异亮氨酸。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的N83的位置处的精氨酸。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的异亮氨酸和在对应于SEQ ID NO:2的N83的位置处的精氨酸。在一些实施方案中，SEQ ID NO:276的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0263] 在某些方面，本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽，所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:278的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的异亮氨酸。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的N83的位置处的精氨酸。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的异亮氨酸和在对应于SEQ ID NO:2的N83的位置处的精氨酸。在一些实施方案中，SEQ ID NO:278的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0264] 在某些方面，本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽，所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:279的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的赖氨酸。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的N83的位置处的精氨酸。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的赖氨酸和在对应于SEQ ID NO:2的N83的位置处的精氨酸。在一些实施方案中，SEQ ID NO:279的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0265] 在某些方面，本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽，所述变体ActRIIB多肽包含

与SEQ ID NO:332的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的赖氨酸。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的N83的位置处的精氨酸。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的赖氨酸和在对应于SEQ ID NO:2的N83的位置处的精氨酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:332的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0266] 在某些方面,本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽,所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:333的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的苏氨酸。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的N83的位置处的精氨酸。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的苏氨酸和在对应于SEQ ID NO:2的N83的位置处的精氨酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:333的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0267] 在某些方面,本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽,所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:335的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的苏氨酸。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的N83的位置处的精氨酸。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的苏氨酸和在对应于SEQ ID NO:2的N83的位置处的精氨酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:335的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0268] 在某些方面,本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽,所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:339的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的组氨酸。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的异亮氨酸。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的组氨酸和在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的异亮氨酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:339的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0269] 在某些方面,本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽,所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:341的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的组氨酸。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的异亮氨酸。在一些实施方案中,所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的组氨酸和在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的异亮氨酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:341的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0270] 在某些方面，本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽，所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:345的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的组氨酸。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的赖氨酸。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的组氨酸和在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的赖氨酸。在一些实施方案中，SEQ ID NO:345的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0271] 在某些方面，本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽，所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:347的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的组氨酸。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的赖氨酸。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的组氨酸和在对应于SEQ ID NO:2的F82的位置处的赖氨酸。在一些实施方案中，SEQ ID NO:347的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0272] 在某些方面，本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽，所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:351的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L38的位置处的天冬酰胺。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的精氨酸。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L38的位置处的天冬酰胺和在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的精氨酸。在一些实施方案中，SEQ ID NO:351的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0273] 在某些方面，本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽，所述变体ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:353的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L38的位置处的天冬酰胺。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的精氨酸。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的L38的位置处的天冬酰胺和在对应于SEQ ID NO:2的L79的位置处的精氨酸。在一些实施方案中，SEQ ID NO:353的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[0274] 在某些方面，本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽，如与SEQ ID NO:2的参考氨基酸序列相比，其包含三个或更多个氨基酸取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含G68R取代、F82S取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含G68R取代、W78Y取代和F82Y取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含E52D取代、F82D取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含E52Y取代、F82D取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含E52D取代、F82E取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含E52D取代、F82T取代和N83R取代。在一些

实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含E52N取代、F82I取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含E52N取代、F82Y取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含E50L取代、F82D取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含L57I取代、F82D取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含L57V取代、F82D取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含L57R取代、F82D取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含L57E取代、F82E取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含L57R取代、F82E取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含L57I取代、F82E取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含L57R取代、F82L取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含L57T取代、F82Y取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含L57V取代、F82Y取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽可以包含任何上文变体ActRIIB多肽中所述的氨基酸取代中的至少两个。

[0275] 在某些方面，本公开文本涉及一种变体ActRIIB多肽，如与SEQ ID NO:2的参考氨基酸序列相比，其包含四个或更多个氨基酸取代。例如，在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含G68R取代、L79E取代、F82Y取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含G68R取代、L79E取代、F82T取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含G68R取代、L79T取代、F82T取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽包含E52N取代、G68R取代、F82Y取代和N83R取代。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽可以包含任何上文变体ActRIIB多肽中所述的氨基酸取代中的至少两个。在一些实施方案中，所述变体ActRIIB多肽可以包含任何上文变体ActRIIB多肽中所述的氨基酸取代中的至少三个。

[0276] C)ActRIIA多肽

[0277] 在某些实施方案中，本公开文本涉及ActRII-ALK4拮抗剂以及其用途(例如，治疗、预防心力衰竭(HF)或HF的一种或多种并发症或降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的进展率和/或严重性的用途)，所述ActRII-ALK4拮抗剂包括ActRIIA多肽，包括其片段、功能变体和修饰的形式。如本文所用，术语“ActRIIA”是指来自任何物种的激活素受体IIA型(ActRIIA)蛋白家族以及通过诱变或其他修饰源自这样的ActRIIA蛋白的保留有用活性的变体多肽(包括例如突变体、片段、融合物和肽模拟物形式)。这样的变体ActRIIA多肽的例子提供于整个本公开文本中以及国际专利申请公开号WO2006/012627和WO 2007/062188中，所述申请通过引用以其整体并入本文。本文中提及ActRIIA时应理解为提及当前鉴定的形式中的任一种。ActRIIA家族的成员通常是跨膜蛋白，其由包含富半胱氨酸区的配体结合细胞外结构域、跨膜结构域和具有预测的丝氨酸/苏氨酸激酶活性的胞质结构域构成。优选地，要根据本公开文本的方法使用的ActRIIA多肽是可溶的(例如，ActRIIA的细胞外结构域)。在一些实施方案中，ActRIIA多肽抑制一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)的(例如，Smad信号传导)。在一些实施方案中，ActRIIA多肽与一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)结合。用于确定ActRIIA多肽结合至和/或抑制一种或多种ActRII-ALK4配体的活性的能力的方法和测定的多个例子公开于本文中或者原本是本领域中熟知的，所述方法和测定可以容易地用于确定ActRIIA多肽是否具有所需结合和/或拮抗活性。本文所述的所有

ActRIIA相关多肽的氨基酸的编号均基于下文提供的人ActRIIA前体蛋白序列(SEQ ID NO:366)的编号,除非另外特别指出。

[0278] 典范人ActRIIA前体蛋白序列如下:

[0279]
```
  1  MGAAAKLAFA VFLISCSSGA ILGRSETQEC LFFNANWEKD RTNQTGVEPC
 51  YGDKDKRRHC FATWKNISGS IEIVKQGCWL DDINCYDRTD CVEKKDSPEV
101  YFCCCEGNMC NEKFSYFPEM EVTQPTSNPV TPKPPYYNIL LYSLVPLMLI
151  AGIVICAFWV YRHHKMAYPP VLVPTQDPGP PPPSPLLGLK PLQLLEVKAR
201  GRFGCVWKAQ LLNEYVAVKI FPIQDKQSWQ NEYEVYSLPG MKHENILQFI
251  GAEKRGTSVD VDLWLITAFH EKGSLSDFLK ANVVSWNELC HIAETMARGL
301  AYLHEDIPGL KDGHKPAISH RDIKSKNVLL KNNLTACIAD FGLALKFEAG
351  KSAGDTHGQV GTRRYMAPEV LEGAINFQRD AFLRIDMYAM GLVLWELASR
```

[0280]
```
401  CTAADGPVDE YMLPFEEEIG QHPSLEDMQE VVVHKKKRPV LRDYWQKHAG
451  MAMLCETIEE CWDHDAEARL SAGCVGERIT QMQRLTNIIT TEDIVTVVTM
501  VTNVDFPPKE SSL (SEQ ID NO: 366)
```

[0281] 信号肽由单下划线指示;细胞外结构域以粗体字指示;并且潜在的内源N-连接的糖基化位点由双下划线指示。

[0282] 加工的(成熟的)细胞外人ActRIIA多肽序列如下:

[0283] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPP(SEQ ID NO:367)

[0284] 细胞外结构域的C末端“尾部”由单下划线指示。缺失“尾部”的序列(Δ15序列)如下:

[0285] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEM(SEQ ID NO:368)

[0286] 编码人ActRIIA前体蛋白的核酸序列显示于下文中(SEQ ID NO:369),如下GenBank参考序列NM_001616.4的核苷酸159-1700。信号序列加下划线。

```
   1  ATGGGAGCTG CTGCAAAGTT GGCGTTTGCC GTCTTTCTTA TCTCCTGTTC
  51  TTCAGGTGCT ATACTTGGTA GATCAGAAAC TCAGGAGTGT CTTTTCTTTA
 101  ATGCTAATTG GGAAAAAGAC AGAACCAATC AAACTGGTGT TGAACCGTGT
 151  TATGGTGACA AAGATAAACG GCGGCATTGT TTTGCTACCT GGAAGAATAT
 201  TTCTGGTTCC ATTGAAATAG TGAAACAAGG TTGTTGGCTG GATGATATCA
 251  ACTGCTATGA CAGGACTGAT TGTGTAGAAA AAAAAGACAG CCCTGAAGTA
 301  TATTTTTGTT GCTGTGAGGG CAATATGTGT AATGAAAAGT TTTCTTATTT
 351  TCCGGAGATG GAAGTCACAC AGCCCACTTC AAATCCAGTT ACACCTAAGC
 401  CACCCTATTA CAACATCCTG CTCTATTCCT TGGTGCCACT TATGTTAATT
 451  GCGGGGATTG TCATTTGTGC ATTTTGGGTG TACAGGCATC ACAAGATGGC
 501  CTACCCTCCT GTACTTGTTC CAACTCAAGA CCCAGGACCA CCCCCACCTT
 551  CTCCATTACT AGGTTTGAAA CCACTGCAGT TATTAGAAGT GAAAGCAAGG
 601  GGAAGATTTG GTTGTGTCTG GAAAGCCCAG TTGCTTAACG AATATGTGGC
 651  TGTCAAAATA TTTCCAATAC AGGACAAACA GTCATGGCAA AATGAATACG
 701  AAGTCTACAG TTTGCCTGGA ATGAAGCATG AGAACATATT ACAGTTCATT
 751  GGTGCAGAAA AACGAGGCAC CAGTGTTGAT GTGGATCTTT GGCTGATCAC
 801  AGCATTTCAT GAAAAGGGTT CACTATCAGA CTTTCTTAAG GCTAATGTGG
 851  TCTCTTGGAA TGAACTGTGT CATATTGCAG AAACCATGGC TAGAGGATTG
 901  GCATATTTAC ATGAGGATAT ACCTGGCCTA AAAGATGGCC ACAAACCTGC
 951  CATATCTCAC AGGGACATCA AAAGTAAAAA TGTGCTGTTG AAAAACAACC
1001  TGACAGCTTG CATTGCTGAC TTTGGGTTGG CCTTAAAATT TGAGGCTGGC
1051  AAGTCTGCAG GCGATACCCA TGGACAGGTT GGTACCCGGA GGTACATGGC
1101  TCCAGAGGTA TTAGAGGGTG CTATAAACTT CCAAAGGGAT GCATTTTTGA
1151  GGATAGATAT GTATGCCATG GGATTAGTCC TATGGGAACT GGCTTCTCGC
1201  TGTACTGCTG CAGATGGACC TGTAGATGAA TACATGTTGC CATTTGAGGA
1251  GGAAATTGGC CAGCATCCAT CTCTTGAAGA CATGCAGGAA GTTGTTGTGC
1301  ATAAAAAAAA GAGGCCTGTT TTAAGAGATT ATTGGCAGAA ACATGCTGGA
1351  ATGGCAATGC TCTGTGAAAC CATTGAAGAA TGTTGGGATC ACGACGCAGA
1401  AGCCAGGTTA TCAGCTGGAT GTGTAGGTGA AAGAATTACC CAGATGCAGA
1451  GACTAACAAA TATTATTACC ACAGAGGACA TTGTAACAGT GGTCACAATG
1501  GTGACAAATG TTGACTTTCC TCCCAAAGAA TCTAGTCTA (SEQ ID NO: 369)
```

[0287]

[0288] 编码加工的可溶(细胞外)人ActRIIA多肽的核酸序列如下：

```
   1  ATACTTGGTA GATCAGAAAC TCAGGAGTGT CTTTTCTTTA ATGCTAATTG
  51  GGAAAAAGAC AGAACCAATC AAACTGGTGT TGAACCGTGT TATGGTGACA
 101  AAGATAAACG GCGGCATTGT TTTGCTACCT GGAAGAATAT TTCTGGTTCC
 151  ATTGAAATAG TGAAACAAGG TTGTTGGCTG GATGATATCA ACTGCTATGA
 201  CAGGACTGAT TGTGTAGAAA AAAAAGACAG CCCTGAAGTA TATTTTTGTT
 251  GCTGTGAGGG CAATATGTGT AATGAAAAGT TTTCTTATTT TCCGGAGATG
 301  GAAGTCACAC AGCCCACTTC AAATCCAGTT ACACCTAAGC CACCC
(SEQ ID NO:370)
```

[0289]

[0290]

[0291] ActRIIA在脊椎动物之间非常保守，其中大段的细胞外结构域完全保守。例如，图10描绘人ActRIIA细胞外结构域(SEQ ID NO:367)与各种ActRIIA直系同源物(SEQ ID NO:371-377)相比的多序列比对。许多与ActRIIA结合的配体也是高度保守的。因此，根据这些比对，可以预测配体结合结构域内对于正常的ActRIIA-配体结合活性重要的关键氨基酸位置，并且可以预测可能在不显著改变正常的ActRIIA-配体结合活性的情况下耐受取代的氨基酸位置。因此，根据本发明公开的方法有用的活性人ActRIIA变体多肽可以包括在来自另一种脊椎动物ActRIIA的序列的相应位置处的一个或多个氨基酸，或者可以包括与人或其他脊椎动物序列中的残基类似的残基。

[0292] 不意在是限制性的，以下例子说明了定义活性ActRIIA变体的这种方法。如图10中

所示，人细胞外结构域中的F13是绵羊(Ovis aries)(SEQ ID NO:371)、原鸡(Gallus gallus)(SEQ ID NO:374)、欧洲牛(Bos Taurus)(SEQ ID NO:375)、仓鸮(Tyto alba)(SEQ ID NO:376)和小鼠耳蝠(Myotis davidii)(SEQ ID NO:377)ActRIIA中的Y，表明在这个位置耐受芳香族残基，包括F、W和Y。人细胞外结构域中的Q24是欧洲牛ActRIIA中的R，表明在这个位置将耐受带电荷残基，包括D、R、K、H和E。人细胞外结构域中的S95是原鸡和仓鸮ActRIIA中的F，表明这个位点可以耐受众多种变化，包括极性残基(如E、D、K、R、H、S、T、P、G、Y)和可能的疏水残基(如L、I或F)。人细胞外结构域中E52是绵羊ActRIIA中的D，表明在这个位置耐受酸性残基，包括D和E。人细胞外结构域中的P29的保守性相对较差，表现为绵羊ActRIIA中的S和小鼠耳蝠ActRIIA中的L，因此在这个位置应耐受基本上任何氨基酸。

[0293] 此外，如上文所讨论，本领域中已经在结构/功能特征反面、特别是关于配体结合对ActRII蛋白进行表征[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;以及美国专利号:7,709,605、7,612,041和7,842,663]。除了本文的传授外，这些参考文献提供了关于如何生成保留一种或多种所需活性(例如，配体结合活性)的ActRII变体的充分指导。

[0294] 例如，称为三指毒素折叠的限定结构基序对于I型和II型受体的配体结合是重要的，并且由位于每个单体受体的细胞外结构域内不同位置的保守半胱氨酸残基形成[Greenwald等人(1999)Nat Struct Biol 6:18-22;以及Hinck(2012)FEBS Lett 586:1860-1870]。因此，如由这些保守半胱氨酸的最外侧划分的人ActRIIA的核心配体结合结构域对应于SEQ ID NO:366(ActRIIA前体)的位置30-110。因此，侧接这些半胱氨酸划分的核心序列的结构上较无序的氨基酸可以在N末端被截短约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、28或29个残基，并且在C末端被截短约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个残基，且不一定改变配体结合。示例性ActRIIA细胞外结构域截短物包括SEQ ID NO:367和368。

[0295] 因此，ActRIIA的活性部分(例如，配体结合部分)的通式是包含SEQ ID NO:366的氨基酸30-110、基本上由其组成或由其组成的多肽。因此，ActRIIA多肽可以例如包含与在对应于SEQ ID NO:366的氨基酸21-30中任一个的残基处开始(例如，在氨基酸21、22、23、24、25、26、27、28、29或30中任一个处开始)并且在对应于SEQ ID NO:366的氨基酸110-135中任一个的位置处结束(例如，在氨基酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134或135中的任一个处结束)的ActRIIA的一部分至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，基本上由其组成或由其组成。其他例子包括如下构建体，所述构建体在选自以下的位置处开始:SEQ ID NO:366的21-30(例如，在氨基酸21、22、23、24、25、26、27、28、29或30中的任一个处开始)、22-30(例如，在氨基酸22、23、24、25、26、27、28、29或30中的任一个处开始)、23-30(例如，在氨基酸23、24、25、26、27、28、29或30中的任一个处开始)、24-30(例如，在氨基酸24、25、26、27、28、29或30中的任一个处开始)，并且在选自以下的位置处结束:SEQ ID NO:366的111-135(例如，在氨基酸111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134或135中的任一个处结束)、112-135(例如，在氨基

酸112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134或135中的任一个处结束)、113-135(例如,在氨基酸113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134或135中的任一个处结束)、120-135(例如,在氨基酸120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134或135中的任一个处结束)、130-135(例如,在氨基酸130、131、132、133、134或135中的任一个处结束)、111-134(例如,在氨基酸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中的任一个处结束)、111-133(例如,在氨基酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132或133中的任一个处结束)、111-132(例如,在氨基酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131或132中的任一个处结束)或111-131(例如,在氨基酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130或131中的任一个处结束)。还考虑这些范围内的变体,特别是包含具有与SEQ ID NO:366的相应部分至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列、基本上由其组成或由所述其组成的那些。因此,在一些实施方案中,ActRIIA多肽可以包含与SEQ ID NO:366的氨基酸30-110至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的多肽,基本上由其组成或由其组成。任选地,ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:366的氨基酸30-110至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的多肽,并且包含配体结合袋中的不超过1、2、5、10或15个保守氨基酸变化。在一些实施方案中,本公开文本的ActRIIA多肽包含与在对应于SEQ ID NO:366的氨基酸21-30的残基处开始(例如,在氨基酸21、22、23、24、25、26、27、28、29或30中的任一个处开始)并且在对应于SEQ ID NO:366的氨基酸110-135中任一个的位置处结束(例如,在氨基酸110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134或135中的任一个处结束)的ActRIIA的一部分至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成。在一些实施方案中,ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:366的氨基酸30-110至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,由其组成或基本上由其组成。在某些实施方案中,ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:366的氨基酸21-135至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,由其组成或基本上由其组成。在一些实施方案中,ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:366的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,由其组成或基本上由其组成。在一些实施方案中,ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:367的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,由其组成或基本上由其组成。在一些实施方案中,ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:368的氨基酸序列至少

70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。在一些实施方案中，ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:380的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。在一些实施方案中，ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:381的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。在一些实施方案中，ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:384的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。在一些实施方案中，ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:364的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。在一些实施方案中，ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:378的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。

[0296] D)ALK4多肽

[0297] 在某些方面，本公开文本涉及ActRII-ALK4拮抗剂以及其用途(例如，治疗、预防心力衰竭(HF)或HF的一种或多种并发症或降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的进展率和/或严重性的用途)，所述ActRII-ALK4拮抗剂包括ALK4多肽，包括其片段、功能变体和修饰的形式。如本文所用，术语“ALK4”是指来自任何物种的激活素受体样激酶-4(ALK4)蛋白家族以及通过诱变或其他修饰源自这样的ALK4蛋白的保留有用活性的变体多肽(包括例如突变体、片段、融合物和肽模拟物形式)。这样的变体ALK4多肽的例子提供于整个本公开文本中以及国际专利申请公开号WO/2016/164089、WO/2016/164497和WO/2018/067879，所述申请通过引用以其整体并入本文。本文中提及ALK4时应理解为提及当前鉴定的形式中的任一种。ALK4家族的成员通常是跨膜蛋白，由具有富半胱氨酸区域的配体结合细胞外结构域、跨膜结构域和具有预测的丝氨酸/苏氨酸激酶活性的胞质结构域构成。优选地，要根据本公开文本的方法使用的ALK4多肽是可溶的。如本文所用的术语“可溶ALK4多肽”包括ALK4多肽的任何天然存在的细胞外结构域以及其保留有用活性的任何变体(包括突变体、片段和肽模拟物形式)。例如，ALK4多肽的细胞外结构域与配体结合并且通常是可溶的。可溶ALK4多肽的例子包括下文显示的ALK4细胞外结构域(SEQ ID NO:86)。除了ALK4多肽的细胞外结构域外，可溶ALK4多肽的其他例子包含信号序列。所述信号序列可以是ALK4的天然信号序列，或来自另一多肽的信号序列，如组织纤溶酶原激活物(TPA)信号序列或蜜蜂褪黑素信号序列。在一些实施方案中，ALK4多肽抑制一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)的(例如，Smad信号传导)。在一些实施方案中，ALK4多肽与一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)结合。用于确定ALK4多肽结合至和/或抑制一种或多种ActRII-ALK4配体的活性的能力的方法和测定的多个例子公开于本文中或者原本是本领域中熟知的，所述方法和测定可以容易地用于确定ActRIIB多肽是否具有所需结合和/或拮抗活性。本文所述的所有ALK4相关多肽的氨基酸编号是基于下文提供的人ALK4前体蛋白序列(SEQ ID NO:84)的编

号,除非另外特别指出。

[0298] 人ALK4前体多肽序列(NCBI Ref Seq NP_004293)如下:

1 MAESAGASSF FPLVVLLLAG SGG**SGPRGVQ ALLCACTSCL QANYTCETDG ACMVSIFNLD**

61 **GMEHHVRTCI PKVELVPAGK PFYCLSSEDL RNTHCCYTDY CNRIDLRVPS GHLKEPEHPS**

121 **MWGPVE**LVGI IAGPVFLLFL IIIIVFLVIN YHQRVYHNRQ RLDMEDPSCE MCLSKDKTLQ

181 DLVYDLSTSG SGSGLPLFVQ RTVARTIVLQ EIIGKGRFGE VWRGRWRGGD VAVKIFSSRE

[0299] 241 ERSWFREAEI 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: 84)

[0300] 信号肽由单下划线指示,并且细胞外结构域以粗体字指示。

[0301] 加工的细胞外人ALK4多肽序列如下:

[0302] SGPRGVQALLCACTSCLQANYTCETDGACMVSIFNLDGMEHHVRTCIPKVELVPAGKPFYCLSSEDLR NTHCCYTDYCNRIDLRVPSGHLKEPEHPSMWGPVE(SEQ ID NO:86)

[0303] 编码ALK4前体多肽的核酸序列显示于SEQ ID NO:221中,对应于GenBank参考序列NM_004302.4的核苷酸78-1592。

[0304] 信号序列加下划线,并且细胞外结构域以粗体字指示。

ATGGCGGAGTCGGCCGGAGCCTCCTCCTTCTTCCCCCTTGTTGTCCTCCTGCTCGCC
GGCAGCGGCGGG**TCCGGGCCCCGGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGCA**
CCAGCTGCCTCCAGGCCAACTACACGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATGGT
TTCCATTTTCAATCTGGATGGGATGGAGCACCATGTGCGCACCTGCATCCCCA
AAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGGGAAGCCCTTCTACTGCCTGAGCTCGGAGGA
CCTGCGCAACACCCACTGCTGCTACACTGACTACTGCAACAGGATCGACTTG
AGGGTGCCCAGTGGTCACCTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTCCATGTGGGGCC
CGGTGGAGCTGGTAGGCATCATCGCCGGCCCGGTGTTCCTCCTGTTCCTCATCATC
ATCATTGTTTTCCTTGTCATTAACTATCATCAGCGTGTCTATCACAACCGCCAGAGA
CTGGACATGGAAGATCCCTCATGTGAGATGTGTCTCTCCAAAGACAAGACGCTCC
AGGATCTTGTCTACGATCTCTCCACCTCAGGGTCTGGCTCAGGGTTACCCCTCTTTG

[0305] TCCAGCGCACAGTGGCCCGAACCATCGTTTTACAAGAGATTATTGGCAAGGGTCG
GTTTGGGGAAGTATGGCGGGGCCGCTGGAGGGGTGGTGATGTGGCTGTGAAAATA
TTCTCTTCTCGTGAAGAACGGTCTTGGTTCAGGGAAGCAGAGATATACCAGACGGT
CATGCTGCGCCATGAAAACATCCTTGGATTTATTGCTGCTGACAATAAAGATAATG
GCACCTGGACACAGCTGTGGCTTGTTTCTGACTATCATGAGCACGGGTCCCTGTTT
GATTATCTGAACCGGTACACAGTGACAATTGAGGGGATGATTAAGCTGGCCTTGTC
TGCTGCTAGTGGGCTGGCACACCTGCACATGGAGATCGTGGGCACCCAAGGGAAG
CCTGGAATTGCTCATCGAGACTTAAAGTCAAAGAACATTCTGGTGAAGAAAAATG
GCATGTGTGCCATAGCAGACCTGGGCCTGGCTGTCCGTCATGATGCAGTCACTGAC
ACCATTGACATTGCCCCGAATCAGAGGGTGGGGACCAAACGATACATGGCCCCTG
AAGTACTTGATGAAACCATTAATATGAAACACTTTGACTCCTTTAAATGTGCTGAT
ATTTATGCCCTCGGGCTTGTATATTGGGAGATTGCTCGAAGATGCAATTCTGGAGG

[0306] AGTCCATGAAGAATATCAGCTGCCATATTACGACTTAGTGCCCTCTGACCCTTCCA TTGAGGAAATGCGAAAGGTTGTATGTGATCAGAAGCTGCGTCCCAACATCCCCAA CTGGTGGCAGAGTTATGAGGCACTGCGGGTGATGGGGAAGATGATGCGAGAGTGT TGGTATGCCAACGGCGCAGCCCGCCTGACGGCCCTGCGCATCAAGAAGACCCTCT CCCAGCTCAGCGTGCAGGAAGACGTGAAGATC (SEQ ID NO: 221)

[0307] 编码细胞外ALK4多肽的核酸序列显示于SEQ ID NO:222中。

[0308] TCCGGGCCCCGGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGCACCAGCTGCCTCCAGGC

[0309] CAACTACACGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATGGTTTCCATTTTCAATCTGGATG

[0310] GGATGGAGCACCATGTGCGCACCTGCATCCCCAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGG

[0311] GAAGCCCTTCTACTGCCTGAGCTCGGAGGACCTGCGCAACACCCACTGCTGCTACA

[0312] CTGACTACTGCAACAGGATCGACTTGAGGGTGCCCAGTGGTCACCTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTCC ATGTGGGGCCCGGTGGAG(SEQ ID NO:222)

[0313] 人ALK4前体蛋白序列的替代亚型即亚型B(NCBI Ref Seq NP_064732.3)如下：

```
  1 MVSIFNLDGM EHHVRTCIPK VELVPAGKPF YCLSSEDLRN THCCYTDYCN RIDLRVPSGH
 61 LKEPEHPSMW GPVELVGIIA GPVFLLFLII IIVFLVINYH QRVYHNRQRL DMEDPSCEMC
121 LSKDKTLQDL VYDLSTSGSG SGLPLFVQRT VARTIVLQEI IGKGRFGEVW RGRWRGGDVA
181 VKIFSSREER SWFREAEIYQ TVMLRHENIL GFIAADNKDN GTWTQLWLVS DYHEHGSLFD
241 YLNRYTVTIE GMIKLALSAA SGLAHLHMEI VGTQGKPGIA HRDLKSKNIL VKKNGMCAIA
301 DLGLAVRHDA VTDTIDIAPN QRVGTKRYMA PEVLDETINM KHFDSFKCAD IYALGLVYWE
361 IARRCNSGGV HEEYQLPYYD LVPSDPSIEE MRKVVCDQKL RPNIPNWWQS YEALRVMGKM
421 MRECWYANGA ARLTALRIKK TLSQLSVQED VKI (SEQ ID NO: 421)
```

[0314] 细胞外结构域以粗体字指示。

[0315] 加工的细胞外ALK4多肽序列如下：

[0316] 1MVSIFNLDGM EHHVRTCIPK VELVPAGKPF YCLSSEDLRN THCCYTDYCN RIDLRVPSGH

[0317] 61LKEPEHPSMW GPVE(SEQ ID NO:422)

[0318] 编码ALK4前体蛋白(亚型B)的核酸序列显示于下文中(SEQ ID NO:423)，对应于GenBank参考序列NM_020327.3的核苷酸186-1547。编码细胞外结构域的核苷酸以粗体字指示。

1 **ATGGTTTCCA TTTTCAATCT GGATGGGATG GAGCACCATG TGCGCACCTG**
51 **CATCCCCAAA GTGGAGCTGG TCCCTGCCGG GAAGCCCTTC TACTGCCTGA**
101 **GCTCGGAGGA CCTGCGCAAC ACCCACTGCT GCTACACTGA CTACTGCAAC**
151 **AGGATCGACT TGAGGGTGCC CAGTGGTCAC CTCAAGGAGC CTGAGCACCC**
201 **GTCCATGTGG GGCCCGGTGG AG**CTGGTAGG CATCATCGCC GGCCCGGTGT
251 TCCTCCTGTT CCTCATCATC ATCATTGTTT TCCTTGTCAT TAACTATCAT
301 CAGCGTGTCT ATCACAACCG CCAGAGACTG GACATGGAAG ATCCCTCATG
351 TGAGATGTGT CTCTCCAAAG ACAAGACGCT CCAGGATCTT GTCTACGATC
401 TCTCCACCTC AGGGTCTGGC TCAGGGTTAC CCCTCTTTGT CCAGCGCACA
451 GTGGCCCGAA CCATCGTTTT ACAAGAGATT ATTGGCAAGG GTCGGTTTGG
501 GGAAGTATGG CGGGGCCGCT GGAGGGGTGG TGATGTGGCT GTGAAAATAT

[0319] 551 TCTCTTCTCG TGAAGAACGG TCTTGGTTCA GGGAAGCAGA GATATACCAG
601 ACGGTCATGC TGCGCCATGA AAACATCCTT GGATTTATTG CTGCTGACAA
651 TAAAGATAAT GGCACCTGGA CACAGCTGTG GCTTGTTTCT GACTATCATG
701 AGCACGGGTC CCTGTTTGAT TATCTGAACC GGTACACAGT GACAATTGAG
751 GGGATGATTA AGCTGGCCTT GTCTGCTGCT AGTGGGCTGG CACACCTGCA
801 CATGGAGATC GTGGGCACCC AAGGGAAGCC TGGAATTGCT CATCGAGACT
851 TAAAGTCAAA GAACATTCTG GTGAAGAAAA ATGGCATGTG TGCCATAGCA
901 GACCTGGGCC TGGCTGTCCG TCATGATGCA GTCACTGACA CCATTGACAT
951 TGCCCCGAAT CAGAGGGTGG GGACCAAACG ATACATGGCC CCTGAAGTAC
1001 TTGATGAAAC CATTAATATG AAACACTTTG ACTCCTTTAA ATGTGCTGAT
1051 ATTTATGCCC TCGGGCTTGT ATATTGGGAG ATTGCTCGAA GATGCAATTC
1101 TGGAGGAGTC CATGAAGAAT ATCAGCTGCC ATATTACGAC TTAGTGCCCT
1151 CTGACCCTTC CATTGAGGAA ATGCGAAAGG TTGTATGTGA TCAGAAGCTG
1201 CGTCCCAACA TCCCCAACTG GTGGCAGAGT TATGAGGCAC TGCGGGTGAT

[0320] 1251 GGGGAAGATG ATGCGAGAGT GTTGGTATGC CAACGGCGCA GCCCGCCTGA
1301 CGGCCCTGCG CATCAAGAAG ACCCTCTCCC AGCTCAGCGT GCAGGAAGAC
1351 GTGAAGATCT AA (SEQ ID NO: 423)

[0321] 编码细胞外ALK4多肽(亚型B)的核酸序列如下：

1 **ATGGTTTCCA TTTTCAATCT GGATGGGATG GAGCACCATG TGCGCACCTG**
51 **CATCCCCAAA GTGGAGCTGG TCCCTGCCGG GAAGCCCTTC TACTGCCTGA**

[0322] 101 **GCTCGGAGGA CCTGCGCAAC ACCCACTGCT GCTACACTGA CTACTGCAAC**
151 **AGGATCGACT TGAGGGTGCC CAGTGGTCAC CTCAAGGAGC CTGAGCACCC**
201 **GTCCATGTGG GGCCCGGTGG AG**CTGGTAGG (SEQ ID NO: 424)

[0323] 人ALK4前体多肽序列的替代亚型即亚型C(NCBI Ref Seq NP_064733.3)如下：

1 MAESAGASSF FPLVVLLLAG SGG**SGPRGVQ ALLCACTSCL QANYTCETDG ACMVSIFNLD**
61 **GMEHHVRTCI PKVELVPAGK PFYCLSSEDL RNTHCCYTDY CNRIDLRVPS GHLKEPEHPS**
121 **MWGPVE**LVGI IAGPVFLLFL IIIIVFLVIN YHQRVYHNRQ RLDMEDPSCE MCLSKDKTLQ
181 DLVYDLSTSG SGSGLPLFVQ RTVARTIVLQ EIIGKGRFGE VWRGRWRGGD VAVKIFSSRE
241 ERSWFREAEI YQTVMLRHEN ILGFIAADNK ADCSFLTLPW EVVMVSAAPK LRSLRLQYKG
301 GRGRARFLFP LNNGTWTQLW LVSDYHEHGS LFDYLNRYTV TIEGMIKLAL SAASGLAHLH
361 MEIVGTQGKP GIAHRDLKSK NILVKKNGMC AIADLGLAVR HDAVTDTIDI APNQRVGTKR
421 YMAPEVLDET INMKHFDSFK CADIYALGLV YWEIARRCNS GGVHEEYQLP YYDLVPSDPS
481 IEEMRKVVCD QKLRPNIPNW WQSYEALRVM GKMMRECWYA NGAARLTALR IKKTLSQLSV
541 QEDVKI (SEQ ID NO: 85)

[0324] 信号肽由单下划线指示，并且细胞外结构域以粗体字指示。

[0325] 加工的细胞外ALK4多肽序列(亚型C)如下：

[0326] SGPRGVQALLCACTSCLQANYTCETDGACMVSIFNLDGMEHHVRTCIPKVELVPAGK PFYCLSSEDL RNTHCCYTDYCNRIDLRVPSGHLKEPEHPSMWGPVE(SEQ ID NO:87)编码ALK4前体多肽的核酸序列(亚型C)显示于SEQ ID NO:223中，对应于GenBank参考序列NM_020328.3的核苷酸78-1715。编码细胞外ALK4多肽(亚型C)的核酸序列显示于SEQ ID NO:224中。

[0327] ATGGCGGAGTCGGCCGGAGCCTCCTCCTTCTTCCCCCTTGTTGTCCTCCTGCTCGCC GGCAGCGGCGGG**TCCGGGCCCCGGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGCA CCAGCTGCCTCCAGGCCAACTACACGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATGGT TTCCATTTTCAATCTGGATGGGATGGAGCACCATGTGCGCACCTGCATCCCCA AAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGGGAAGCCCTTCTACTGCCTGAGCTCGGAGGA CCTGCGCAACACCCACTGCTGCTACACTGACTACTGCAACAGGATCGACTTG AGGGTGCCCAGTGGTCACCTCAAGGAGCCTGAGCACCCGTCCATGTGGGGCC CGGTGGAG**CTGGTAGGCATCATCGCCGGCCCGGTGTTCCTCCTGTTCCTCATCATC ATCATTGTTTTCCTTGTCATTAACTATCATCAGCGTGTCTATCACAACCGCCAGAGA CTGGACATGGAAGATCCCTCATGTGAGATGTGTCTCTCCAAAGACAAGACGCTCC AGGATCTTGTCTACGATCTCTCCACCTCAGGGTCTGGCTCAGGGTTACCCCTCTTTG TCCAGCGCACAGTGGCCCGAACCATCGTTTTACAAGAGATTATTGGCAAGGGTCG

[0328] GTTTGGGGAAGTATGGCGGGGCCGCTGGAGGGGTGGTGATGTGGCTGTGAAAATA
TTCTCTTCTCGTGAAGAACGGTCTTGGTTCAGGGAAGCAGAGATATACCAGACGGT
CATGCTGCGCCATGAAAACATCCTTGGATTTATTGCTGCTGACAATAAAGCAGACT
GCTCATTCCTCACATTGCCATGGGAAGTTGTAATGGTCTCTGCTGCCCCCAAGCTG
AGGAGCCTTAGACTCCAATACAAGGGAGGAAGGGGAAGAGCAAGATTTTTATTCC
CACTGAATAATGGCACCTGGACACAGCTGTGGCTTGTTTCTGACTATCATGAGCAC
GGGTCCCTGTTTGATTATCTGAACCGGTACACAGTGACAATTGAGGGGATGATTAA
GCTGGCCTTGTCTGCTGCTAGTGGGCTGGCACACCTGCACATGGAGATCGTGGGCA
CCCAAGGGAAGCCTGGAATTGCTCATCGAGACTTAAAGTCAAAGAACATTCTGGT
GAAGAAAAATGGCATGTGTGCCATAGCAGACCTGGGCCTGGCTGTCCGTCATGAT
GCAGTCACTGACACCATTGACATTGCCCCGAATCAGAGGGTGGGGACCAAACGAT
ACATGGCCCCTGAAGTACTTGATGAAACCATTAATATGAAACACTTTGACTCCTTT
AAATGTGCTGATATTTATGCCCTCGGGCTTGTATATTGGGAGATTGCTCGAAGATG
CAATTCTGGAGGAGTCCATGAAGAATATCAGCTGCCATATTACGACTTAGTGCCCT
CTGACCCTTCCATTGAGGAAATGCGAAAGGTTGTATGTGATCAGAAGCTGCGTCCC
AACATCCCCAACTGGTGGCAGAGTTATGAGGCACTGCGGGTGATGGGGAAGATGA
TGCGAGAGTGTTGGTATGCCAACGGCGCAGCCCGCCTGACGGCCCTGCGCATCAA
GAAGACCCTCTCCCAGCTCAGCGTGCAGGAAGACGTGAAGATC (SEQ ID NO: 223)
TCCGGGCCCCGGGGGGTCCAGGCTCTGCTGTGTGCGTGCACCAGCTGCCTCCAGGC
CAACTACACGTGTGAGACAGATGGGGCCTGCATGGTTTCCATTTTCAATCTGGATG
GGATGGAGCACCATGTGCGCACCTGCATCCCCAAAGTGGAGCTGGTCCCTGCCGG
GAAGCCCTTCTACTGCCTGAGCTCGGAGGACCTGCGCAACACCCACTGCTGCTACA
CTGACTACTGCAACAGGATCGACTTGAGGGTGCCCAGTGGTCACCTCAAGGAGCC
TGAGCACCCGTCCATGTGGGGCCCGGTGGAG (SEQ ID NO: 224)

[0329] ALK4在脊椎动物之间非常保守,其中大段的细胞外结构域完全保守。例如,图9描绘与多种ALK4直系同源物相比的人ALK4细胞外结构域的多序列比对。许多与ALK4结合的配体也是高度保守的。因此,根据这些比对,可以预测配体结合结构域内对于正常的ALK4-配体结合活性重要的关键氨基酸位置,并且可以预测可能在不显著改变正常的ALK4-配体结合活性的情况下耐受取代的氨基酸位置。因此,根据本发明公开的方法有用的活性人ALK4变体多肽可以包括在来自另一种脊椎动物ALK4的序列的相应位置处的一个或多个氨基酸,或者可以包括与人或其他脊椎动物序列中的残基类似的残基。

[0330] 不意在是限制性的,以下例子说明了定义活性ALK4变体的这种方法。如图9中所示,人ALK4细胞外结构域(SEQ ID NO:414)中的V6是小家鼠(Mus muculus)ALK4(SEQ ID NO:418)中的异亮氨酸,并且因此所述位置可以改变,并且任选地可以改变为另一种疏水性残基(如L、I或F)或非极性残基(如A),如在原鸡ALK4(SEQ ID NO:417)中所观察到的。人细胞外结构域中的E40是原鸡ALK4中的K,指示这个位点可能能耐受众多种变化,包括极性残基(如E、D、K、R、H、S、T、P、G、Y)和可能非极性残基(如A)。人细胞外结构域中的S15是原鸡ALK4中的D,只是在这个位置耐受宽结构变化,且偏好极性残基,如S、T、R、E、K、H、G、P、G和Y。人细胞外结构域中的E40是原鸡ALK4中的K,指示在这个位置将耐受带电荷残基,包括D、R、K、H以及Q和N。人细胞外结构域中的R80是星鼻鼹(Condylura cristata)ALK4(SEQ ID NO:415)中的K,指示在这个位置耐受碱性残基,包括R、K和H。人细胞外结构域中的Y77是野猪(Sus scrofa)ALK4(SEQ ID NO:419)中的F,指示在这个位置耐受芳香族残基,包括F、W和Y。人细胞外结构域中的P93的保守性相对较差,表现为西欧刺猬(Erinaceus europaeus)ALK4(SEQ ID NO:416)中的S和原鸡ALK4中的N,因此在这个位置应耐受基本上任何氨基酸。

[0331] 此外,本领域中已经在结构和功能特征方面、特别是关于配体结合对ALK4蛋白进行表征[例如,Harrison等人(2003)J Biol Chem 278(23):21129-21135;Romano等人

(2012)JMol Model 18(8):3617-3625;以及Calvanese等人(2009)15(3):175-183]。除了本文的传授外,这些参考文献提供了关于如何生成保留一种或多种正常活性(例如,配体结合活性)的ALK4变体的充分指导。

[0332] 例如,称为三指毒素折叠的限定结构基序对于I型和II型受体的配体结合是重要的,并且由位于每个单体受体的细胞外结构域内不同位置的保守半胱氨酸残基形成[Greenwald等人(1999)Nat Struct Biol 6:18-22;以及Hinck(2012)FEBS Lett 586:1860-1870]。因此,如由这些保守半胱氨酸的最外侧划分的人ALK4的核心配体结合结构域对应于SEQ ID NO:84(ALK4前体)的位置34-101。侧接这些半胱氨酸划分的核心序列的结构上较无序的氨基酸可以在N末端被截短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、26、27、28、29、30、31、32、33个残基,和/或在C末端被截短1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个残基,且不一定改变配体结合。用于N末端和/或C末端截短的示例性ALK4细胞外结构域包括SEQ ID NO:86、87和422。

[0333] 在某些实施方案中,本公开文本涉及包含至少一种ALK4多肽的异多聚体,所述至少一种ALK4多肽包括其片段、功能变体和修饰形式。优选地,用于如本文所公开使用的ALK4多肽(例如,包含ALK4多肽的异多聚体及其用途)是可溶的(例如,ALK4的细胞外结构域)。在其他优选实施方案中,用于如本文所公开使用的ALK4多肽结合至和/或抑制(拮抗)一种或多种TGF-β超家族配体的活性(例如,诱导Smad信号传导)。在一些实施方案中,本公开文本的异多聚体包含至少一种ALK4多肽,所述至少一种ALK4多肽与SEQ ID NO:84、85、86、87、88、89、92、93、421和422的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施方案中,本公开文本的异多聚体由至少一种ALK4多肽组成或基本上由其组成,所述至少一种ALK4多肽与SEQ ID NO:84、85、86、87、88、89、92、93、422的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0334] 在某些方面,本公开文本涉及一种包含ALK4-Fc融合多肽的异多聚体。在一些实施方案中,所述ALK4-Fc融合多肽包含ALK4结构域,所述ALK4结构域包含与在SEQ ID NO:84、85或421的氨基酸23-34中的任一个(例如,氨基酸残基23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34)处开始并且在SEQ ID NO:84、85或421的氨基酸101-126中的任一个(例如,氨基酸残基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)处结束的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述ALK4-Fc融合多肽包含ALK4结构域,所述ALK4结构域包含与SEQ ID NO:84、85或421的氨基酸34-101至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述ALK4-Fc融合多肽包含ALK4结构域,所述ALK4结构域包含与SEQ ID No:84、85或421的氨基酸23-126至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述ALK4-Fc融合多肽包含ALK4结构域,所述ALK4结构域包含与SEQ ID No:84、85、86、87、88、89、92、93、247、249、421、422中任一个的氨基酸序列至少

70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

[0335] E)ALK7多肽

[0336] 在某些方面，本公开文本涉及ActRII-ALK4拮抗剂以及其用途(例如，治疗、预防心力衰竭(HF)或HF的一种或多种并发症或降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的进展率和/或严重性的用途)，所述ActRII-ALK4拮抗剂包括ALK7多肽，包括其片段、功能变体和修饰的形式。如本文所用，术语“ALK7”是指来自任何物种的激活素受体样激酶-7(ALK7)蛋白家族以及通过诱变或其他修饰源自这样的ALK7蛋白的保留有用活性的变体多肽(包括例如突变体、片段、融合物和肽模拟物形式)。这样的变体ALK7多肽的例子提供于整个本公开文本中以及国际专利申请公开号WO/2016/164089和WO/2016/164503中，所述申请通过引用以其整体并入本文。本文中提及ALK7时应理解为提及当前鉴定的形式中的任一种。ALK7家族的成员通常都是跨膜多肽，由具有富半胱氨酸区域的配体结合细胞外结构域、跨膜结构域和具有预测的丝氨酸/苏氨酸激酶特异性的胞质结构域构成。人ALK7前体多肽的氨基酸序列显示于下文(SEQ ID NO:120)中。优选地，要根据本公开文本的方法施用的ALK7多肽是可溶的。如本文所用的术语“可溶ALK7多肽”包括ALK7多肽的任何天然存在的细胞外结构域以及其保留有用活性的任何变体(包括突变体、片段和肽模拟物形式)。例如，ALK7多肽的细胞外结构域与配体结合并且通常是可溶的。可溶ALK7多肽的例子包括下文的ALK7细胞外结构域(SEQ ID NO:123)。除了ALK7多肽的细胞外结构域外，可溶ALK7多肽的其他例子包含信号序列。所述信号序列可以是ALK7的天然信号序列，或来自另一多肽的信号序列，如组织纤溶酶原激活物(TPA)信号序列或蜜蜂褪黑素信号序列。在一些实施方案中，ALK7多肽抑制一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)的(例如，Smad信号传导)。在一些实施方案中，ALK7多肽与一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)结合。用于确定ALK7多肽结合至和/或抑制一种或多种ActRII-ALK4配体的活性的能力的方法和测定的多个例子公开于本文中或者原本是本领域中熟知的，所述方法和测定可以容易地用于确定ALK7多肽是否具有所需结合和/或拮抗活性。本文所述的所有ALK7相关多肽的氨基酸编号是基于下文提供的人ALK7前体蛋白序列(SEQ ID NO:120)的编号，除非另外特别指出。

[0337] 已经描述人ALK7的四种天然存在的亚型。人ALK7亚型1前体多肽的序列(NCBI Ref Seq NP_660302.2)如下：

[0338] 1 MTRALCSALR QALLLLAAAA **ELSPGLKCVC LLCDSSNFTC QTEGACWASV MLTNGKEQVI**
61 **KSCVSLPELN AQVFCHSSNN VTKTECCFTD FCNNITLHLP TASPNAPKLG PME**LAIIITV
121 PVCLLSIAAM LTVWACQGRQ CSYRKKKRPN VEEPLSECNL VNAGKTLKDL IYDVTASGSG
181 SGLPLLVQRT IARTIVLQEI VGKGRFGEVW HGRWCGEDVA VKIFSSRDER SWFREAEIYQ
241 TVMLRHENIL GFIAADNKDN GTWTQLWLVS EYHEQGSLYD YLNRNIVTVA GMIKLALSIA
301 SGLAHLHMEI VGTQGKPAIA HRDIKSKNIL VKKCETCAIA DLGLAVKHDS ILNTIDIPQN
361 PKVGTKRYMA PEMLDDTMNV NIFESFKRAD IYSVGLVYWE IARRCSVGGI VEEYQLPYYD
421 MVPSDPSIEE MRKVVCDQKF RPSIPNQWQS CEALRVMGRI MRECWYANGA ARLTALRIKK
481 TISQLCVKED CKA (SEQ ID NO: 120)

[0339] 信号肽由单下划线指示，并且细胞外结构域以粗体字指示。

[0340] 加工的细胞外ALK7亚型1多肽序列如下：

[0341] ELSPGLKCVCLLCDSSNFTCQTEGACWASVMLTNGKEQVIKSCVSLPELNAQVFCHSS NNVTKTECC FTDFCNNITLHLPTASPNAPKLGPME(SEQ ID NO:123)

[0342] 编码人ALK7亚型1前体多肽的核酸序列显示于下文SEQ ID NO:233中，对应于GenBank参考序列NM_145259.2的核苷酸244-1722。编码加工的细胞外ALK7多肽(亚型1)的核酸序列显示于SEQ ID NO:234中。

[0343] ATGACCCGGGCGCTCTGCTCAGCGCTCCGCCAGGCTCTCCTGCTGCTCGCAGCGGC CGCC**GAGCTCTCGCCAGGACTGAAGTGTGTATGTCTTTTGTGTGATTCTTCAA ACTTTACCTGCCAAACAGAAGGAGCATGTTGGGCATCAGTCATGCTAACCAAT GGAAAAGAGCAGGTGATCAAATCCTGTGTCTCCCTTCCAGAACTGAATGCTC AAGTCTTCTGTCATAGTTCCAACAATGTTACCAAAACCGAATGCTGCTTCACA GATTTTTGCAACAACATAACACTGCACCTTCCAACAGCATCACCAAATGCCCC AAAACTTGGACCCATGGAG**CTGGCCATCATTATTACTGTGCCTGTTTGCCTCCTG TCCATAGCTGCGATGCTGACAGTATGGGCATGCCAGGGTCGACAGTGCTCCTACA GGAAGAAAAAGAGACCAAATGTGGAGGAACCACTCTCTGAGTGCAATCTGGTAAA TGCTGGAAAAACTCTGAAAGATCTGATTTATGATGTGACCGCCTCTGGATCTGGCT CTGGTCTACCTCTGTTGGTTCAAAGGACAATTGCAAGGACGATTGTGCTTCAGGAA ATAGTAGGAAAAGGTAGATTTGGTGAGGTGTGGCATGGAAGATGGTGTGGGGAAG ATGTGGCTGTGAAAATATTCTCCTCCAGAGATGAAAGATCTTGGTTTCGTGAGGCA GAAATTTACCAGACGGTCATGCTGCGACATGAAAACATCCTTGGTTTCATTGCTGC TGACAACAAAGATAATGGAACTTGGACTCAACTTTGGCTGGTATCTGAATATCATG AACAGGGCTCCTTATATGACTATTTGAATAGAAATATAGTGACCGTGGCTGGAATG ATCAAGCTGGCGCTCTCAATTGCTAGTGGTCTGGCACACCTTCATATGGAGATTGT TGGTACACAAGGTAAACCTGCTATTGCTCATCGAGACATAAAATCAAAGAATATC TTAGTGAAAAAGTGTGAAACTTGTGCCATAGCGGACTTAGGGTTGGCTGTGAAGC ATGATTCAATACTGAACACTATCGACATACCTCAGAATCCTAAAGTGGGAACCAA GAGGTATATGGCTCCTGAAATGCTTGATGATACAATGAATGTGAATATCTTTGAGT CCTTCAAACGAGCTGACATCTATTCTGTTGGTCTGGTTTACTGGGAAATAGCCCGG AGGTGTTCAGTCGGAGGAATTGTTGAGGAGTACCAATTGCCTTATTATGACATGGT GCCTTCAGATCCCTCGATAGAGGAAATGAGAAAGGTTGTTTGTGACCAGAAGTTTC GACCAAGTATCCCAAACCAGTGGCAAAGTTGTGAAGCACTCCGAGTCATGGGGAG AATAATGCGTGAGTGTTGGTATGCCAACGGAGCGGCCCGCCTAACTGCTCTTCGTA TTAAGAAGACTATATCTCAACTTTGTGTCAAAGAAGACTGCAAAGCC (SEQ ID NO: 233)

[0344] GAGCTCTCGCCAGGACTGAAGTGTGTATGTCTTTTGTGTGATTCTTCAAACTTTACCTGCCAAACAGA AGGAGCATGTTGGGCATCAGTCATGCTAACCAATGGAAAAGAGCAGGTGATCAAATCCTGTGTCTCCCTTCCAGAA CTGAATGCTCAAGTCTTCTGTCATAGTTCCAACAATGTTACCAAAACCGAATGCTGCTTCACAGATTTTTGCAACA ACATAACACTGCACCTTCCAACAGCATCACCAAATGCCCCAAAACTTGGACCCATGGAG(SEQ ID NO:234)

[0345] 人ALK7的替代亚型亚型2的氨基酸序列(NCBI Ref Seq NP_001104501.1)以其加工的形式显示如下(SEQ ID NO:124),其中细胞外结构域以粗体字指示。

1 **MLTNGKEQVI KSCVSLPELN AQVFCHSSNN VTKTECCFTD FCNNITLHLP TASPNAPKLG**

61 **PME**LAIIITV PVCLLSIAAM LTVWACQGRQ CSYRKKKRPN VEEPLSECNL VNAGKTLKDL

121 IYDVTASGSG SGLPLLVQRT IARTIVLQEI VGKGRFGEVW HGRWCGEDVA VKIFSSRDER

[0346] 181 SWFREAEIYQ TVMLRHENIL GFIAADNKDN GTWTQLWLVS EYHEQGSLYD YLNRNIVTVA

241 GMIKLALSIA SGLAHLHMEI VGTQGKPAIA HRDIKSKNIL VKKCETCAIA DLGLAVKHDS

301 ILNTIDIPQN PKVGTKRYMA PEMLDDTMNV NIFESFKRAD IYSVGLVYWE IARRCSVGGI

361 VEEYQLPYYD MVPSDPSIEE MRKVVCDQKF RPSIPNQWQS CEALRVMGRI MRECWYANGA

[0347] 421 ARLTALRIKK TISQLCVKED CKA (SEQ ID NO: 124)

[0348] 细胞外ALK7多肽(亚型2)的氨基酸序列如下:

[0349] MLTNGKEQVIKSCVSLPELNAQVFCHSSNNVTKTECCFTDFCNNITLHLPTASPNAPKL GPME(SEQ ID NO:125).

[0350] 编码加工的ALK7多肽(亚型2)的核酸序列显示于下文SEQ ID NO:235中,对应于NCBI参考序列NM_001111031.1的核苷酸279-1607。编码细胞外ALK7多肽(亚型2)的核酸序列显示于SEQ ID NO:236中。

[0351] **ATGCTAACCAATGGAAAAGAGCAGGTGATCAAATCCTGTGTCTCCCTTCCAGA ACTGAATGCTCAAGTCTTCTGTCATAGTTCCAACAATGTTACCAAAACCGAAT GCTGCTTCACAGATTTTTGCAACAACATAACACTGCACCTTCCAACAGCATCA CCAAATGCCCCAAAACTTGGACCCATGGAG**CTGGCCATCATTATTACTGTGCCT GTTTGCCTCCTGTCCATAGCTGCGATGCTGACAGTATGGGCATGCCAGGGTCGACA GTGCTCCTACAGGAAGAAAAAGAGACCAAATGTGGAGGAACCACTCTCTGAGTGC AATCTGGTAAATGCTGGAAAAACTCTGAAAGATCTGATTTATGATGTGACCGCCTC TGGATCTGGCTCTGGTCTACCTCTGTTGGTTCAAAGGACAATTGCAAGGACGATTG TGCTTCAGGAAATAGTAGGAAAAGGTAGATTTGGTGAGGTGTGGCATGGAAGATG GTGTGGGGAAGATGTGGCTGTGAAAATATTCTCCTCCAGAGATGAAAGATCTTGG TTTCGTGAGGCAGAAATTTACCAGACGGTCATGCTGCGACATGAAAACATCCTTGG TTTCATTGCTGCTGACAACAAAGATAATGGAACTTGGACTCAACTTTGGCTGGTAT CTGAATATCATGAACAGGGCTCCTTATATGACTATTTGAATAGAAATATAGTGACC GTGGCTGGAATGATCAAGCTGGCGCTCTCAATTGCTAGTGGTCTGGCACACCTTCA TATGGAGATTGTTGGTACACAAGGTAAACCTGCTATTGCTCATCGAGACATAAAAT CAAAGAATATCTTAGTGAAAAAGTGTGAAACTTGTGCCATAGCGGACTTAGGGTT GGCTGTGAAGCATGATTCAATACTGAACACTATCGACATACCTCAGAATCCTAAA GTGGGAACCAAGAGGTATATGGCTCCTGAAATGCTTGATGATACAATGAATGTGA ATATCTTTGAGTCCTTCAAACGAGCTGACATCTATTCTGTTGGTCTGGTTTACTGGG AAATAGCCCGGAGGTGTTCAGTCGGAGGAATTGTTGAGGAGTACCAATTGCCTTA TTATGACATGGTGCCTTCAGATCCCTCGATAGAGGAAATGAGAAAGGTTGTTTGTG ACCAGAAGTTTCGACCAAGTATCCCAAACCAGTGGCAAAGTTGTGAAGCACTCCG AGTCATGGGGAGAATAATGCGTGAGTGTTGGTATGCCAACGGAGCGGCCCGCCTA ACTGCTCTTCGTATTAAGAAGACTATATCTCAACTTTGTGTCAAAGAAGACTGCAA AGCC (SEQ ID NO: 235)
ATGCTAACCAATGGAAAAGAGCAGGTGATCAAATCCTGTGTCTCCCTTCCAGAACT GAATGCTCAAGTCTTCTGTCATAGTTCCAACAATGTTACCAAAACCGAATGCTGCT TCACAGATTTTTGCAACAACATAACACTGCACCTTCCAACAGCATCACCAAATGCC CCAAAACTTGGACCCATGGAG (SEQ ID NO: 236)

[0352] 替代人ALK7前体多肽亚型3的氨基酸序列(NCBI Ref Seq NP_001104502.1)显示如下(SEQ ID NO:121),其中信号肽由单下划线指示。

[0353]
1 MTRALCSALR QALLLLAAAA ELSPGLKCVC LLCDSSNFTC QTEGACWASV MLTNGKEQVI
61 KSCVSLPELN AQVFCHSSNN VTKTECCFTD FCNNITLHLP TGLPLLVQRT IARTIVLQEI
121 VGKGRFGEVW HGRWCGEDVA VKIFSSRDER SWFREAEIYQ TVMLRHENIL GFIAADNKDN
181 GTWTQLWLVS EYHEQGSLYD YLNRNIVTVA GMIKLALSIA SGLAHLHMEI VGTQGKPAIA
241 HRDIKSKNIL VKKCETCAIA DLGLAVKHDS ILNTIDIPQN PKVGTKRYMA PEMLDDTMNV
301 NIFESFKRAD IYSVGLVYWE IARRCSVGGI VEEYQLPYYD MVPSDPSIEE MRKVVCDQKF

[0354] 361 RPSIPNQWQS CEALRVMGRI MRECWYANGA ARLTALRIKK TISQLCVKED CKA (SEQ ID NO: 121)

[0355] 加工的ALK7多肽(亚型3)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:126)。这种亚型缺少跨膜结构域,并且因此被提出以其整体是可溶的(Roberts等人,2003,Biol Reprod68:1719-1726)。如下所述来预测SEQ ID NO:126的N末端变体。

1 ELSPGLKCVC LLCDSSNFTC QTEGACWASV MLTNGKEQVI KSCVSLPELN AQVFCHSSNN

61 VTKTECCFTD FCNNITLHLP TGLPLLVQRT IARTIVLQEI VGKGRFGEVW HGRWCGEDVA

121 VKIFSSRDER SWFREAEIYQ TVMLRHENIL GFIAADNKDN GTWTQLWLVS EYHEQGSLYD

[0356] 181 YLNRNIVTVA GMIKLALSIA SGLAHLHMEI VGTQGKPAIA HRDIKSKNIL VKKCETCAIA

241 DLGLAVKHDS ILNTIDIPQN PKVGTKRYMA PEMLDDTMNV NIFESFKRAD IYSVGLVYWE

301 IARRCSVGGI VEEYQLPYYD MVPSDPSIEE MRKVVCDQKF RPSIPNQWQS CEALRVMGRI

361 MRECWYANGA ARLTALRIKK TISQLCVKED CKA (SEQ ID NO: 126)

[0357] 编码未加工的ALK7多肽前体多肽(亚型3)的核酸序列显示于SEQ ID NO:237中,对应于NCBI参考序列NM_001111032.1的核苷酸244-1482。编码加工的ALK7多肽(亚型3)的核酸序列显示于SEQ ID NO:238中。

[0358] ATGACCCGGGCGCTCTGCTCAGCGCTCCGCCAGGCTCTCCTGCTGCTCGCAGCGGC

[0359] CGCCGAGCTCTCGCCAGGACTGAAGTGTGTATGTCTTTTGTGTGATTCTTCAAACTT

[0360] TACCTGCCAAACAGAAGGAGCATGTTGGGCATCAGTCATGCTAACCAATGGAAAA

[0361] GAGCAGGTGATCAAATCCTGTGTCTCCCTTCCAGAACTGAATGCTCAAGTCTTCTG

[0362] TCATAGTTCCAACAATGTTACCAAAACCGAATGCTGCTTCACAGATTTTTGCAACA

[0363] ACATAACACTGCACCTTCCAACAGGTCTACCTCTGTTGGTTCAAAGGACAATTGCA

[0364] AGGACGATTGTGCTTCAGGAAATAGTAGGAAAAGGTAGATTTGGTGAGGTGTGGC

[0365] ATGGAAGATGGTGTGGGGAAGATGTGGCTGTGAAAATATTCTCCTCCAGAGATGA

[0366] AAGATCTTGGTTTCGTGAGGCAGAAATTTACCAGACGGTCATGCTGCGACATGAA

[0367] AACATCCTTGGTTTCATTGCTGCTGACAACAAAGATAATGGAACTTGGACTCAACT

[0368] TTGGCTGGTATCTGAATATCATGAACAGGGCTCCTTATATGACTATTTGAATAGAA

[0369] ATATAGTGACCGTGGCTGGAATGATCAAGCTGGCGCTCTCAATTGCTAGTGGTCTG

[0370] GCACACCTTCATATGGAGATTGTTGGTACACAAGGTAAACCTGCTATTGCTCATCG

[0371] AGACATAAAATCAAAGAATATCTTAGTGAAAAAGTGTGAAACTTGTGCCATAGCG

[0372] GACTTAGGGTTGGCTGTGAAGCATGATTCAATACTGAACACTATCGACATACCTCA

[0373] GAATCCTAAAGTGGGAACCAAGAGGTATATGGCTCCTGAAATGCTTGATGATACA

[0374] ATGAATGTGAATATCTTTGAGTCCTTCAAACGAGCTGACATCTATTCTGTTGGTCT

[0375] GGTTTACTGGGAAATAGCCCGGAGGTGTTCAGTCGGAGGAATTGTTGAGGAGTAC

[0376] CAATTGCCTTATTATGACATGGTGCCTTCAGATCCCTCGATAGAGGAAATGAGAAA

[0377] GGTTGTTTGTGACCAGAAGTTTCGACCAAGTATCCCAAACCAGTGGCAAAGTTGTG

[0378] AAGCACTCCGAGTCATGGGGAGAATAATGCGTGAGTGTTGGTATGCCAACGGAGC

[0379] GGCCCGCCTAACTGCTCTTCGTATTAAGAAGACTATATCTCAACTTTGTGTCAAAGAAGACTGCAAAGCC(SEQ ID NO:237)

[0380] GAGCTCTCGCCAGGACTGAAGTGTGTATGTCTTTTGTGTGATTCTTCAAACTTTACC

[0381] TGCCAAACAGAAGGAGCATGTTGGGCATCAGTCATGCTAACCAATGGAAAAGAGC

[0382] AGGTGATCAAATCCTGTGTCTCCCTTCCAGAACTGAATGCTCAAGTCTTCTGTCAT

[0383] AGTTCCAACAATGTTACCAAAACCGAATGCTGCTTCACAGATTTTTGCAACAACAT

[0384] AACACTGCACCTTCCAACAGGTCTACCTCTGTTGGTTCAAAGGACAATTGCAAGGA

[0385] CGATTGTGCTTCAGGAAATAGTAGGAAAAGGTAGATTTGGTGAGGTGTGGCATGG

[0386] AAGATGGTGTGGGGAAGATGTGGCTGTGAAAATATTCTCCTCCAGAGATGAAAGA

[0387] TCTTGGTTTCGTGAGGCAGAAATTTACCAGACGGTCATGCTGCGACATGAAAACAT

[0388] CCTTGGTTTCATTGCTGCTGACAACAAAGATAATGGAACTTGGACTCAACTTTGGC

[0389] TGGTATCTGAATATCATGAACAGGGCTCCTTATATGACTATTTGAATAGAAATATA

[0390] GTGACCGTGGCTGGAATGATCAAGCTGGCGCTCTCAATTGCTAGTGGTCTGGCACA

[0391] CCTTCATATGGAGATTGTTGGTACACAAGGTAAACCTGCTATTGCTCATCGAGACA

[0392] TAAAATCAAAGAATATCTTAGTGAAAAAGTGTGAAACTTGTGCCATAGCGGACTT

[0393] AGGGTTGGCTGTGAAGCATGATTCAATACTGAACACTATCGACATACCTCAGAATC

[0394] CTAAAGTGGGAACCAAGAGGTATATGGCTCCTGAAATGCTTGATGATACAATGAA

[0395] TGTGAATATCTTTGAGTCCTTCAAACGAGCTGACATCTATTCTGTTGGTCTGGTTTA

[0396] CTGGGAAATAGCCCGGAGGTGTTCAGTCGGAGGAATTGTTGAGGAGTACCAATTG

[0397] CCTTATTATGACATGGTGCCTTCAGATCCCTCGATAGAGGAAATGAGAAAGGTTGT

[0398] TTGTGACCAGAAGTTTCGACCAAGTATCCCAAACCAGTGGCAAAGTTGTGAAGCA

[0399] CTCCGAGTCATGGGGAGAATAATGCGTGAGTGTTGGTATGCCAACGGAGCGGCCC

[0400] GCCTAACTGCTCTTCGTATTAAGAAGACTATATCTCAACTTTGTGTCAAAGAAGACTGCAAAGCC (SEQ ID NO:238)

[0401] 替代人ALK7前体多肽亚型4的氨基酸序列(NCBI Ref Seq NP_001104503.1)显示如下(SEQ ID NO:122),其中信号肽由单下划线指示。

[0402]
1 MTRALCSALR QALLLLAAAA ELSPGLKCVC LLCDSSNFTC QTEGACWASV MLTNGKEQVI
61 KSCVSLPELN AQVFCHSSNN VTKTECCFTD FCNNITLHLP TDNGTWTQLW LVSEYHEQGS
121 LYDYLNRNIV TVAGMIKLAL SIASGLAHLH MEIVGTQGKP AIAHRDIKSK NILVKKCETC
181 AIADLGLAVK HDSILNTIDI PQNPKVGTKR YMAPEMLDDT MNVNIFESFK RADIYSVGLV
241 YWEIARRCSV GGIVEEYQLP YYDMVPSDPS IEEMRKVVCD QKFRPSIPNQ WQSCEALRVM
301 GRIMRECWYA NGAARLTALR IKKTISQLCV KEDCKA (SEQ ID NO: 122)

[0403] 加工的ALK7多肽(亚型4)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:127)。与ALK7亚型3一样,亚型4缺少跨膜结构域,并且因此被提出以其整体是可溶的(Roberts等人,2003,Biol Reprod 68:1719-1726)。如下所述来预测SEQ ID NO:127的N末端变体。

[0404]
1 ELSPGLKCVC LLCDSSNFTC QTEGACWASV MLTNGKEQVI KSCVSLPELN AQVFCHSSNN
61 VTKTECCFTD FCNNITLHLP TDNGTWTQLW LVSEYHEQGS LYDYLNRNIV TVAGMIKLAL
121 SIASGLAHLH MEIVGTQGKP AIAHRDIKSK NILVKKCETC AIADLGLAVK HDSILNTIDI
181 PQNPKVGTKR YMAPEMLDDT MNVNIFESFK RADIYSVGLV YWEIARRCSV GGIVEEYQLP
240 YYDMVPSDPS IEEMRKVVCD QKFRPSIPNQ WQSCEALRVM GRIMRECWYA NGAARLTALR
301 IKKTISQLCV KEDCKA (SEQ ID NO: 127)

[0405] 编码未加工的ALK7多肽前体多肽(亚型4)的核酸序列显示于SEQ ID NO:239中,对应于NCBI参考序列NM_001111033.1的核苷酸244-1244。编码加工的ALK7多肽(亚型4)的核酸序列显示于SEQ ID NO:240中。

[0406] ATGACCCGGGCGCTCTGCTCAGCGCTCCGCCAGGCTCTCCTGCTGCTCGCAGCGGC

[0407] CGCCGAGCTCTCGCCAGGACTGAAGTGTGTATGTCTTTTGTGTGATTCTTCAAACTT

[0408] TACCTGCCAAACAGAAGGAGCATGTTGGGCATCAGTCATGCTAACCAATGGAAAA

[0409] GAGCAGGTGATCAAATCCTGTGTCTCCCTTCCAGAACTGAATGCTCAAGTCTTCTG

[0410] TCATAGTTCCAACAATGTTACCAAAACCGAATGCTGCTTCACAGATTTTTGCAACA

[0411] ACATAACACTGCACCTTCCAACAGATAATGGAACTTGGACTCAACTTTGGCTGGTATCTGAATATCATGAACAGGGCTCCTTATATGACTATTTGAATAGAAATATAGTGACCGTGGCTGGAATGATCAAGCTGGCGCTCTCAATTGCTAGTGGTCTGGCACACCTTCATATGGAGATTGTTGGTACACAAGGTAAACCTGCTATTGCTCATCGAGACATAAAATCAAAGAATATCTTAGTGAAAAAGTGTGAAACTTGTGCCATAGCGGACTTAGGGTTGGCTGTGAAGCATGATTCAATACTGAACACTATCGACATACCTCAGAATCCTAAAGTGGGAACCAAGAGGTATATGGCTCCTGAAATGCTTGATGATACAATGAATGTGAATATCTTTGAGTCCTTCAAACGAGCTGACATCTATTCTGTTGGTCTGGTTTACTGGGAAATAGCCCGGAGGTGTTCAGTCGGAGGAATTGTTGAGGAGTACCAATTGCCTTATTATGACATGGTGCCTTCAGATCCCTCGATAGAGGAAATGAGAAAGGTTGTTTGTGACCAGAAGTTTCGACCAAGTATCCCAAACCAGTGGCAAAGTTGTGAAGCACTCCGAGTCATGGGGAGAATAATGCGTGAGTGTTGGTATGCCAACGGAGCGGCCCGCCTAACTGCTCTTCGTATTAAGAAGACTATATCTCAACTTTGTGTCAAAGAAGACTGCAAAGCCTAA(SEQ ID NO:239)

[0412] GAGCTCTCGCCAGGACTGAAGTGTGTATGTCTTTTGTGTGATTCTTCAAACTTTACCTGCCAAACAGAAGGAGCATGTTGGGCATCAGTCATGCTAACCAATGGAAAAGAGCAGGTGATCAAATCCTGTGTCTCCCTTCCAGAACTGAATGCTCAAGTCTTCTGTCATAGTTCCAACAATGTTACCAAAACCGAATGCTGCTTCACAGATTTTTGCAACAACATAACACTGCACCTTCCAACAGATAATGGAACTTGGACTCAACTTTGGCTGGTATCTGAATATCATGAACAGGGCTCCTTATATGACTATTTGAATAGAAATATAGTGACCGTGGCTGGAATGATCAAGCTGGCGCTCTCAATTGCTAGTGGTCTGGCACACCTTCATATGGAGATTGTTGGTACACAAGGTAAACCTGCTATTGCTCATCGAGACATAAAATCAAAGAATATCTTAGTGAAAAAGTGTGAAACTTGTGCCATAGCGGACTTAGGGTTGGCTGTGAAGCATGATTCAATACTGAACACTATCGACATACCTCAGAATCCTAAAGTGGGAACCAAGAGGTATATGGCTCCTGAAATGCTTGATGATACAATGAATGTGAATATCTTTGAGTCCTTCAAACGAGCTGACATCTATTCTGTTGGTCTGGTTTACTGGGAAATAGCCCGGAGGTGTTCAGTCGGAGGAATTGTTGAGGAGTACCAATTGCCTTATTATGACATGGTGCCTTCAGATCCCTCGATAGAGGAAATGAGAAAGGTTGTTTGTGACCAGAAGTTTCGACCAAGTATCCCAAACCAGTGGCAAAGTTGTGAAGCACTCCGAGTCATGGGGAGAATAATGCGTGAGTGTTGGTATGCCAACGGAGCGGCCCGCCTAACTGCTCTTCGTATTAAGAAGACTATATCTCAACTTTGTGTCAAAGAAGACTGCAAAGCCTAA(SEQ ID NO:240)

[0413] 基于大鼠中全长ALK7(亚型1)的信号序列(参见NCBI参考序列NP_620790.1)以及人ALK7与大鼠ALK7之间的高度序列同一性,预测人ALK7亚型1的加工形式如下(SEQ ID NO:128)。

[0414] 1 LKCVCLLCDS SNFTCQTEGA CWASVMLTNG KEQVIKSCVS LPELNAQVFC HSSNNVTKTE
61 CCFTDFCNNI TLHLPTASPN APKLGPME (SEQ ID NO: 128)

[0415] 预测加工的ALK7亚型1的活性变体,其中SEQ ID NO:123在N末端被截短1、2、3、4、5、6或7个氨基酸,并且SEQ ID NO:128在N末端被截短1或2个氨基酸。与SEQ ID NO:128一致,进一步预期,亮氨酸是人ALK7亚型3(SEQ ID NO:126)和人ALK7亚型4(SEQ ID NO:127)

的加工形式中的N末端氨基酸。

[0416] 在某些实施方案中，本公开文本涉及包含至少一种ALK7多肽的异多聚体，所述至少一种ALK7多肽包括其片段、功能变体和修饰形式。优选地，用于根据本公开文本的发明使用的ALK7多肽(例如，包含ALK7多肽的异多聚体及其用途)是可溶的(例如，ALK7的细胞外结构域)。在其他优选实施方案中，用于根据本公开文本使用的ALK7多肽与一种或多种ActRII-ALK4配体结合。因此，在一些优选实施方案中，用于根据本公开文本使用的ALK7多肽抑制(拮抗)一种或多种ActRII-ALK4配体的活性(例如，诱导Smad信号传导)。在一些实施方案中，本公开文本的异多聚体包含至少一种ALK7多肽，所述至少一种ALK7多肽与SEQ ID NO:120、123、124、125、121、126、122、127、128、129、255、133和134的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％或99％相同。在一些实施方案中，本公开文本的异多聚体由至少一种ALK7多肽组成或基本上由其组成，所述至少一种ALK7多肽与SEQ ID NO:120、123、124、125、121、126、122、127、128、129、255、133和134的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％或99％相同。

[0417] ALK7在脊椎动物之间非常保守，其中大段的细胞外结构域完全保守。例如，图22描绘与多种ALK7直系同源物相比的人ALK7细胞外结构域的多序列比对。因此，根据这些比对，可以预测配体结合结构域内对于正常ALK7-配体结合活性重要的关键氨基酸位置，以及可以预测可能在不显著改变正常ALK7-配体结合活性的情况下耐受取代的氨基酸位置。因此，根据本发明公开的方法有用的活性人ALK7变体多肽可以包括在来自另一种脊椎动物ALK7的相应位置处的一个或多个氨基酸，或者可以包括与人或其他脊椎动物序列中的残基类似的残基。不意在是限制性的，以下例子说明了定义活性ALK7变体的这种方法。人ALK7细胞外结构域(SEQ ID NO:425)中的V61是普通狨(Callithrix jacchus)ALK7(SEQ ID NO:428)中的异亮氨酸，因此所述位置可以改变，并且任选地可以改变为另一疏水性残基如L、I或F，或非极性残基如A。人细胞外结构域中的L32是菲律宾眼镜猴(Tarsius syrichta)(SEQ ID NO:429)ALK7中的R，表明此位点可以耐受众多种变化，包括急性残基如E、D、K、R、H、S、T、P、G、Y，以及可能非极性残基如A。人细胞外结构域中的K37是黑猩猩(Pan troglodytes)ALK7(SEQ ID NO:426)中的R，表明在此位置耐受碱性残基，包括R、K和H。人细胞外结构域中的P4的保守性相对较差，表现为黑猩猩ALK7中的A，由此表明在此位置应耐受众多种氨基酸。

[0418] 此外，本领域中已经在结构和功能特征方面表征ALK7蛋白[例如，Romano等人(2012)Journal of Molecular Modeling 18(8):3617-3625]。例如，称为三指毒素折叠的限定结构基序对于I型和II型受体的配体结合是重要的，并且由位于每个单体受体的细胞外结构域内不同位置的保守半胱氨酸残基形成[Greenwald等人(1999)Nat Struct Biol 6:18-22;以及Hinck(2012)FEBS Lett 586:1860-1870]。因此，如通过这些保守半胱氨酸的最外侧划分的人ALK7的核心配体结合结构域对应于SEQ ID NO:120的位置28-92。侧接这些半胱氨酸划分的核心序列的结构上较无序的氨基酸可以在N末端被截短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、26或27个残基，并且在C末端被截短1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21个残基，且不一定改变配体结合。用于N末端和/或C末端截短的示例性ALK7细胞外结构域包括SEQ ID NO:123、125、126和127。

[0419] 因此,ALK7的活性部分(例如,配体结合部分)的通式包含SEQ ID NO:120的氨基酸28-92。因此,ALK7多肽可以例如包含与在对应于SEQ ID NO:120的氨基酸20-28中任一个的残基处开始(例如,在氨基酸20、21、22、23、24、25、26、27或28中的任一个处开始)并且在对应于SEQ ID NO:120的氨基酸92-113中任一个的位置处结束(例如,在氨基酸92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112或113中的任一个处结束)的ALK7的一部分至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成。

[0420] 其他例子包括如下构建体,所述构建体在来自SEQ ID NO:120的21-28(例如,位置21、22、23、24、25、26、27或28中的任一个)、24-28(例如,位置24、25、26、27或28中的任一个)或25-28(例如,位置25、26、27或28中的任一个)的位置处开始,并且在来自SEQ ID NO:120的93-112(例如,位置93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111或112中的任一个)、93-110(例如,位置93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109或110中的任一个)、93-100(例如,位置93、94、95、96、97、98、99或100中的任一个)或93-95(例如,位置93、94或95中的任一个)的位置处结束。也考虑这些范围内的变体,特别是具有与SEQ ID NO:120的相应部分至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的那些。

[0421] 本文所述的变异可以以多种方式组合。在一些实施方案中,ALK7变体包含在配体结合袋中的不超过1、2、5、6、7、8、9、10或15个保守氨基酸变化。可变性可以特别地良好耐受的结合袋外部的位点包括细胞外结构域的氨基和羧基末端(如上所述)。

[0422] F)卵泡抑制素多肽

[0423] 在其他方面,ActRII-ALK4拮抗剂是卵泡抑制素多肽。如本文所述,卵泡抑制素多肽可以用于治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低心力衰竭的进展率和/或严重性,特别是治疗、预防一种或多种心力衰竭相关并发症或降低一种或多种心力衰竭相关并发症的进展率和/或严重性。

[0424] 术语“卵泡抑制素多肽”包括包含卵泡抑制素的任何天然存在的多肽以及其保留有用活性的任何变体(包括突变体、片段、融合物和肽模拟物形式)的多肽,并且所述术语进一步包括卵泡抑制素的任何功能单体或多聚体。在某些优选实施方案中,本公开文本的卵泡抑制素多肽结合至和/或抑制激活素活性,特别是激活素A。保留激活素结合特性的卵泡抑制素多肽变体可以基于涉及卵泡抑制素与激活素的相互作用的先前研究来鉴定。例如,WO 2008/030367披露了显示对于激活素结合重要的特定卵泡抑制素结构域(“FSD”)。如下文在SEQ ID NO:392-394中所示,卵泡抑制素N末端结构域(“FSND”SEQ ID NO:392)、FSD2(SEQ ID NO:394)以及在较低程度上FSD1(SEQ ID NO:393)代表卵泡抑制素内对于激活素结合重要的示例性结构域。另外,制备和测试多肽文库的方法描述于上文中的ActRII多肽背景下,并且这样的方法也涉及制备和测试卵泡抑制素的变体。卵泡抑制素多肽包括源自任何已知卵泡抑制素的序列的多肽,所述多肽具有与卵泡抑制素多肽的序列至少约80%相同、并且任选地具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列。卵泡抑制素多肽的例子包括人卵泡抑制素前体多肽

(SEQ ID NO:390)的成熟卵泡抑制素多肽或较短亚型或其他变体,如例如WO 2005/025601中所述。

[0425] 人卵泡抑制素前体多肽亚型FST344如下:

[0426]
```
  1  MVRARHQPGG LCLLLLLLCQ FMEDRSAQAG NCWLRQAKNG RCQVLYKTEL
 51  SKEECCSTGR LSTSWTEEDV NDNTLFKWMI FNGGAPNCIP CKETCENVDC
101  GPGKKCRMNK KNKPRCVCAP DCSNITWKGP VCGLDGKTYR NECALLKARC
151  KEQPELEVQY QGRCKKTCRD VFCPGSSTCV VDQTNNAYCV TCNRICPEPA
201  SSEQYLCGND GVTYSSACHL RKATCLLGRS IGLAYEGKCI KAKSCEDIQC
251  TGGKKCLWDF KVGRGRCSLC DELCPDSKSD EPVCASDNAT YASECAMKEA
301  ACSSGVLLEV KHSGSCNSIS EDTEEEEEDE DQDYSFPISS ILEW
```

[0427] (SEQ ID NO:390;NCBI参考号NP_037541.1)

[0428] 信号肽加下划线;上文中最后27个残基也加下划线,所述27个残基代表区分此卵泡抑制素亚型与下文所示的较短卵泡抑制素亚型FST317的C末端延伸。

[0429] 人卵泡抑制素前体多肽亚型FST317如下:

[0430]
```
  1  MVRARHQPGG LCLLLLLLCQ FMEDRSAQAG NCWLRQAKNG RCQVLYKTEL
 51  SKEECCSTGR LSTSWTEEDV NDNTLFKWMI FNGGAPNCIP CKETCENVDC
101  GPGKKCRMNK KNKPRCVCAP DCSNITWKGP VCGLDGKTYR NECALLKARC
151  KEQPELEVQY QGRCKKTCRD VFCPGSSTCV VDQTNNAYCV TCNRICPEPA
201  SSEQYLCGND GVTYSSACHL RKATCLLGRS IGLAYEGKCI KAKSCEDIQC
251  TGGKKCLWDF KVGRGRCSLC DELCPDSKSD EPVCASDNAT YASECAMKEA
301  ACSSGVLLEV KHSGSCN（SEQ ID NO: 391; NCBI参考号NP_006341.1）
```

[0431] 信号肽加下划线。

[0432] 卵泡抑制素N末端结构域(FSND)序列如下:

[0433] GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIFNGG APNCIPCK(SEQ ID NO:392;FSND)

[0434] FSD1和FSD2序列如下:

[0435] ETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCV(SEQ ID NO:393;FSD1)

[0436] KTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVT(SEQ ID NO:394;FSD2)

[0437] G)融合多肽

[0438] 在某些方面,本公开文本提供作为融合多肽的ActRII-ALK4拮抗剂。可以根据任何本文公开的方法或本领域中已知的方法制备所述融合多肽。

[0439] 在一些实施方案中,任何本文公开的融合多肽包含以下组分:a)任何本文公开的多肽(“A”)(例如,ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽),b)任何本文公开的接头(“B”),c)任何本文公开的异源部分(“C”)(例如,Fc免疫球蛋白结构域),以及任选地前导序列(“X”)(例如,组织纤溶酶原激活物前导序列)。在这样的实施方案中,所述融合多肽可以以如下方式排列(N末端至C末端):A-B-C或C-B-A。在这样的实施方案中,所述融合多肽可以以如下方式排列(N末端至C末端):X-A-B-C或X-C-B-A。在一些实施方案中,所述融合多肽包含A、B和C(以及任选地前导序列)中的任一个,并且包含不超过100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、5、4、3、2或1个另外的氨基酸(但是其可以包括其他翻译后修饰,如糖基化)。

[0440] 在一些实施方案中,所述融合多肽包含以如下方式定位的前导序列(N末端至C末端):X-A-B-C,并且所述融合多肽包含在X与A之间的1、2、3、4或5个氨基酸。在一些实施方案中,所述融合多肽包含以如下方式定位的前导序列(N末端至C末端):X-C-B-A,并且所述融

合多肽包含在X与C之间的1、2、3、4或5个氨基酸。在一些实施方案中，所述融合多肽包含以如下方式定位的前导序列(N末端至C末端)：X-A-B-C，并且所述融合多肽包含在X与A之间的丙氨酸。在一些实施方案中，所述融合多肽包含以如下方式定位的前导序列(N末端至C末端)：X-C-B-A，并且所述融合多肽包含在X与C之间的丙氨酸。在一些实施方案中，所述融合多肽包含以如下方式定位的前导序列(N末端至C末端)：X-A-B-C，并且所述融合多肽包含在X与A之间的甘氨酸和丙氨酸。在一些实施方案中，所述融合多肽包含以如下方式定位的前导序列(N末端至C末端)：X-C-B-A，并且所述融合多肽包含在X与C之间的甘氨酸和丙氨酸。在一些实施方案中，所述融合多肽包含以如下方式定位的前导序列(N末端至C末端)：X-A-B-C，并且所述融合多肽包含在X与A之间的苏氨酸。在一些实施方案中，所述融合多肽包含以如下方式定位的前导序列(N末端至C末端)：X-C-B-A，并且所述融合多肽包含在X与C之间的苏氨酸。在一些实施方案中，所述融合多肽包含以如下方式定位的前导序列(N末端至C末端)：X-A-B-C，并且所述融合多肽包含在A与B之间的苏氨酸。在一些实施方案中，所述融合多肽包含以如下方式定位的前导序列(N末端至C末端)：X-C-B-A，并且所述融合多肽包含在C与B之间的苏氨酸。

[0441] 在某些方面，本公开文本的融合蛋白包含ActRII-ALK4配体陷阱(例如，ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)的至少一部分和一个或多个异源部分(例如，免疫球蛋白Fc结构域)，任选地具有定位于所述ActRII-ALK4配体陷阱结构域与所述一个或多个异源部分之间的一个或多个接头结构域序列。这样的异源部分的熟知的例子包括但不限于多组氨酸、Glu-Glu、谷胱甘肽硫转移酶(GST)、硫氧还蛋白、蛋白A、蛋白G、免疫球蛋白重链恒定区(Fc)、麦芽糖结合蛋白(MBP)或人血清白蛋白。

[0442] 可以选择异源部分以赋予期望的特性。例如，一些异源部分特别适用于通过亲和色谱分离融合蛋白。出于亲和纯化的目的，使用亲和色谱的相关基质，如谷胱甘肽、淀粉酶和镍或钴缀合的树脂。许多这样的基质可以“试剂盒”形式获得，如可与(HIS6)融合配偶体一起使用的Pharmacia GST纯化系统和QIAexpressTM系统(Qiagen)。作为另一例子，可以选择异源部分以有利于融合多肽的检测。这样的检测结构域的例子包括各种荧光蛋白(例如，GFP)以及“表位标签”，表位标签通常是短肽序列，可获得其特异性抗体。易于获得特异性单克隆抗体的熟知的表位标签包括FLAG、流感病毒血凝素(HA)和c-myc标签。在一些情况下，异源部分具有蛋白酶切割位点，如因子Xa或凝血酶的切割位点，这允许相关蛋白酶部分消化融合蛋白，从而从中释放重组蛋白。然后可以通过后续色谱分离从异源部分分离所释放的蛋白质。

[0443] 在某些优选实施方案中，将ActRII-ALK4配体陷阱结构域(例如，ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)与在体内稳定ActRII-ALK4配体陷阱结构域的异源结构域(“稳定剂”结构域)融合，任选地用间插接头结构域来融合。通常，“稳定”意指延长血清半衰期的任何物质，不管这是由于减少破坏、降低肾脏的清除率还是药剂的其他药代动力学作用所致。已知具有免疫球蛋白的Fc部分的融合多肽可赋予众多种蛋白质期望的药代动力学特性。同样，与人血清白蛋白的融合物可以赋予期望的特性。可以选择的其他类型的异源部分包括多聚化(例如，二聚化、四聚化)结构域和功能性结构域。在一些实施方案中，稳定结构域还可以用作多聚化结构域，这样的多功能结构域包括例如Fc免疫球蛋白结构域。Fc免疫球蛋白结构域和包含一个或多个ActRII-ALK4配体陷阱结构域的Fc融合蛋白的

多个例子描述于本公开文本通篇中。

[0444] 在一些实施方案中，本公开文本的融合蛋白可以在N末端另外包括多个前导序列中的任一个。这样的序列将允许肽在真核系统中表达并被靶向分泌途径。参见例如，Ernst等人，美国专利号5,082,783(1992)。可替代地，可以使用天然信号序列来实现从细胞挤出。可能的前导序列包括天然前导序列、组织纤溶酶原激活物(TPA)和蜜蜂蜂毒肽(分别为SEQ ID NO.379、9、8和7)。掺入TPA前导序列的融合蛋白包括SEQ ID NO:6、31、34、37、40、43、46、49、51、88、92、129、133、247、276、279、333、336、339、342、345、348、351、354、381、396、402和406。信号肽的加工尤其可以根据所选择的前导序列、所用细胞类型和培养条件以及其他变量而变化，因此成熟(例如，ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)多肽的实际N末端起始位点可以在N末端或C末端方向上移动1、2、3、4或5个氨基酸。

[0445] 优选的融合蛋白包含SEQ ID NO:5、6、12、31、33、34、36、37、39、40、42、43、45、46、48、49、50、51、52、54、55、88、89、92、93、129、130、133、134、247、249、276、278、279、332、333、335、336、338、339、341、342、344、345、347、348、350、351、353、354、356、378、380、381、385、396、398、401、402、403、406、408和409中任一个中所示的氨基酸序列。

[0446] I.多聚化结构域

[0447] 在某些方面实施方案中，本公开文本的多肽(例如，ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK4和卵泡抑制素多肽)包含至少一个多聚化结构域。如本文所公开的，术语“多聚化结构域”是指促进至少第一多肽与至少第二多肽之间的共价或非共价相互作用的氨基酸或氨基酸序列。可以将多肽(例如，ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK4和卵泡抑制素多肽)与多聚化结构域共价或非共价接合。在一些实施方案中，多聚化结构域促进第一多肽(例如，ActRIIB或ActRIIA多肽)与第二多肽(例如，ALK4多肽或ALK7多肽)之间的相互作用以促进异多聚体形成(例如，异二聚体形成)，并且任选地妨碍或以其他方式不利于同多聚体形成(例如，同二聚体形成)，从而增加所需异多聚体的产量(参见例如，图8B)。在一些实施方案中，多肽(例如，ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK4和卵泡抑制素多肽)可以通过共价相互作用来自异二聚体。在一些实施方案中，多肽(例如，ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK4和卵泡抑制素多肽)可以通过非共价相互作用来自异二聚体。在一些实施方案中，多肽(例如，ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK4和卵泡抑制素多肽)可以通过共价和非共价相互作用二者来自异二聚体。在一些实施方案中，多聚化结构域促进第一多肽与第二多肽之间的相互作用以促进同多聚体形成，并且任选地妨碍或以其他方式不利于异多聚体形成，从而增加所需同多聚体的产量。在一些实施方案中，多肽(例如，ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK4和卵泡抑制素多肽)形成同二聚体。在一些实施方案中，多肽(例如，ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK4和卵泡抑制素多肽)可以通过共价相互作用来自同二聚体。在一些实施方案中，多肽(例如，ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK4和卵泡抑制素多肽)可以通过非共价相互作用来自同二聚体。在一些实施方案中，多肽(例如，ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK4和卵泡抑制素多肽)可以通过共价和非共价相互作用二者来自同二聚体。

[0448] 在某些方面，多聚化结构域可以包含相互作用对的一种组分。在一些实施方案中，本文公开的多肽可以形成多肽复合物，所述多肽复合物包含与第二多肽共价或非共价缔合的第一多肽，其中所述第一多肽包含第一ActRII-ALK4配体陷阱多肽(例如，ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK4和卵泡抑制素多肽)的氨基酸序列和相互作用对的第一成员(例如，第

一免疫球蛋白Fc结构域)的氨基酸序列;并且所述第二多肽包含第二ActRII-ALK4配体陷阱多肽(例如,ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK4和卵泡抑制素多肽)的氨基酸序列和相互作用对的第二成员(例如,第二免疫球蛋白Fc结构域)的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文公开的多肽可以形成多肽复合物,所述多肽复合物包含与第二多肽共价或非共价缔合的第一多肽,其中所述第一多肽包含ActRIIA多肽的氨基酸序列和相互作用对的第一成员的氨基酸序列;并且所述第二多肽包含ALK4多肽或ALK7多肽的氨基酸序列和相互作用对的第二成员的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文公开的多肽可以形成多肽复合物,所述多肽复合物包含与第二多肽共价或非共价缔合的第一多肽,其中所述第一多肽包含ActRIIB多肽的氨基酸序列和相互作用对的第一成员的氨基酸序列;并且所述第二多肽包含ALK4多肽或ALK7多肽的氨基酸序列和相互作用对的第二成员的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述相互作用对可以是任两个多肽序列,它们相互作用以形成二聚复合物,即异二聚或同二聚复合物。可以选择相互作用对以赋予改进的特性/活性,如延长的血清半衰期,或者用作衔接子,可以使另一部分附接至所述衔接子上以提供改进的特性/活性。例如,可以使聚乙二醇或糖基化部分附接至相互作用对的一种或两种组分,以提供改进的特性/活性,如改进的血清半衰期。

[0449] 相互作用对的第一和第二成员可以是不对称对,意味着所述对的成员优先彼此缔合而不是自缔合。因此,不对称相互作用对的第一和第二成员可以缔合形成异二聚复合物(参见例如,图8B)。可替代地,相互作用对可以是非指导的,意味着所述对的成员可以彼此缔合或自缔合,没有明显偏好,因此可以具有相同或不同的氨基酸序列(参见例如,图8A)。因此,非指导相互作用对的第一和第二成员可以缔合以形成同二聚体复合物或异二聚复合物。任选地,相互作用对(例如,不对称对或非指导相互作用对)的第一成员与所述相互作用对的第二成员共价缔合。任选地,相互作用对(例如,不对称对或非指导相互作用对)的第一成员与所述相互作用对的第二成员非共价缔合。在某些优选实施方案中,本文公开的多肽形成异二聚或同二聚复合物,但是也包括更高阶的异多聚和同多聚复合物,例如但不限于异三聚体、同三聚体、异四聚体、同四聚体和其他寡聚结构(参见例如,图11-图13,其也可以应用于ActRII-ALK4和ActRII-ALK7寡聚结构二者)。

[0450] Ia Fc融合蛋白

[0451] 作为包含多聚化结构域的融合多肽的具体例子,本公开文本提供融合多肽,所述融合多肽包含与包含免疫球蛋白的恒定结构域(如免疫球蛋白的CH1、CH2或CH3结构域)或免疫球蛋白Fc结构域的多肽融合的ActRII-ALK4配体陷阱多肽(例如,ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK4和卵泡抑制素多肽)。如本文所用,术语“免疫球蛋白Fc结构域”或简称“Fc”应理解为是指免疫球蛋白链恒定区的羧基端部分,优选免疫球蛋白重链恒定区或其一部分的羧基端部分。例如,免疫球蛋白Fc区可以包含1)CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域,2)CH1结构域和CH2结构域,3)CH1结构域和CH3结构域,4)CH2结构域和CH3结构域,或5)两个或多个结构域和免疫球蛋白铰链区的组合。在一个优选实施方案中,免疫球蛋白Fc区包含至少一个免疫球蛋白铰链区、CH2结构域和CH3结构域,并且优选缺少CH1结构域。在一些实施方案中,免疫球蛋白Fc区是人免疫球蛋白Fc区。在一些实施方案中,衍生出重链恒定区的免疫球蛋白类别是IgG(Igγ)(γ亚类1、2、3或4)。在某些优选实施方案中,恒定区源自IgG1。可以使用免疫球蛋白的其他类别,IgA(Igα)、IgD(Igδ)、IgE(Igε)和IgM(Igμ)。适当免疫球蛋白

重链恒定区的选择详细讨论于美国专利号5,541,087和5,726,044中，所述专利以其整体并入本文。认为从某些免疫球蛋白类别和亚类选择特定的免疫球蛋白重链恒定区序列以实现特定结果在本领域的技术水平内。在一些实施方案中，DNA构建体中编码免疫球蛋白Fc区的部分优选地包含铰链结构域的至少一部分，以及优选地Fcγ的CH3结构域或IgA、IgD、IgE或IgM中任一种中的同源结构域的至少一部分。此外，预期免疫球蛋白重链恒定区内的氨基酸的取代或缺失可用于实践本文公开的方法和组合物。一个例子是在上部CH2区引入氨基酸取代，以产生对Fc受体的亲和力降低的Fc变体(Cole等人，(1997)J.Immunol.159:3613)。本文提供源自人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的Fc结构域。

[0452] 可以用于人IgG1(G1Fc)的Fc部分的天然氨基酸序列的例子显示于下文中(SEQ ID NO:13)。虚线下划线指示铰链区，并且实线下划线指示关于天然存在的变体的位置。部分地，本公开文本提供多肽(例如，ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK4和卵泡抑制素多肽)，所述多肽包含具有与SEQ ID NO:13的70％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。

[0453] 根据SEQ ID NO:13中使用的编号系统，G1Fc中天然存在的变体将包括E134D和M136L(参见Uniprot P01857)。

[0454]
```
  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: 13)

[0455] 在一些实施方案中，本公开文本提供Fc融合多肽，所述Fc融合多肽包含与一个或多个Fc多肽结构域融合的ActRII-ALK4配体陷阱多肽结构域(例如，ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK4和卵泡抑制素多肽结构域)，所述ActRII-ALK4配体陷阱多肽结构域包括其变体以及同多聚体(例如，同二聚体)和异多聚体(例如，异二聚体，包括例如ActRIIA:ALK4、ActRIIB:ALK4、ActRIIA:ALK7和ActRIIB:ALK7异二聚体)，所述一个或多个Fc多肽结构域与SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0456] 可以用于人IgG2的Fc部分(G2Fc)的天然氨基酸序列的例子显示于下文中(SEQ ID NO:14)。虚线下划线指示铰链区，并且双下划线指示序列中存在数据库冲突的位置(根据UniProt P01859)。部分地，本公开文本提供多肽(例如，ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK4和卵泡抑制素多肽)，所述多肽包含具有与SEQ ID NO:14的70％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。

[0457]
```
  1 VECPPCPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ
 51 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS
101 NKGLPAPIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
151 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPMLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
```

[0458]
```
201 CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
```
(SEQ ID NO: 14)

[0459] 在一些实施方案中，本公开文本提供Fc融合多肽，所述Fc融合多肽包含与一个或

多个Fc多肽结构域融合的ActRII-ALK4配体陷阱多肽结构域(例如,ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK4和卵泡抑制素多肽结构域),所述ActRII-ALK4配体陷阱多肽结构域包括其变体以及同多聚体(例如,同二聚体)和异多聚体(例如,异二聚体,包括例如ActRIIA:ALK4、ActRIIB:ALK4、ActRIIA:ALK7和ActRIIB:ALK7异二聚体),所述一个或多个Fc多肽结构域与SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0460] 可以用于人IgG3的Fc部分(G3Fc)的氨基酸序列的两个例子显示于下文中。G3Fc中的铰链区的长度可以是其他Fc链中的最多四倍,并且含有三个相同的15个残基的区段,所述区段之前是相似的17个残基的区段。下文所示的第一G3Fc序列(SEQ ID NO:15)含有由单一15个残基的区段组成的短铰链区,而第二G3Fc序列(SEQ ID NO:16)含有全长铰链区。在每一情形中,虚线下划线指示铰链区,并且实线下划线指示根据UniProt P01859关于天然存在的变体的位置。部分地,本公开文本提供多肽(例如,ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK4和卵泡抑制素多肽),所述多肽包含具有与SEQ ID NO:15的70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,由其组成或基本上由其组成。部分地,本公开文本提供多肽(例如,ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK4和卵泡抑制素多肽),所述多肽包含具有与SEQ ID NO:16的70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,由其组成或基本上由其组成。

[0461]
```
  1 EPKSCDTPPP CPRCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
 51 VSHEDPEVQF KWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTFRVVSV LTVLHQDWLN
101 GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
151 TCLVKGFYPS DIAVEWESSG QPENNYNTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS
201 RWQQGNIFSC SVMHEALHNR FTQKSLSLSP GK   (SEQ ID NO: 15)
```

[0462]
```
  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: 16)
```

[0463] 在转换为SEQ ID NO:15中使用的编号系统时,G3Fc中天然存在的变体(例如,参见Uniprot P01860)包括E68Q、P76L、E79Q、Y81F、D97N、N100D、T124A、S169N、S169del、F221Y,并且本公开文本提供包含含有这些变异中的一个或多个的G3Fc结构域的融合多肽。此外,人免疫球蛋白IgG3基因(IGHG3)显示特征为不同铰链长度的结构多态性[参见Uniprot P01859]。具体而言,变体WIS缺少大部分V区和全部CH1区。除了铰链区中正常存在的11外,其在位置7处具有额外的链间二硫键。变体ZUC缺少大部分V区、全部CH1区和部分铰链。变体OMM可以代表等位基因形式或另一个γ链亚类。本公开文本提供另外的融合多肽,其包含含有这些变体中的一种或多种的G3Fc结构域。

[0464] 在一些实施方案中,本公开文本提供Fc融合多肽,所述Fc融合多肽包含与一个或多个Fc多肽结构域融合的ActRII-ALK4配体陷阱多肽结构域(例如,ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK4和卵泡抑制素多肽结构域),所述ActRII-ALK4配体陷阱多肽结构域包括其变体以及同多聚体(例如,同二聚体)和异多聚体(例如,异二聚体,包括例如ActRIIA:ALK4、

ActRIIB:ALK4、ActRIIA:ALK7和ActRIIB:ALK7异二聚体)，所述一个或多个Fc多肽结构域与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0465] 在一些实施方案中，本公开文本提供Fc融合多肽，所述Fc融合多肽包含与一个或多个Fc多肽结构域融合的ActRII-ALK4配体陷阱多肽结构域(例如，ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK4和卵泡抑制素多肽结构域)，所述ActRII-ALK4配体陷阱多肽结构域包括其变体以及同多聚体(例如，同二聚体)和异多聚体(例如，异二聚体，包括例如ActRIIA:ALK4、ActRIIB:ALK4、ActRIIA:ALK7和ActRIIB:ALK7异二聚体)，所述一个或多个Fc多肽结构域与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0466] 可以用于人IgG4的Fc部分(G4Fc)的天然氨基酸序列的例子显示于下文中(SEQ ID NO:17)。虚线下划线指示铰链区。部分地，本公开文本提供多肽(例如，ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK4和卵泡抑制素多肽)，所述多肽包含具有与SEQ ID NO:17的70％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性的氨基酸序列，由其组成或基本上由其组成。

[0467]
```
  1 ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ
 51 EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
101 YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL
151 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ
201 EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK    (SEQ ID NO: 17)
```

[0468] 在一些实施方案中，本公开文本提供Fc融合多肽，所述Fc融合多肽包含与一个或多个Fc多肽结构域融合的ActRII-ALK4配体陷阱多肽结构域(例如，ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK4和卵泡抑制素多肽结构域)，所述ActRII-ALK4配体陷阱多肽结构域包括其变体以及同多聚体(例如，同二聚体)和异多聚体(例如，异二聚体，包括例如ActRIIA:ALK4、ActRIIB:ALK4、ActRIIA:ALK7和ActRIIB:ALK7异二聚体)，所述一个或多个Fc多肽结构域与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0469] 关于G1Fc序列(SEQ ID NO:13)，本文中呈现Fc结构域中的多种工程化突变，并且G2Fc、G3Fc和G4Fc中的类似突变可以源自图7中其与G1Fc的比对。由于不等的铰链长度，基于同种型比对的类似Fc位置(图7)在SEQ ID NO:13、14、15和17中具有不同的氨基酸编号。还可以理解，由铰链、C_H2和C_H3区域组成的免疫球蛋白序列(例如，SEQ ID NO:13、14、15、16或17)中的给定氨基酸位置将通过与编号涵盖整个IgG1重链恒定结构域(由C_H1、铰链、C_H2和C_H3区域组成)(如在Uniprot数据库中)时的相同位置不同的编号来标识。例如，人G1Fc序列(SEQ ID NO:13)、人IgG1重链恒定结构域(Uniprot P01857)和人IgG1重链中的选定C_H3位置之间的对应性如下。

[0470]

不同编号系统中C_H3位置的对应性		
G1Fc (编号在铰链区中的第一苏氨酸处开始)	IgG1重链 恒定结构域 (编号在C_H1处开始)	IgG1重链 (Kabat等人, 1991*的EU编号方案)
Y127	Y232	Y349
S132	S237	S354
E134	E239	E356
K138	K243	K360
T144	T249	T366
L146	L251	L368
N162	N267	N384

[0471]

K170	K275	K392
D177	D282	D399
D179	D284	D401
Y185	Y290	Y407
K187	K292	K409
H213	H318	H435
K217	K322	K439
* Kabat等人 (编辑) 1991; 第688-696页在*Sequences of Proteins of Immunological Interest*中, 第5版, 第1卷, NIH, 贝塞斯达, 马里兰州。		

[0472] 在一些实施方案中,本公开文本提供具有工程化或变体Fc区的抗体和Fc融合蛋白。这样的抗体和Fc融合蛋白可以是有用的,例如,用于调节效应子功能,如抗原依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。另外,所述修饰可以改善抗体和Fc融合蛋白的稳定性。通过将适当的核苷酸变化引入DNA中或通过肽合成来制备抗体和Fc融合蛋白的氨基酸序列变体。此类变体包括例如本文公开的抗体和Fc融合蛋白的氨基酸序列内的残基的缺失和/或在所述残基中插入和/或取代。进行缺失、插入和取代的任何组合以得到最终构建体,条件是最终构建体具有所需的特征。氨基酸变化也可以改变抗体和Fc融合蛋白的翻译后过程,如改变糖基化位点的数量或位置。

[0473] 可以通过在氨基酸序列中引入变化来产生具有降低的效应子功能的抗体和Fc融合蛋白,所述变化包括但不限于Bluestone等人描述的Ala-Ala突变(参见WO 94/28027和WO 98/47531;还参见Xu等人,2000Cell Immunol 200;16-26)。因此,在某些实施方案中,可以使用在恒定区内具有突变(包括Ala-Ala突变)的本公开文本的Fc融合蛋白来降低或消除效应子功能。根据这些实施方案,抗体和Fc融合蛋白可以包含在位置234处突变为丙氨酸的突变或在位置235处突变为丙氨酸的突变,或其组合。在一个实施方案中,所述抗体或Fc融合蛋白包含IgG4框架,其中Ala-Ala突变将描述在位置234处从苯丙氨酸到丙氨酸的一个或多个突变和/或在位置235处从亮氨酸到丙氨酸的突变。在另一个实施方案中,所述抗体或Fc融合蛋白包含IgG1框架,其中Ala-Ala突变将描述在位置234处从亮氨酸到丙氨酸的一个或

多个突变和/或在位置235处从亮氨酸到丙氨酸的突变。尽管这些位点处的丙氨酸取代在降低人抗体和鼠抗体二者的ADCC方面有效，但是这些取代在降低CDC活性方面不太有效。通过随机诱变方法定位Fc的Clq结合位点来鉴定的另一种单一变体P329A在保留ADCC活性的同时降低CDC活性方面非常有效。已经显示L234A、L235A和P329A的组合(LALA-PG，Kabat位置)取代可有效沉默人IgG1抗体的效应子功能。关于LALA、LALA-PG和其他突变的详细论述，参见Lo等人(2017)1Biol.Chem.292:3900-3908，其内容通过引用以其整体特此并入本文。在一些实施方案中，本公开文本的Fc融合蛋白在重链的Fc区中包含L234A、L235A和P329G突变(LALA-PG;Kabat位置)。所述抗体或Fc融合蛋白可以可替代地或另外地携带其他突变，包括CH2结构域中的点突变K322A(Hezareh等人2001J Virol.75:12161-8)。

[0474] 在特定实施方案中，所述抗体或Fc融合蛋白可以被修饰以增强或抑制补体依赖性细胞毒性(CDC)。调节的CDC活性可以通过在Fc区中引入一个或多个氨基酸取代、插入或缺失来实现(参见例如美国专利号6,194,551)。可替代地或另外地，可以在Fc区中引入一个或多个半胱氨酸残基，从而允许在此区域中形成链间二硫键。由此生成的同二聚抗体或Fc融合蛋白可以具有改进的或降低的内化能力和/或增加的或减少的补体介导的细胞杀伤。参见Caron等人，J.Exp Med.176:1191-1195(1992)和Shopes,B.J.Immunol.148:2918-2922(1992);WO99/51642;Duncan&Winter Nature 322:738-40(1988);美国专利号5,648,260;美国专利号5,624,821;以及WO 94/29351。

[0475] Ib异多聚体

[0476] 许多本领域中已知的方法可以用于生成如本文所公开的ActRIIB:ALK4异多聚体、ActRIIB:ALK7异多聚体、ActRIIA:ALK4异多聚体和ActRIIA:ALK7异多聚体。例如，非天然存在的二硫键可以通过以下方式来构建：在第一多肽(例如，ActRIIB或ActRIIA多肽)上用含有游离硫醇的残基(如半胱氨酸)替代天然存在的氨基酸，使得所述游离硫醇与第二多肽(例如，ALK4或ALK7多肽)上的另一含有游离硫醇的残基相互作用，使得在第一多肽与第二多肽之间形成二硫键。促进异多聚体形成的相互作用的另外的例子包括但不限于离子相互作用，如Kjaergaard等人，WO 2007147901中所述;静电转向效应，如Kannan等人，U.S.8,592,562中所述;卷曲螺旋相互作用，如Christensen等人，U.S.20120302737中所述;亮氨酸拉链，如Pack和Plueckthun,(1992)Biochemistry 31:1579-1584中所述;以及螺旋-转角-螺旋基序，如Pack等人，(1993)Bio/Technology 11:1271-1277中所述。各个区段的连接可以经由例如共价结合(如通过化学交联、肽接头、二硫桥等)或亲和相互作用(如通过亲和素-生物素或亮氨酸拉链技术)获得。

[0477] 作为具体例子，本公开文本提供融合蛋白，所述融合蛋白包含与包含免疫球蛋白的恒定结构域(如源自人IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4的CH1、CH2或CH3结构域)的多肽融合的ActRIIB、ActRIIA、ALK4或ALK7，所述恒定结构域已经进行修饰以促进异多聚体形成。在从单一细胞系大规模生产不对称的基于免疫球蛋白的蛋白质中出现的问题被称为“链缔合问题”。正如在双特异性抗体的产生中突出地面临的那样，链缔合问题涉及从多种组合中有效产生所需多链蛋白的挑战，所述组合当在单一细胞系中产生不同的重链和/或轻链时固有地产生[参见，例如，Klein等人(2012)mAbs 4:653-663]。当在相同细胞中产生两种不同的重链和两种不同的轻链时，这一问题最为严重，在这种情况下，当典型地仅需要一种时，存在总共16种可能的链组合(尽管这些中的一些是相同的)。然而，相同的原理解释了仅并入

两条不同(不对称)重链的所需多链融合蛋白的产量降低。

[0478] 本领域中已知各种方法,该方法在单一细胞系中增加含Fc融合多肽链的所需配对,以产生可接受产率下的优选的不对称融合蛋白[参见,例如,Klein等人(2012)mAbs 4:653-663;和Spiess等人(2015)Molecular Immunology 67(2A):95-106]。用于获得含Fc链的所需配对的方法包括但不限于基于电荷的配对(静电转向)、"杵臼结构(knobs-into-holes)"空间配对、SEED体配对和基于亮氨酸拉链的配对。参见例如,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;US 5932448;WO 1993/011162;WO 2009/089004以及WO 2011/034605。如本文所述,这些方法可以用于生成异二聚体,所述异二聚体包含ActRIIB多肽和另一种(任选地不同的)ActRIIB多肽、ActRIIA多肽和另一种(任选地不同的)ActRIIA多肽、ActRIIB多肽和ActRIIA多肽、ActRIIB多肽和ALK4多肽、ActRIIB多肽和ALK7多肽、ActRIIA多肽和ALK4多肽或者ActRIIA多肽和ALK7多肽。

[0479] 例如,可以促进特定多肽之间的相互作用的一种手段是通过工程化突起入腔(杵臼结构)互补区域,如Arathoon等人,U.S.7,183,076和Carter等人,U.S.5,731,168中所述。通过用较大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)替代来自第一多肽(例如第一相互作用对)的界面的小氨基酸侧链来构建"突起"。通过用较小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替代大的氨基酸侧链,任选地在第二多肽(例如,第二相互作用对)的界面上产生与突起相同或相似大小的互补"腔"。当在第一或第二多肽的界面处存在适当定位和尺寸的突起或腔时,仅需要在相邻界面处分别工程化相应的腔或突起。

[0480] 在中性pH(7.0)下,天冬氨酸和谷氨酸带负电,并且赖氨酸、精氨酸和组氨酸带正电。这些带电荷的残基可以用于促进异二聚体形成,并且同时阻碍同二聚体形成。在异性电荷之间发生吸引相互作用,并且在同性电荷之间发生排斥相互作用。部分地,本文公开的多肽复合物通过进行带电界面残基的定点诱变利用吸引相互作用来促进异多聚体形成(例如异二聚体形成),并且任选地利用排斥相互作用来阻碍同二聚体形成(例如同二聚体形成)。

[0481] 例如,IgG1 CH3结构域界面包含参与结构域-结构域相互作用的四个独特的电荷残基对:Asp356-Lys439'、Glu357-Lys370'、Lys392-Asp399'和Asp399-Lys409'[第二链中的残基编号由(')指示]。应当注意,本文用于命名IgG1 CH3结构域中残基的编号方案符合Kabat的EU编号方案。由于CH3-CH3结构域相互作用中存在2倍对称性,每种独特的相互作用将在结构中表现两次(例如,Asp-399-Lys409'和Lys409-Asp399')。在野生型序列中,K409-D399'既有利于异二聚体形成也有利于同二聚体形成。第一链中转换电荷极性的单一突变(例如,K409E;正电荷至负电荷)导致对于第一链同二聚体的形成不利的相互作用。由于在同性电荷之间发生的排斥相互作用(负-负;K409E-D399'和D399-K409E')而产生了不利的相互作用。第二链中转换电荷极性的类似突变(D399K';负电荷至正电荷)导致对于第二链同二聚体形成不利的相互作用(K409'-D399K'和D399K-K409')。但是,与此同时,这两个突变(K409E和D399K')导致对于异二聚体形成有利的相互作用(K409E-D399K'和D399-K409')。

[0482] 通过另外的带电荷残基的突变可以进一步增强对异二聚体形成和同二聚体阻遏的静电转向效应,所述另外的带电荷残基可以与或可以不与第二链中的带异性电荷的残基

(包括例如Arg355和Lys360)配对。下表列出了可以单独或组合使用的可能的电荷变化突变,以增强本文公开的异多聚体的异多聚体形成。

[0483]

用于增强异二聚体形成的成对带电荷残基突变的例子			
第一链中的位置	第一链中的突变	第二链中的相互作用位置	第二链中的相应突变
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

[0484] 在一些实施方案中,用带电荷的氨基酸替代本申请的融合多肽中构成CH3-CH3界面的一个或多个残基,使得相互作用变得静电不利。例如,用带负电荷的氨基酸(例如,天冬氨酸或谷氨酸)替代界面中的带正电荷的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸或组氨酸)。可替代地,或与前述取代组合,用带正电荷的氨基酸替代界面中的带负电荷的氨基酸。在某些实施方案中,用具有所需电荷特征的非天然存在的氨基酸替代所述氨基酸。应当注意,使带负电荷的残基(Asp或Glu)突变为His将导致侧链体积增加,这可能引起空间问题。此外,His质子供体和受体形式取决于局部环境。应将这些问题纳入设计策略的考虑范围中。因为界面残基在人和小鼠IgG亚类中是高度保守的,所以本文公开的静电转向效应可以应用于人和小鼠IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。这种策略还可以扩展至将不带电荷的残基修饰为CH3结构域界面处的带电荷残基。

[0485] 在某些方面,要根据本文公开的方法使用的ActRII-ALK4配体陷阱是异多聚体复合物,所述异多聚体复合物包含与至少一种ActRII多肽(例如,ActRIIA或ActRIIB多肽)共价或非共价缔合的至少一种ALK多肽(例如,ALK4或ALK7多肽)。优选地,本文公开的多肽形成异二聚复合物,但是也包括更高阶的异多聚复合物(异多聚体),例如但不限于异三聚体、异四聚体和其他寡聚结构(参见例如,图11-图13,其也可以应用于ActRII-ALK4和ActRII-ALK7寡聚结构二者)。在一些实施方案中,ALK和/或ActRII多肽包含至少一个多聚化结构域。本文公开的多肽可以与多聚化结构域共价或非共价接合。优选地,多聚化结构域促进第一多肽(例如,ActRIIB或ActRIIA多肽)与第二多肽(例如,ALK4或ALK7多肽)之间的相互作用以促进异多聚体形成(例如,异二聚体形成),并且任选地妨碍或以其他方式不利于同多聚体形成(例如,同二聚体形成),从而增加所需异多聚体的产量(参见例如,图12)。

[0486] 部分地,本公开文本使用基于电荷配对(静电转向)工程化为互补的Fc序列提供不对称的含Fc多肽链的所需配对。具有静电互补性的一对Fc序列之一可以在使用或不使用可选接头的情况下任意地与构建体的ActRIIB多肽、ActRIIA多肽、ALK4多肽或ALK7多肽融合,以生成ActRIIB-Fc、ActRIIA-Fc、ALK4-Fc或ALK7-Fc融合多肽。此单链可以连同与第一Fc序列互补的Fc序列在所选细胞中共表达,以有利于所需多链构建体(例如,ActRIIB-Fc-ALK4-Fc异多聚体)的生成。在基于静电转向的此例子中,SEQ ID NO:18[人G1Fc(E134K/D177K)]和SEQ ID NO:19[人G1Fc(K170D/K187D)]是互补Fc序列的例子,其中工程化的氨基酸取代

加双下划线，并且构建体的ActRIIB多肽、ActRIIA多肽、ALK4多肽或ALK7多肽可以与SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19融合，但不会与二者同时融合。鉴于天然hG1Fc、天然hG2Fc、天然hG3Fc与天然hG4Fc之间的高度氨基酸序列同一性，可以了解，在hG2Fc、hG3Fc或hG4Fc中的对应位置处的氨基酸取代(参见图7)将生成互补Fc对，所述互补Fc对可以代替下文的互补hG1Fc对(SEQ ID NO:18和19)来使用。

[0487]
```
  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: 18)

[0488]
```
  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: 19)

[0489] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK4异多聚体多肽，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIB异多聚体多肽，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0490] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK7异多聚体多肽，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK7异多聚体多肽，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0491] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIA-ALK4异多聚体多肽，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至

少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIA异多聚体多肽，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0492] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK7异多聚体多肽，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK7异多聚体多肽，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0493] 部分地，本公开文本使用针对空间互补性工程化的Fc序列来提供不对称的含Fc多肽链的所需配对。部分地，本公开文本提供杵臼结构配对作为空间互补性的例子。具有空间互补性的一对Fc序列之一可以在使用或不使用可选接头的情况下任意地与构建体的ActRIIB多肽、ActRIIA多肽、ALK4多肽或ALK7多肽融合，以生成ActRIIB-Fc、ActRIIA-Fc、ALK4-Fc或ALK7-Fc融合多肽。此单链可以连同与第一Fc序列互补的Fc序列在所选细胞中共表达，以有利于所需多链构建体的生成。在基于杵臼结构配对的此例子中，SEQ IDNO:20[人G1Fc(T144Y)]和SEQ ID NO:21[人G1Fc(Y185T)]是互补Fc序列的例子，其中工程化的氨基酸取代加双下划线，并且构建体的ActRIIB多肽、ActRIIA多肽、ALK4多肽或ALK7多肽可以与SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21融合，但不会与二者同时融合。鉴于天然hG1Fc、天然hG2Fc、天然hG3Fc与天然hG4Fc之间的高度氨基酸序列同一性，可以了解，在hG2Fc、hG3Fc或hG4Fc中的对应位置处的氨基酸取代(参见图7)将生成互补Fc对，所述互补Fc对可以代替下文的互补hG1Fc对(SEQ ID NO:20和21)来使用。

[0494]
```
  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: 20)

[0495]
```
  1  THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
 51  VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
```

[0496]
```
101  VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF
151  YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLTSKLTV DKSRWQQGNV
201  FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK
```
(SEQ ID NO: 21)

[0497] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多

肽的ActRIIB:ALK4异多聚体多肽，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK4异多聚体多肽，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0498] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK7异多聚体多肽，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK7异多聚体多肽，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0499] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK4异多聚体多肽，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK4异多聚体多肽，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0500] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK7异多聚体多肽，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK7异多聚体多肽，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:20的

氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0501] 基于杵臼结构配对的Fc互补性与工程化的二硫键组合的例子公开于SEQ ID NO:22[hG1Fc(S132C/T144W)]和SEQ ID NO:23[hG1Fc(Y127C/T144S/L146A/Y185V)]中。这些序列中的工程化的氨基酸取代加双下划线，并且构建体的ActRIIB多肽、ActRIIA多肽、ALK4多肽或ALK7多肽可以与SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:23融合，但不会与二者同时融合。鉴于天然hG1Fc、天然hG2Fc、天然hG3Fc与天然hG4Fc之间的高度氨基酸序列同一性，可以了解，在hG2Fc、hG3Fc或hG4Fc中的对应位置处的氨基酸取代(参见图7)将生成互补Fc对，所述互补Fc对可以代替下文的互补hG1Fc对(SEQ ID NO:22和23)来使用。

[0502]
```
  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: 22)

[0503]
```
  1   THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
 51   VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101   VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVCTLP PSREEMTKNQ VSLSCACVKGF
151   YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLVSKLTV DKSRWQQGNV
201   FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK
```
(SEQ ID NO: 23)

[0504] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK4异多聚体多肽，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK4异多聚体多肽，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0505] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK7异多聚体多肽，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK7异多聚体多肽，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序

列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0506] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK4异多聚体多肽，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK4异多聚体多肽，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0507] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK7异多聚体多肽，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK7异多聚体多肽，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0508] 部分地，本公开文本使用工程化以生成人IgG和IgA C_H3结构域的交错突β链区段的Fc序列来提供不对称的含Fc多肽链的所需配对。这样的方法包括使用链交换工程化结构域(SEED)C_H3异二聚体，从而允许形成SEED体融合多肽[参见例如，Davis等人(2010)Protein Eng Design Sel 23:195-202]。具有SEED体互补性的一对Fc序列之一可以在使用或不使用可选接头的情况下任意地与构建体的第一ActRIIB多肽或第二ActRIIB多肽融合，以生成ActRIIB-Fc融合多肽。此单链可以连同与第一Fc序列互补的Fc序列在所选细胞中共表达，以有利于所需多链构建体的生成。在基于SEED体(Sb)配对的此例子中，SEQ ID NO:24[hG1Fc(Sb_{AG})]和SEQ ID NO:25[hG1Fc(Sb_{GA})]是互补IgG Fc序列的例子，其中来自IgA Fc的工程化的氨基酸取代加双下划线，并且构建体的第一ActRIIB多肽或第二变体ActRIIB多肽可以与SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25融合，但不会与二者同时融合。鉴于天然hG1Fc、天然hG2Fc、天然hG3Fc和天然hG4Fc之间的高度氨基酸序列同一性，可以了解，hG1Fc、hG2Fc、hG3Fc或hG4Fc中对应位置处的氨基酸取代(参见图7)将生成Fc单体，所述Fc单体可以在下文的互补IgG-IgA对(SEQ ID NO:24和25)中使用。

[0509]

```
  1   THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
 51   VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101   VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PFRPEVHLLP PSREEMTKNQ VSLTCLARGF
151   YPKDIAVEWE SNGQPENNYK TTPSRQEPSQ GTTTFAVTSK LTVDKSRWQQ
201   GNVFSCSVMH EALHNHYTQK TISLSPGK    (SEQ ID NO: 24)
```

[0510]

```
  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: 25)
```

[0511] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK4异多聚体多肽，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK4异多聚体多肽，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0512] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK7异多聚体多肽，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK7异多聚体多肽，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0513] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK4异多聚体多肽，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK4异多聚体多肽，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序

列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0514] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK7异多聚体多肽，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK7异多聚体多肽，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的Fc结构域。

[0515] 部分地，本公开文本提供具有附接在Fc C_H3结构域的C末端的可切割亮氨酸拉链结构域的不对称的含Fc多肽链的所需配对。亮氨酸拉链的附接足以引起异二聚抗体重链的优先组装。参见例如，Wranik等人(2012)J Biol Chem 287:43331-43339。如本文所公开，附接至亮氨酸拉链形成链的一对Fc序列之一可以在使用或不使用可选接头的情况下任意地与构建体的第一ActRIIB多肽或第二ActRIIB多肽融合，以生成ActRIIB-Fc融合多肽。此单链可以连同附接至互补的亮氨酸拉链形成链的Fc序列在所选细胞中共表达，以有利于所需多链构建体的生成。在纯化后用细菌胞内蛋白酶Lys-C对构建体进行蛋白水解消化可以释放亮氨酸拉链结构域，从而产生Fc构建体，所述构建体的结构与天然Fc的结构相同。在基于亮氨酸拉链配对的此例子中，SEQ ID NO:26[hG1Fc-Ap1(酸性)]和SEQ ID NO:27[hG1Fc-Bp1(碱性)]是互补IgG Fc序列的例子，其中工程化的互补亮氨酸拉链序列加下划线，并且构建体的ActRIIB多肽或第二变体ActRIIB多肽可以与SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27融合，但不会与二者同时融合。鉴于天然hG1Fc、天然hG2Fc、天然hG3Fc和天然hG4Fc之间的高度氨基酸序列同一性，可以了解，在使用或不使用可选接头的情况下附接至hG1Fc、hG2Fc、hG3Fc或hG4Fc(参见图7)的亮氨酸拉链形成序列将生成Fc单体，所述Fc单体可以在下文的互补的亮氨酸拉链形成对(SEQ ID NO:26和27)中使用。

[0516]
```
  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 LSPGKGGSAQ LEKELQALEK ENAQLEWELQ
251   ALEKELAQGA T        (SEQ ID NO: 26)
```

[0517]
```
  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 LSPGKGGSAQ LKKKLQALKK KNAQLKWKLQ
251   ALKKKLAQGA T        (SEQ ID NO: 27)
```

[0518] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多

肽的ActRIIB:ALK4异多聚体多肽，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK4异多聚体多肽，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0519] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK7异多聚体多肽，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK7异多聚体多肽，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0520] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK4异多聚体多肽，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK4异多聚体多肽，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0521] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK7异多聚体多肽，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK7异多聚体多肽，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:26的

氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0522] 部分地，本公开文本通过上述方法与Fc结构域中另外的突变组合提供了不对称的含Fc多肽链的所需配对，所述另外的突变促进所需异聚种类的纯化。一个例子使用与工程化的二硫键组合的基于杵臼结构配对的Fc结构域的互补性，如在SEQ ID NO:22和23中所公开的，加上一个含Fc多肽链中两个带负电荷的氨基酸(天冬氨酸或谷氨酸)以及互补的含Fc多肽链中两个带正电荷的氨基酸(例如精氨酸)的另外的取代(SEQ ID NO:28-29)。这四种氨基酸取代有助于基于等电点或净分子电荷的差异从异质性多肽混合物选择性纯化所需的异聚融合多肽。这些序列中工程化的氨基酸取代在下文加双下划线，并且构建体的ActRIIB多肽、ActRIIA多肽、ALK4多肽或ALK7多肽可以与SEQ ID NO:28或SEQ IDNO:29融合，但不会与二者同时融合。鉴于天然hG1Fc、天然hG2Fc、天然hG3Fc与天然hG4Fc之间的高度氨基酸序列同一性，可以了解，在hG2Fc、hG3Fc或hG4Fc中的对应位置处的氨基酸取代(参见图7)将生成互补Fc对，所述互补Fc对可以代替下文的互补hG1Fc对(SEQ ID NO:28-29)来使用。

[0523]
```
  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   FSCSVMHEAL HNHYTQDSLS LSPGK    (SEQ ID NO: 28)
```

[0524]
```
  1   THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
 51   VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
101   VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVCTLP PSREEMTKNQ VSLSCAVKGF
151   YPSDIAVEWE SRGQPENNYK TTPPVLDSRG SFFLVSKLTV DKSRWQQGNV
201   FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK    (SEQ ID NO: 29)
```

[0525] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK4异多聚体多肽，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0526] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK7异多聚体多肽，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0527] 在一些实施方案中，所述ActRIIB-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置138处的谷氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置217处的天冬氨酸。在一些实施方案中，所述ALK4-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位

置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸、在氨基酸位置162处的精氨酸、在氨基酸位置179处的精氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。在一些实施方案中，所述ALK7-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸、在氨基酸位置162处的精氨酸、在氨基酸位置179处的精氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

[0528] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK4异多聚体多肽，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0529] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK7异多聚体多肽，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0530] 另一个例子涉及与工程化的二硫键组合的基于杵臼结构配对的Fc结构域的互补性，如SEQ ID NO:22-23中所公开，加上在一个含Fc多肽链(SEQ ID NO:30)中位置213处的组氨酸至精氨酸取代。该取代(在Kabat等人的编号系统中表示H435R)促进基于对蛋白A的亲和力的差异将所需异二聚体与不期望的同二聚体分离。工程化的氨基酸取代由双下划线指示，并且构建体的ActRIIB多肽、ActRIIA多肽、ALK4多肽或ALK7多肽可以与SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:23融合，但不会与二者同时融合。鉴于天然hG1Fc、天然hG2Fc、天然hG3Fc与天然hG4Fc之间的高度氨基酸序列同一性，可以了解，在hG2Fc、hG3Fc或hG4Fc中的对应位置处的氨基酸取代(参见图7)将生成互补Fc对，所述互补Fc对可以代替SEQ ID NO:30(下文)和SEQ ID NO:23的互补hG1Fc对来使用。

[0531]
```
  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 HNRYTQKSLS LSPGK    (SEQ ID NO: 30)
```

[0532] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK4异多聚体多肽，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0533] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK7异多聚体多肽，其中所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％

或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0534] 在一些实施方案中，所述ActRIIB-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置435处的精氨酸。在一些实施方案中，所述ALK4-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。在一些实施方案中，所述ALK7-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

[0535] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK4异多聚体多肽，其中所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0536] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK7异多聚体多肽，其中所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0537] 在一些实施方案中，所述ActRIIA-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置138处的谷氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置217处的天冬氨酸。在一些实施方案中，所述ALK4-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸、在氨基酸位置162处的精氨酸、在氨基酸位置179处的精氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。在一些实施方案中，所述ALK7-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸、在氨基酸位置162处的精氨酸、在氨基酸位置179处的精氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

[0538] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK4异多聚体多肽，其中所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0539] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIB-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIB:ALK7异多聚体多肽，其中所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ActRIIB-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列

至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0540] 在一些实施方案中，所述ALK4-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置138处的谷氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置217处的天冬氨酸。在一些实施方案中，所述ActRIIB-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸、在氨基酸位置162处的精氨酸、在氨基酸位置179处的精氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。在一些实施方案中，所述ALK7-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置138处的谷氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置217处的天冬氨酸。在一些实施方案中，所述ActRIIB-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸、在氨基酸位置162处的精氨酸、在氨基酸位置179处的精氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

[0541] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK4异多聚体多肽，其中所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0542] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK7异多聚体多肽，其中所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0543] 在一些实施方案中，所述ALK4-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置138处的谷氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置217处的天冬氨酸。在一些实施方案中，所述ActRIIA-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸、在氨基酸位置162处的精氨酸、在氨基酸位置179处的精氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。在一些实施方案中，所述ALK7-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置138处的谷氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置217处的天冬氨酸。在一些实施方案中，所述ActRIIA-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸、在氨基酸位置162处的精氨酸、在氨基酸位置179处的精氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

[0544] 在一些实施方案中，所述ALK4-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置435处的精氨酸。在一些实施方案中，所述ALK7-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置435处的精氨酸。在一些实施方案中，所述ActRIIB-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸

位置146处的丙氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

[0545] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK4异多聚体多肽，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0546] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK7异多聚体多肽，其中所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ALK7-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0547] 在一些实施方案中，所述ActRIIA-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置435处的精氨酸。在一些实施方案中，所述ALK4-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。在一些实施方案中，所述ALK7-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

[0548] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK4异多聚体多肽，其中所述ALK4-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0549] 在一些实施方案中，本公开文本涉及包含ActRIIA-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽的ActRIIA:ALK7异多聚体多肽，其中所述ALK7-Fc融合多肽包含的氨基酸序列与SEQ ID NO:30至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域，并且所述ActRIIA-Fc融合多肽包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的Fc结构域。

[0550] 在一些实施方案中，所述ALK4-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置435处的精氨酸。在一些实施方案中，所述ALK7-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置132处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的色氨酸以及在氨基酸位置435处的精氨酸。在一些实施方案中，所述ActRIIA-Fc融合多肽Fc结构域包含在氨基酸位置127处的半胱氨酸、在氨基酸位置144处的丝氨酸、在氨基酸位置146处的丙氨酸以及在氨基酸位置185处的缬氨酸。

[0551] 在某些实施方案中，本公开文本涉及一种包含第一变体ActRIIB-Fc融合多肽和第二变体ActRIIB-Fc融合多肽的异多聚体，其中所述第一变体ActRIIB多肽不含所述第二变

体ActRIIB多肽的氨基酸序列。在一些实施方案中,ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc异多聚体与一种或多种ActRII-ALK4配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)结合。在一些实施方案中,ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc异多聚体抑制一种或多种ActRII-ALK4配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)的信号传导。在一些实施方案中,ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc异多聚体是异二聚体。

[0552] 在一些实施方案中,所述第一ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82、L79、A24、K74、R64、P129、P130、E37、R40、D54、R56、W78、D80以及F82中的任一个的氨基酸位置处的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中,所述第一ActRIIB多肽包含在对应于以下中的任一个的氨基酸位置处的一个或多个氨基酸取代:SEQ ID NO:2的L38N、E50L、E52N、L57E、L57I、L57R、L57T、L57V、Y60D、G68R、K74E、W78Y、L79F、L79S、L79T、L79W、F82D、F82E、F82L、F82S、F82T、F82Y、N83R、E94K和V99G。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代选自:A24N、K74A、R64K、R64N、K74A、L79A、L79D、L79E、L79P、P129S、P130A、P130R、E37A、R40A、D54A、R56A、K74F、K74I、K74Y、W78A、D80A、D80F、D80G、D80I、D80K、D80M、D80M、D80N、D80R和F82A。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代选自:L38N、E50L、E52N、L57E、L57I、L57R、L57T、L57V、Y60D、G68R、K74E、W78Y、L79F、L79S、L79T、L79W、F82D、F82E、F82L、F82S、F82T、F82Y、N83R、E94K和V99G。在一些实施方案中,所述第二ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82、L79、A24、K74、R64、P129、P130、E37、R40、D54、R56、W78、D80以及F82中的任一个的氨基酸位置处的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代选自:A24N、K74A、R64K、R64N、K74A、L79A、L79D、L79E、L79P、P129S、P130A、P130R、E37A、R40A、D54A、R56A、K74F、K74I、K74Y、W78A、D80A、D80F、D80G、D80I、D80K、D80M、D80M、D80N、D80R和F82A。在一些实施方案中,所述第二ActRIIB多肽包含在对应于以下中的任一个的氨基酸位置处的一个或多个氨基酸取代:SEQ ID NO:2的L38N、E50L、E52N、L57E、L57I、L57R、L57T、L57V、Y60D、G68R、K74E、W78Y、L79F、L79S、L79T、L79W、F82D、F82E、F82L、F82S、F82T、F82Y、N83R、E94K和V99G。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代选自:L38N、E50L、E52N、L57E、L57I、L57R、L57T、L57V、Y60D、G68R、K74E、W78Y、L79F、L79S、L79T、L79W、F82D、F82E、F82L、F82S、F82T、F82Y、N83R、E94K和V99G。在一些实施方案中,所述第一ActRIIB多肽和/或所述第二ActRIIB多肽包含促进异多聚体形成的一个或多个氨基酸修饰。在一些实施方案中,所述第一ActRIIB多肽和/或所述第二ActRIIB多肽包含抑制异多聚体形成的一个或多个氨基酸修饰。在一些实施方案中,所述异多聚体是异二聚体。

[0553] 在某些方面,本公开文本涉及一种异多聚体,所述异多聚体包含与SEQ ID NO:36的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的第一ActRIIB多肽以及与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的第二ActRIIB多肽,其中所述第一ActRIIB多肽不包含所述第二ActRIIB多肽的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述第一ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的55的氨基酸位置处的谷氨酸。在一些实施方案中,所述第二ActRIIB多肽不包含在对应于SEQ ID NO:2的55的氨基酸位置处的谷氨酸。在一些实施方案中,所述第二ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的55的氨基酸位置处的赖氨酸。在一些实施方案中,所述第一ActRIIB多肽包含在对应于以下中的任一个的氨基酸位置处的一个或多个氨基酸取代:SEQ ID NO:2的F82、L79、A24、

K74、R64、P129、P130、E37、R40、D54、R56、W78和D80。在一些实施方案中，所述一个或多个氨基酸取代选自：A24N、K74A、R64K、R64N、K74A、L79A、L79D、L79E、L79P、P129S、P130A、P130R、E37A、R40A、D54A、R56A、K74F、K74I、K74Y、W78A、D80A、D80F、D80G、D80I、D80K、D80M、D80M、D80N、D80R和F82A。在一些实施方案中，所述第二ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的F82、L79、A24、K74、R64、P129、P130、E37、R40、D54、R56、W78、D80以及F82中的任一个的氨基酸位置处的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方案中，所述一个或多个氨基酸取代选自：A24N、K74A、R64K、R64N、K74A、L79A、L79D、L79E、L79P、P129S、P130A、P130R、E37A、R40A、D54A、R56A、K74F、K74I、K74Y、W78A、D80A、D80F、D80G、D80I、D80K、D80M、D80M、D80N、D80R和F82A。在一些实施方案中，所述第一ActRIIB多肽和/或所述第二ActRIIB多肽包含促进异多聚体形成的一个或多个氨基酸修饰。在一些实施方案中，所述第一ActRIIB多肽和/或所述第二ActRIIB多肽包含抑制异多聚体形成的一个或多个氨基酸修饰。在一些实施方案中，所述异多聚体是异二聚体。

[0554] 在某些方面，本公开文本涉及一种异多聚体，所述异多聚体包含与SEQ ID NO:39的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的第一ActRIIB多肽以及与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的第二ActRIIB多肽，其中所述第一ActRIIB多肽不包含所述第二ActRIIB多肽的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述第一ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的82的氨基酸位置处的异亮氨酸。在一些实施方案中，所述第二ActRIIB多肽不包含在对应于SEQ ID NO:2的82的氨基酸位置处的异亮氨酸。在一些实施方案中，所述第二ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的82的氨基酸位置处的苯丙氨酸。在一些实施方案中，所述第一ActRIIB多肽包含在对应于以下中的任一个的氨基酸位置处的一个或多个氨基酸取代：SEQ ID NO:2的L79、A24、K74、R64、P129、P130、E37、R40、D54、R56、W78以及D80。在一些实施方案中，所述一个或多个氨基酸取代选自：A24N、K74A、R64K、R64N、K74A、L79A、L79D、L79E、L79P、P129S、P130A、P130R、E37A、R40A、D54A、R56A、K74F、K74I、K74Y、W78A、D80A、D80F、D80G、D80I、D80K、D80M、D80M、D80N和D80R。在一些实施方案中，所述第二ActRIIB多肽包含在对应于以下中的任一个的氨基酸位置处的一个或多个氨基酸取代：SEQ ID NO:2的L79、A24、K74、R64、P129、P130、E37、R40、D54、R56、W78以及D80。在一些实施方案中，所述一个或多个氨基酸取代选自：A24N、K74A、R64K、R64N、K74A、L79A、L79D、L79E、L79P、P129S、P130A、P130R、E37A、R40A、D54A、R56A、K74F、K74I、K74Y、W78A、D80A、D80F、D80G、D80I、D80K、D80M、D80M、D80N和D80R。在一些实施方案中，所述第一ActRIIB多肽和/或所述第二ActRIIB多肽包含促进异多聚体形成的一个或多个氨基酸修饰。在一些实施方案中，所述第一ActRIIB多肽和/或所述第二ActRIIB多肽包含抑制异多聚体形成的一个或多个氨基酸修饰。在一些实施方案中，所述异多聚体是异二聚体。

[0555] 在某些方面，本公开文本涉及一种异多聚体，所述异多聚体包含与SEQ ID NO:42的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的第一ActRIIB多肽以及与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的第二ActRIIB多肽，其中所述第一ActRIIB多肽不包含所述第二ActRIIB多肽的氨基酸序列。在一

些实施方案中,所述第一ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的82的氨基酸位置处的赖氨酸。在一些实施方案中,所述第二ActRIIB多肽不包含在对应于SEQ ID NO:2的82的氨基酸位置处的赖氨酸。在一些实施方案中,所述第二ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的82的氨基酸位置处的苯丙氨酸。在一些实施方案中,所述第一ActRIIB多肽包含在对应于以下中的任一个的氨基酸位置处的一个或多个氨基酸取代:SEQ ID NO:2的L79、A24、K74、R64、P129、P130、E37、R40、D54、R56、W78以及D80。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代选自:A24N、K74A、R64K、R64N、K74A、L79A、L79D、L79E、L79P、P129S、P130A、P130R、E37A、R40A、D54A、R56A、K74F、K74I、K74Y、W78A、D80A、D80F、D80G、D80I、D80K、D80M、D80M、D80N和D80R。在一些实施方案中,所述第二ActRIIB多肽包含在对应于以下中的任一个的氨基酸位置处的一个或多个氨基酸取代:SEQ ID NO:2的L79、A24、K74、R64、P129、P130、E37、R40、D54、R56、W78以及D80。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代选自:A24N、K74A、R64K、R64N、K74A、L79A、L79D、L79E、L79P、P129S、P130A、P130R、E37A、R40A、D54A、R56A、K74F、K74I、K74Y、W78A、D80A、D80F、D80G、D80I、D80K、D80M、D80M、D80N和D80R。在一些实施方案中,所述第一ActRIIB多肽和/或所述第二ActRIIB多肽包含促进异多聚体形成的一个或多个氨基酸修饰。在一些实施方案中,所述第一ActRIIB多肽和/或所述第二ActRIIB多肽包含抑制异多聚体形成的一个或多个氨基酸修饰。在一些实施方案中,所述异多聚体是异二聚体。

[0556] 在某些方面,本公开文本涉及一种异多聚体,所述异多聚体包含与SEQ ID NO:45的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的第一ActRIIB多肽以及与SEQ ID NO:48的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的第二ActRIIB多肽,其中所述第一ActRIIB多肽不包含所述第二ActRIIB多肽的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述第一ActRIIB多肽包含对应于SEQ ID NO:2的79的酸性氨基酸位置。在一些实施方案中,所述酸性氨基酸是天冬氨酸。在一些实施方案中,所述酸性氨基酸是谷氨酸。在一些实施方案中,所述第二ActRIIB多肽不包含在对应于SEQ ID NO:2的79的氨基酸位置处的酸性酸(例如,天冬氨酸或谷氨酸)。在一些实施方案中,所述第二ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的79的氨基酸位置处的亮氨酸。在一些实施方案中,所述第一ActRIIB多肽包含在对应于以下中的任一个的氨基酸位置处的一个或多个氨基酸取代:SEQ ID NO:2的F82、A24、K74、R64、P129、P130、E37、R40、D54、R56、W78、D80和F82。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代选自:A24N、K74A、R64K、R64N、K74A、L79P、P129S、P130A、P130R、E37A、R40A、D54A、R56A、K74F、K74I、K74Y、W78A、D80A、D80F、D80G、D80I、D80K、D80M、D80M、D80N、D80R和F82A。在一些实施方案中,所述第二ActRIIB多肽包含在对应于以下中的任一个的氨基酸位置处的一个或多个氨基酸取代:SEQ ID NO:2的F82、A24、K74、R64、P129、P130、E37、R40、D54、R56、W78、D80以及F82。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代选自:A24N、K74A、R64K、R64N、K74A、P129S、P130A、P130R、E37A、R40A、D54A、R56A、K74F、K74I、K74Y、W78A、D80A、D80F、D80G、D80I、D80K、D80M、D80M、D80N、D80R和F82A。在一些实施方案中,所述第一ActRIIB多肽和/或所述第二ActRIIB多肽包含促进异多聚体形成的一个或多个氨基酸修饰。在一些实施方案中,所述第一ActRIIB多肽和/或所述第二ActRIIB多肽包含抑制异多聚体形成的一个或多个氨基酸修饰。在一些实施方案中,所述异多聚体是异

二聚体。

[0557] 在某些方面,本公开文本涉及一种异多聚体,所述异多聚体包含与SEQ ID NO:50的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的第一ActRIIB多肽以及与SEQ ID NO:52的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的第二ActRIIB多肽,其中所述第一ActRIIB多肽不包含所述第二ActRIIB多肽的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述第一ActRIIB多肽包含对应于SEQ ID NO:2的79的酸性氨基酸位置。在一些实施方案中,所述酸性氨基酸是天冬氨酸。在一些实施方案中,所述酸性氨基酸是谷氨酸。在一些实施方案中,所述第二ActRIIB多肽不包含在对应于SEQ ID NO:2的79的氨基酸位置处的酸性酸(例如,天冬氨酸或谷氨酸)。在一些实施方案中,所述第二ActRIIB多肽包含在对应于SEQ ID NO:2的79的氨基酸位置处的亮氨酸。在一些实施方案中,所述第一ActRIIB多肽包含在对应于以下中的任一个的氨基酸位置处的一个或多个氨基酸取代:SEQ ID NO:2的F82、A24、K74、R64、P129、P130、E37、R40、D54、R56、W78、D80和F82。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代选自:A24N、K74A、R64K、R64N、K74A、L79P、P129S、P130A、P130R、E37A、R40A、D54A、R56A、K74F、K74I、K74Y、W78A、D80A、D80F、D80G、D80I、D80K、D80M、D80M、D80N、D80R和F82A。在一些实施方案中,所述第二ActRIIB多肽包含在对应于以下中的任一个的氨基酸位置处的一个或多个氨基酸取代:SEQ ID NO:2的F82、A24、K74、R64、P129、P130、E37、R40、D54、R56、W78、D80以及F82。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代选自:A24N、K74A、R64K、R64N、K74A、P129S、P130A、P130R、E37A、R40A、D54A、R56A、K74F、K74I、K74Y、W78A、D80A、D80F、D80G、D80I、D80K、D80M、D80M、D80N、D80R和F82A。

[0558] 在某些方面,本公开文本涉及异多聚体,所述异多聚体包含一种或多种ALK4受体多肽(例如,SEQ ID No:84、85、86、87、88、89、92、93、247、249、421、422及其变体)和一种或多种ActRIIB受体多肽(例如,SEQ ID NO:1、2、5、6、12、31、33、34、36、37、39、40、42、43、45、46、48、49、50、51、52、53、276、278、279、332、333、335、336、338、339、341、342、344、345、347、348、350、351、353、354、356、357、385、386、387、388、389、396、398、402、403、406、408、409及其变体),包括其用途(例如治疗有需要的患者的心力衰竭),所述异多聚体在本文中通常称为“ActRIIB:ALK4异多聚体”或“ActRIIB-ALK4异多聚体”,包括其用途(例如,治疗有需要的患者的心力衰竭)。优选地,ActRIIB:ALK4异多聚体是可溶的[例如,异多聚体复合物包含ALK4受体的可溶部分(结构域)和ActRIIB受体的可溶部分(结构域)]。通常,ALK4和ActRIIB的细胞外结构域对应于这些受体的可溶部分。因此,在一些实施方案中,ActRIIB:ALK4异多聚体包含ALK4受体的细胞外结构域和ActRIIB受体的细胞外结构域。在一些实施方案中,ActRIIB:ALK4异多聚体抑制一种或多种ActRII-ALK4配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)的(例如,Smad信号传导)。在一些实施方案中,ActRIIB:ALK4异多聚体与一种或多种ActRII-ALK4配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)结合。在一些实施方案中,ActRIIB:ALK4异多聚体包含至少一种ALK4多肽,所述至少一种ALK4多肽包含与SEQ ID NO:84、85、86、87、88、89、92、93、247、249、421和422的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%相同的序列,基本上由其组成或由其组成。在一些实施方案中,本公开文本的ActRIIB:ALK4异多聚体复合物包含至少一种ALK4多肽,所述至少一种ALK4多肽包含与

在对应于SEQ ID NO:84的氨基酸24-34、25-34或26-34中任一个的残基处开始并且在来自SEQ ID NO:84的101-126、102-126、101-125、101-124、101-121、111-126、111-125、111-124、121-126、121-125、121-124或124-126的位置处结束的ALK4的一部分至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的序列，基本上由其组成，由其组成。在一些实施方案中，ActRIIB:ALK4异多聚体包含至少一种ALK4多肽，所述至少一种ALK4多肽包含与关于SEQ ID NO:84的氨基酸34-101至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的序列，基本上由其组成，由其组成。在一些实施方案中，ActRIIB-ALK4异多聚体包含至少一种ActRIIB多肽，所述至少一种ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:2、5、6、12、31、33、34、36、37、39、40、42、43、45、46、48、49、50、51、52、53、276、278、279、332、333、335、336、338、339、341、342、344、345、347、348、350、351、353、354、356、357、385、386、387、388、389、396、398、402、403、406、408和409中任一个的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的序列，基本上由其组成，由其组成。在一些实施方案中，本公开文本的ActRIIB:ALK4异多聚体复合物包含至少一种ActRIIB多肽，所述至少一种ActRIIB多肽包含与在对应于SEQ ID NO:2的氨基酸20-29、20-24、21-24、22-25或21-29中任一个的残基处开始并且在来自109-134、119-134、119-133、129-134或129-133的位置处结束的ActRIIB的一部分至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的序列，基本上由其组成，由其组成。在一些实施方案中，ActRIIB:ALK4异多聚体包含至少一种ActRIIB多肽，所述至少一种ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:2的氨基酸29-109至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的序列，基本上由其组成，由其组成。在一些实施方案中，ActRIIB:ALK4异多聚体包含至少一种ActRIIB多肽，所述至少一种ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:2的氨基酸25-131至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的序列，基本上由其组成，由其组成。在某些实施方案中，本公开文本的ActRIIB:ALK4异多聚体复合物包含至少一种ActRIIB多肽，其中对应于SEQ ID NO:2的L79的位置不是酸性氨基酸(即，不是天然存在的D或E氨基酸残基或人工酸性氨基酸残基)。本公开文本的ActRIIB:ALK4异多聚体包括例如异二聚体、异三聚体、异四聚体和进一步更高阶的寡聚结构。参见例如，图11-图13，其也可以应用于ActRII:ALK7寡聚结构。在某些优选实施方案中，本公开文本的异多聚体复合物是ActRIIB:ALK7异二聚体。

[0559] 在某些实施方案中，本公开文本涉及一种包含至少一种ALK7-Fc融合多肽和至少一种ActRIIB-Fc融合多肽的异多聚体。在一些实施方案中，ActRIIB-Fc:ALK7-Fc异多聚体与一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)结合。在一些实施方案中，ActRIIB-Fc:ALK7-Fc异多聚体抑制一种或多种ActRII-ALK4(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)的信号传导。在一些实施方案中，ActRIIB-Fc:ALK7-Fc异多聚体是异二聚体。

[0560] 在某些实施方案中，本公开文本涉及包含至少一种ALK7多肽的异多聚体，所述至少一种ALK7多肽包括其片段、功能变体和修饰形式。优选地，用于如本文所公开使用的ALK7

多肽(例如,包含ALK7多肽的异多聚体及其用途)是可溶的(例如,ALK7的细胞外结构域)。在其他优选实施方案中,用于如本文所公开使用的ALK7多肽结合至和/或抑制(拮抗)一种或多种ActRII-ALK4配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)超家族配体的活性(例如,诱导Smad信号传导)。在一些实施方案中,所述ALK7-Fc融合多肽包含ALK7结构域,所述ALK7结构域包含与在SEQ ID NO:120、121或122的氨基酸21-28中的任一个(例如,氨基酸残基21、22、23、24、25、26、27和28)处开始,并且在SEQ ID NO:120、121或122的氨基酸92-113中的任一个(例如,氨基酸残基92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112和113)处结束的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述ALK7-Fc融合多肽包含ALK7结构域,所述ALK7结构域包含与SEQ ID NO:120、121或122的氨基酸28-92至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述ALK7-Fc融合多肽包含ALK7结构域,所述ALK7结构域包含与SEQ ID NO:120、121或122的氨基酸21-113至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述ALK7-Fc融合多肽包含ALK7结构域,所述ALK7结构域包含与SEQ ID No:120、123、124、125、121、126、122、127、128、129、130、131、132、133或134的中任一个的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开文本的异多聚体由与SEQ IDNO:120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、133或134的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的至少一种ALK7多肽组成或基本上由其组成。

[0561] 在某些方面,本公开文本涉及异多聚体复合物,所述异多聚体复合物包含一种或多种ALK7受体多肽(例如,SEQ ID No:120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、133、134及其变体)和一种或多种ActRIIB受体多肽(例如,SEQ ID NO:1、2、5、6、12、31、33、34、36、37、39、40、42、43、45、46、48、49、50、51、52、53、276、278、279、332、333、335、336、338、339、341、342、344、345、347、348、350、351、353、354、356、357、385、386、387、388、389、396、398、402、403、406、408、409及其变体),所述异多聚体复合物在本文中通常称为“ActRIIB:ALK7异多聚体”或“ActRIIB-ALK7异多聚体”,包括其用途(例如,治疗有需要的患者的心力衰竭)。优选地,ActRIIB-ALK7异多聚体是可溶的[例如,异多聚体复合物包含ALK7受体的的可溶部分(结构域)和ActRIIB受体的可溶部分(结构域)]。通常,ALK7和ActRIIB的细胞外结构域对应于这些受体的可溶部分。因此,在一些实施方案中,ActRIIB-ALK7异多聚体包含ALK7受体的细胞外结构域和ActRIIB受体的细胞外结构域。在一些实施方案中,ActRIIB-ALK7异多聚体抑制一种或多种ActRII-ALK4配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)的(例如,Smad信号传导)。在一些实施方案中,ActRIIB-ALK7异多聚体与一种或多种ActRII-ALK4配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)结合。在一些实施方案中,ActRIIB-ALK7异多聚体包含至少一种ALK7多肽,所述至少一种ALK7多肽包含与SEQ ID NO:120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、133和134的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、

97％、98％、99％或100％相同的序列，基本上由其组成，或由其组成。在一些实施方案中，ActRIIB-ALK7异多聚体包含至少一种ActRIIB多肽，所述至少一种ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:2、5、6、12、31、33、34、36、37、39、40、42、43、45、46、48、49、50、51、52、53、276、278、279、332、333、335、336、338、339、341、342、344、345、347、348、350、351、353、354、356、357、385、386、387、388、389、396、398、402、403、406、408和409中任一个的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的序列，基本上由其组成，由其组成。在一些实施方案中，本公开文本的ActRIIB-ALK7异多聚体复合物包含至少一种ActRIIB多肽，所述至少一种ActRIIB多肽包含与在对应于SEQ ID NO:2的氨基酸20-29、20-24、21-24、22-25或21-29中任一个的残基处开始并且在来自109-134、119-134、119-133、129-134或129-133的位置处结束的ActRIIB的一部分至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的序列，基本上由其组成，由其组成。在一些实施方案中，ActRIIB-ALK7异多聚体包含至少一种ActRIIB多肽，所述至少一种ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:2的氨基酸29-109至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的序列，基本上由其组成，由其组成。在一些实施方案中，ActRIIB-ALK7异多聚体包含至少一种ActRIIB多肽，所述至少一种ActRIIB多肽包含与SEQ ID NO:2的氨基酸25-131至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的序列，基本上由其组成，由其组成。在某些实施方案中，本公开文本的ActRIIB-ALK7异多聚体复合物包含至少一种ActRIIB多肽，其中对应于SEQ ID NO:2的L79的位置不是酸性氨基酸(即，不是天然存在的D或E氨基酸残基或人工酸性氨基酸残基)。本公开文本的ActRIIB-ALK7异多聚体包括例如异二聚体、异三聚体、异四聚体和进一步更高阶的寡聚结构。参见例如，图11-图13，其也可以应用于ActRII-ALK4和ActRII-ALK7寡聚结构二者。在某些优选实施方案中，本公开文本的异多聚体复合物是ActRIIB-ALK7异二聚体。

[0562] 在某些方面，本公开文本涉及异多聚体复合物，所述异多聚体复合物包含一种或多种ALK7受体多肽(例如，SEQ ID No:120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、133、134及其变体)和一种或多种ActRIIA受体多肽(例如，SEQ ID NO:364、366、367、368、369、378、380、381、384及其变体)，所述异多聚体复合物在本文中通常称为“ActRIIA:ALK7异多聚体”或“ActRIIA-ALK7异多聚体”，包括其用途(例如，治疗有需要的患者的心力衰竭)。优选地，ActRIIA-ALK7异多聚体是可溶的[例如，异多聚体复合物包含ALK7受体的可溶部分(结构域)和ActRIIA受体的可溶部分(结构域)]。通常，ALK7和ActRIIA的细胞外结构域对应于这些受体的可溶部分。因此，在一些实施方案中，ActRIIA-ALK7异多聚体包含ALK7受体的细胞外结构域和ActRIIA受体的细胞外结构域。在一些实施方案中，ActRIIA-ALK7异多聚体抑制一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)的(例如，Smad信号传导)。在一些实施方案中，ActRIIA-ALK7异多聚体与一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)结合。在一些实施方案中，ActRIIA-ALK7异多聚体包含至少一种ALK7多肽，所述至少一种ALK7多肽包含与SEQ ID NO:120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、133和134的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、

98％、99％或100％相同的序列，基本上由其组成，或由其组成。在一些实施方案中，ActRIIA-ALK7异多聚体包含至少一种ActRIIA多肽，所述至少一种ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:364、366、367、368、369、378、380、381、384中任一个的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的序列，基本上由其组成，由其组成。在某些优选实施方案中，本公开文本的异多聚体复合物是ActRIIA-ALK7异二聚体。

[0563] 在某些方面，本公开文本涉及异多聚体复合物，所述异多聚体复合物包含一种或多种ALK4受体多肽(例如，SEQ ID No:84、85、86、87、88、89、92、93、247、249、421、422及其变体)和一种或多种ActRIIA受体多肽(例如，SEQ ID NO:364、366、367、368、369、378、380、381、384及其变体)，所述异多聚体复合物在本文中通常称为“ActRIIA:ALK4异多聚体”或“ActRIIA-ALK4异多聚体”，包括其用途(例如，治疗有需要的患者的心力衰竭)。优选地，ActRIIA-ALK4异多聚体是可溶的[例如，异多聚体复合物包含ALK4受体的可溶部分(结构域)和ActRIIA受体的可溶部分(结构域)]。通常，ALK4和ActRIIA的细胞外结构域对应于这些受体的可溶部分。因此，在一些实施方案中，ActRIIA-ALK4异多聚体包含ALK4受体的细胞外结构域和ActRIIA受体的细胞外结构域。在一些实施方案中，ActRIIA-ALK4异多聚体抑制一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)的(例如，Smad信号传导)。在一些实施方案中，ActRIIA-ALK4异多聚体与一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)结合。在一些实施方案中，ActRIIA-ALK4异多聚体包含至少一种ALK4多肽，所述至少一种ALK4多肽包含与SEQ ID NO:84、85、86、87、88、89、92、93、247、249、421和422的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的序列，基本上由其组成，或由其组成。在一些实施方案中，本公开文本的ActRIIA-ALK4异多聚体复合物包含至少一种ALK4多肽，所述至少一种ALK4多肽包含与在对应于SEQ ID NO:84的氨基酸24-34、25-34或26-34中任一个的残基处开始并且在来自SEQ ID NO:84的101-126、102-126、101-125、101-124、101-121、111-126、111-125、111-124、121-126、121-125、121-124或124-126的位置处结束的ALK4的一部分至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的序列，基本上由其组成，由其组成。在一些实施方案中，ActRIIA-ALK4异多聚体包含至少一种ALK4多肽，所述至少一种ALK4多肽包含与关于SEQ ID NO:84的氨基酸34-101至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的序列，基本上由其组成，由其组成。在一些实施方案中，ActRIIA-ALK4异多聚体包含至少一种ActRIIA多肽，所述至少一种ActRIIA多肽包含与SEQ ID NO:364、366、367、368、369、378、380、381、384中任一个的氨基酸序列至少70％、75％、80％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、97％、98％、99％或100％相同的序列，基本上由其组成，由其组成。在某些优选实施方案中，本公开文本的异多聚体复合物是ActRIIA-ALK4异二聚体。

[0564] 在某些实施方案中，本公开文本涉及一种包含第一ActRIIA-Fc融合多肽和第二ActRIIA-Fc融合多肽的异多聚体，其中所述第二变体ActRIIA-Fc融合多肽与所述第一多肽中存在者不同。在一些实施方案中，ActRIIA-Fc:ActRIIA-Fc异多聚体与一种或多种

ActRII-ALK4配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)结合。在一些实施方案中,ActRIIA-Fc:ActRIIA-Fc异多聚体抑制一种或多种ActRII-ALK4配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)的信号传导。在一些实施方案中,ActRIIA-Fc:ActRIIA-Fc异多聚体是异二聚体。

[0565] II.接头

[0566] 本公开文本提供一种ActRII-ALK4配体陷阱多肽(例如,ActRIIB、ActRIIA、ALK4、ALK7和卵泡抑制素多肽,包括其变体),所述ActRII-ALK4配体陷阱多肽可以与本文公开的另外的多肽融合,包括例如与异源部分(例如,Fc部分)融合。在这些实施方案中,多肽部分(例如,ActRIIB、ActRIIA、ALK4、ALK7和卵泡抑制素多肽,包括其变体)借助接头与另外的多肽(例如,异源部分,如Fc结构域)连接。在一些实施方案中,所述接头是富含甘氨酸和丝氨酸的接头。在一些实施方案中,所述接头可以富含甘氨酸(例如,2-10、2-5、2-4、2-3个甘氨酸残基)或者甘氨酸和脯氨酸残基,并且可以例如含有苏氨酸/丝氨酸和甘氨酸的单一序列或者苏氨酸/丝氨酸和/或甘氨酸的重复序列,例如,GGG(SEQ ID NO:261)、GGGG(SEQ ID NO:262)、TGGGG(SEQ ID NO:263)、SGGGG(SEQ ID NO:264)、TGGG(SEQ ID NO:265)或SGGG(SEQ ID NO:266)单序列或重复序列。其他接近中性的氨基酸(例如但不限于Thr、Asn、Pro和Ala)也可以用于接头序列中。在一些实施方案中,所述接头包含含有Gly和Ser的氨基酸序列的各种排列。在一些实施方案中,所述接头的长度大于10个氨基酸。在其他实施方案中,所述接头具有至少12、15、20、21、25、30、35、40、45或50个氨基酸的长度。在一些实施方案中,所述接头小于40、35、30、25、22或20个氨基酸。在一些实施方案中,所述接头的长度为10-50、10-40、10-30、10-25、10-21、10-15、10、15-25、17-22、20或21个氨基酸。在优选实施方案中,所述接头包含氨基酸序列GlyGlyGlyGlySer(GGGGS)(SEQ ID NO:267)或其重复序列(GGGGS)n,其中n≥2。在特定实施方案中,n≥3,或者n=3-10。在一些实施方案中,n≥4,或者n=4-10。在一些实施方案中,在(GGGGS)n接头中,n不大于4。在一些实施方案中,n=4-10、4-9、4-8、4-7、4-6、4-5、5-8、5-7或5-6。在一些实施方案中,n=3、4、5、6或7。在特定实施方案中,n=4。在一些实施方案中,包含(GGGGS)n序列的接头还包含N末端苏氨酸。在一些实施方案中,所述接头是以下中的任一个:

[0567] GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:268)

[0568] TGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:269)

[0569] TGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:270)

[0570] TGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:271)

[0571] TGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:272)

[0572] TGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:273)或

[0573] TGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:274)。

[0574] 在一些实施方案中,所述接头包含TGGGPKSCDK(SEQ ID NO:275)的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述接头是缺少N末端苏氨酸的SEQ ID NO:268-275中的任一个。在一些实施方案中,所述接头不包含SEQ ID NO:273或274的氨基酸序列。

[0575] 在一些实施方案中,本文所述的多肽(例如,ActRIIB、ActRIIA、ALK4、ALK7和卵泡抑制素,多肽,包括其变体)可以包括借助接头与部分融合的多肽。在一些实施方案中,所述部分增加所述多肽的稳定性。在一些实施方案中,所述部分选自Fc结构域单体、野生型Fc结

构域、具有氨基酸取代(例如,减少二聚化的一个或多个取代)的Fc结构域、白蛋白结合肽、纤连蛋白结构域或人血清白蛋白。合适的肽接头是本领域中已知的,并且包括例如含有柔性氨基酸残基(如甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸)的肽接头。在一些实施方案中,接头可以含有以下的基序(例如,多个或重复基序):GA、GS、GG、GGA、GGS、GGG(SEQ ID NO:261)、GGGA(SEQ ID NO:280)、GGGS(SEQ ID NO:281)、GGGG(SEQ ID NO:262)、GGGGA(SEQ ID NO:282)、GGGGS(SEQ ID NO:267)、GGGGG(SEQ ID NO:283)、GGAG(SEQ ID NO:284)、GGSG(SEQ ID NO:285)、AGGG(SEQ ID NO:286)或SGGG(SEQ ID NO:266)。在一些实施方案中,接头可以含有GA或GS的2至12个氨基酸(包括基序),例如,GA、GS、GAGA(SEQ ID NO:287)、GSGS(SEQ ID NO:288)、GAGAGA(SEQ ID NO:289)、GSGSGS(SEQ ID NO:290)、GAGAGAGA(SEQ ID NO:291)、GSGSGSGS(SEQ ID NO:292)、GAGAGAGAGA(SEQ ID NO:293)、GSGSGSGSGS(SEQ ID NO:294)、GAGAGAGAGAGA(SEQ IDNO:295)和GSGSGSGSGSGS(SEQ ID NO:296)。在一些实施方案中,接头可以含有GGA或GGS的3至12个氨基酸(包括基序),例如,GGA、GGS、GGAGGA(SEQ ID NO:297)、GGSGGS(SEQ ID NO:298)、GGAGGAGGA(SEQ ID NO:299)、GGSGGSGGS(SEQ ID NO:300)、GGAGGAGGAGGA(SEQ ID NO:301)和GGSGGSGGSGGS(SEQ ID NO:302)。在一些实施方案中,接头可以含有以下的4至12个氨基酸(包括基序):GGAG(SEQ ID NO:303)、GGSG(SEQ ID NO:304)、GGAGGGAG(SEQ ID NO:305)、GGSGGGSG(SEQ ID NO:306)、GGAGGGAGGGAG(SEQ ID NO:307)和GGSGGGSGGGSG(SEQ ID NO:308)。在一些实施方案中,接头可以含有以下的基序:GGGGA(SEQ ID NO:309)或GGGGS(SEQ ID NO:267),例如,GGGGAGGGGAGGGGA(SEQ ID NO:310)和GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:311)。在一些实施方案中,部分(例如,Fc结构域单体、野生型Fc结构域、具有氨基酸取代(例如,减少二聚化的一个或多个取代)的Fc结构域、白蛋白结合肽、纤连蛋白结构域或人血清白蛋白)与多肽(例如,ActRIIB、ActRIIA、ALK4、ALK7和卵泡抑制素多肽,包括其变体)之间的氨基酸接头可以是GGG、GGGA(SEQ ID NO:280)、GGGG(SEQ ID NO:262)、GGGAG(SEQ ID NO:312)、GGGAGG(SEQ ID NO:313)或GGGAGGG(SEQ ID NO:314)。

[0576] 在一些实施方案中,接头还可以含有除了甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸以外的氨基酸,例如,AAAL(SEQ ID NO:315)、AAAK(SEQ ID NO:316)、AAAR(SEQ ID NO:317)、EGKSSGSGSESKST(SEQ ID NO:318)、GSAGSAAGSGEF(SEQ ID NO:319)、AEAAAKEAAAKA(SEQ ID NO:320)、KESGSVSSEQLAQFRSLD(SEQ ID NO:321)、GENLYFQSGG(SEQ ID NO:322)、SACYCELS(SEQ ID NO:323)、RSIAT(SEQ ID NO:324)、RPACKIPNDLKQKVMNH(SEQ ID NO:325)、GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG(SEQ ID NO:326)、AAANSSIDLISVPVDSR(SEQ ID NO:327)或GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS(SEQ ID NO:328)。在一些实施方案中,接头可以含有EAAAK(SEQ ID NO:329)的基序(例如,多个或重复基序)。在一些实施方案中,接头可以含有以下的基序(例如,多个或重复基序):富含脯氨酸的序列,如(XP)n,其中X可以是任何氨基酸(例如,A、K或E)并且n为1-5,以及PAPAP(SEQ ID NO:330)。

[0577] 所用肽接头和氨基酸的长度可以根据最终多肽融合多肽中所涉及的两种多肽和所需的柔性程度加以调整。可以调整所述接头的长度以确保适当的多肽折叠并避免聚集体形成。

[0578] H)多肽变体和修饰

[0579] 部分地,本公开文本涉及作为变体多肽(例如,变体ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7

或卵泡抑制素多肽)的ActRII-ALK4拮抗剂。本公开文本的变体多肽包括例如通过一个或多个氨基酸取代、缺失、添加或其组合以及一种或多种翻译后修饰(例如,包括但不限于乙酰化、羧基化、糖基化、磷酸化、脂化和酰化)的变体产生的变体多肽。用于生成包含一个或多个氨基酸修饰的变体多肽的方法,特别是用于生成具有一种或多种所需特性的变体多肽的方法,描述于本文中或原本是本领域中熟知的。同样,用于确定变体多肽是否保留或开发出一种或多种所需特性(例如,配体结合和/或拮抗活性的改变)的各种方法描述于本文中或原本是本领域中熟知的。这些方法可以用于如本文所述的生成变体多肽(例如,变体ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)以及验证其活性(或者其他特性)。

[0580] 如上所述,本公开文本提供与天然存在的多肽共有指定的序列同一性或相似性程度的多肽(例如,ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)。为了确定两个氨基酸序列的同一性百分比,出于最佳比较目的将序列进行比对(例如,可以在第一和第二个氨基酸或核酸序列中的一个或两个中引入空位以实现最佳比对,并且出于比较目的可以忽略非同源序列)。然后比较在相应氨基酸位置处的氨基酸残基。当第一序列中的位置被与第二序列中的相应位置相同的氨基酸残基占据时,则所述分子在该位置处是相同的(如本文所用,氨基酸"同一性"等同于氨基酸"同源性")。两个序列之间的同一性百分比是考虑空位数和每个空位的长度,序列具有的相同位置数的函数,所述空位需要被引入以实现两个序列的最佳比对。

[0581] 序列的比较和两个序列之间同一性和相似性百分比的确定可以使用数学算法来完成(Computational Molecular Biology,Lesk,A.M.编辑,Oxford University Press,New York,1988;Biocomputing:Informatics and Genome Projects,Smith,D.W.编辑,Academic Press,New York,1993;Computer Analysis of Sequence Data,第1部分,Griffin,A.M.和Griffin,H.G.编辑,Humana Press,New Jersey,1994;Sequence Analysis in Molecular Biology,von Heinje,G.,Academic Press,1987;和Sequence Analysis Primer,Gribskov,M.和Devereux,J.编辑,M Stockton Press,New York,1991)。

[0582] 在一个实施方案中,两个氨基酸序列之间的同一性百分比使用Needleman和Wunsch(JMol.Biol.(48):444-453(1970))算法来确定,所述算法已经被并入GCG软件包(可在http://www.gcg.com获得)的GAP程序中。在一个特定的实施方案中,在GAP程序中使用以下参数:Blosum 62矩阵或PAM250矩阵,空位权重16、14、12、10、8、6或4和长度权重1、2、3、4、5或6。在又另一个实施方案中,使用GCG软件包中的GAP程序确定两个核苷酸序列之间的同一性百分比(Devereux,J.等人,Nucleic Acids Res.12(1):387(1984))(可在http://www.gcg.com上获得)。示例性参数包括使用NWSgapdna.CMP矩阵,空位权重40、50、60、70或80和长度权重1、2、3、4、5或6。除非另外规定,否则两个氨基酸序列之间的同一性百分比应使用GAP程序使用Blosum 62矩阵、空位权重10和长度权重3确定,并且如果此种算法不能计算出期望的同一性百分比,则应该选择本文公开的合适替代方案。

[0583] 在另一个实施方案中,使用E.Myers和W.Miller的算法(CABIOS,4:11-17(1989))使用PAM120权重残基表、空位长度罚分12和空位罚分4确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比,该算法已被并入ALIGN程序(2.0版)中。

[0584] 用于确定两个氨基酸序列之间的最佳总体比对的另一个实施方案可以使用基于Brutlag等人的算法(Comp.App.Biosci.,6:237-245(1990))的FASTDB计算机程序来确定。

在序列比对中，查询序列和目标序列均为氨基酸序列。所述全局序列比对的结果以同一性百分比呈现。在一个实施方案中，氨基酸序列同一性使用基于Brutlag等人的算法(Comp.App.Biosci.,6:237-245(1990))的FASTDB计算机程序来确定。在一个特定的实施方案中，用于计算氨基酸比对的同一性和相似性百分比的参数包含：矩阵＝PAM 150，k元组＝2，错配罚分＝1，加入罚分＝20，随机组长＝0，截止分值＝1，空位罚分＝5和空位尺寸罚分＝0.05。

[0585] 在一些实施方案中，本公开文本考虑通过修饰多肽(例如，ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)的结构来制备多功能变体多肽，用于诸如增强治疗功效或稳定性(例如，保质期和对体内蛋白水解降解的抗性)的目的。可以通过氨基酸取代、缺失、添加或其组合来产生变体。例如，合理地预期，用异亮氨酸或缬氨酸孤立地替代亮氨酸、用谷氨酸孤立地替代天冬氨酸、用丝氨酸孤立地替代苏氨酸或者用结构上相关的氨基酸对氨基酸的类似替代(例如，保守突变)不会对所得分子的生物活性产生重大影响。保守替代是在侧链相关的氨基酸家族内发生的那些替代。本公开文本的多肽的氨基酸序列中的变化是否会产生功能同系物可以通过以下方式容易地确定：评估变体多肽在细胞中以与野生型多肽类似的方式产生反应的能力，或者与一种或多种ActRII-ALK4配体(包括例如激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6和BMP10)结合的能力。

[0586] 在某些实施方案中，本公开文本考虑多肽(例如，ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)的特定突变以改变多肽的糖基化。可以选择这样的突变以引入或消除一个或多个糖基化位点，如O-连接的或N-连接的糖基化位点。天冬酰胺连接的糖基化识别位点通常包含三肽序列，即天冬酰胺-X-苏氨酸或天冬酰胺-X-丝氨酸(其中“X”是任何氨基酸)，所述三肽序列被适当的细胞糖基化酶特异性识别。也可以通过多肽序列中一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基的添加或取代来进行改变(对于O-连接的糖基化位点)。糖基化识别位点的第一或第三氨基酸位置中的一个或两个处的多种氨基酸取代或缺失(和/或第二位置处的氨基酸缺失)导致经修饰的三肽序列处的非糖基化。增加多肽上的碳水化合物部分的数量的另一种手段是通过将糖苷化学或酶促偶联至所述多肽。根据所用的偶联模式，可以使一种或多种糖附接至(a)精氨酸和组氨酸；(b)游离羧基；(c)游离巯基，如半胱氨酸的游离巯基；(d)游离羟基，如丝氨酸、苏氨酸或羟基脯氨酸的游离羟基；(e)芳族残基，如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的芳族残基；或(f)谷氨酰胺的酰胺基。多肽上存在的一个或多个碳水化合物部分的去除可以通过化学方式和/或酶促方式来完成。化学去糖基化可以涉及例如使多肽暴露于化合物三氟甲磺酸或等效化合物。此处理导致除了连接糖(N-乙酰葡糖胺或N-乙酰半乳糖胺)外大部分或所有糖的切割，同时氨基酸序列保持完整。多肽上的碳水化合物部分的酶促切割可以通过使用多种内切糖苷酶和外切糖苷酶来实现，如Thotakura等人[Meth.Enzymol.(1987)138:350]所述。可以根据所用表达系统的类型适当地调节多肽的序列，因为哺乳动物、酵母、昆虫和植物细胞都可以引入不同的糖基化模式，所述糖基化模式可能受肽的氨基酸序列的影响。通常，用于人的本公开文本的多肽可以在提供适当糖基化的哺乳动物细胞系(如HEK293或CHO细胞系)中表达，但是预期也可以使用其他哺乳动物表达细胞系。在一些实施方案中，本公开文本的多肽(例如，ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)进行糖基化并且具有可从CHO细胞中的多肽获得的糖基化模式。

[0587] 本公开文本还考虑一种生成突变体、特别是多肽(例如，ActRIIA、ActRIIB、ALK4、

ALK7或卵泡抑制素多肽)组合突变体的集合以及截短突变体的方法。组合突变体的集合尤其可用于鉴定功能活性(例如,ActRII-ALK4配体结合)序列。筛选这样的组合文库的目的可以是产生例如具有改变的特性(如改变的药代动力学或改变的配体结合)的多肽变体。下文提供多种筛选测定,并且可以使用这样的测定来评价变体。例如,可以针对以下能力来筛选多肽(例如,ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)变体、包含所述变体的同多聚体和异多聚体:与一种或多种ActRII-ALK4配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)结合,防止ActRII-ALK4配体与ActRII和/或ALK4多肽以及其异多聚体的同多聚体结合,和/或干扰由ActRII-ALK4配体引起的信号传导。

[0588] 多肽(例如,ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)(包括其同多聚体和异多聚体)或其变体的能力也可以在基于细胞的测定或体内测定中加以测试。例如,多肽(包括其同多聚体和异多聚体)或其变体对所评估的心力衰竭发病机制中涉及的基因的表达的作用。这可以视需要在一种或多种重组配体蛋白(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)的存在下进行,并且可以转染细胞以产生多肽(例如,ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)以及任选地ActRII-ALK4配体。同样,可以将多肽(包括其同多聚体和异多聚体)或其变体施用至小鼠或其他动物,并且可以使用本领域公认的方法来评估对心力衰竭发病机制的作用。类似地,可以在血细胞前体细胞中测试多肽(包括其同多聚体和异多聚体)或其变体的活性对这些细胞的生长的任何作用,例如,通过如本文所述的测定和本领域中公知的那些测定来测试。可以在这样的细胞系中使用SMAD反应性报告基因来监测对下游信号传导的作用。

[0589] 在某些方面,本公开文本的多肽(例如,ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)(包括其异多聚体或同多聚体)与一种或多种ActRII-ALK4配体结合。在一些实施方案中,本公开文本的多肽(包括其异多聚体或同多聚体)以至少1x 10^{-7}M的K_D与一种或多种ActRII-ALK4配体结合。在一些实施方案中,所述一种或多种ActRII-ALK4配体选自:激活素A、激活素B、GDF8、GDF11和BMP10。

[0590] 在某些方面,本公开文本的多肽(例如,ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)(包括其异多聚体或同多聚体)抑制一种或多种ActRII-ALK4家族配体。在一些实施方案中,本公开文本的多肽(包括其异多聚体或同多聚体)抑制一种或多种ActRII-ALK4配体的信号传导。在一些实施方案中,本公开文本的多肽(包括其异多聚体或同多聚体)抑制一种或多种ActRII-ALK4配体的Smad信号传导。在一些实施方案中,本公开文本的多肽(包括其异多聚体或同多聚体)在基于细胞的测定中抑制一种或多种ActRII-ALK4配体的信号传导。在一些实施方案中,本公开文本的多肽(包括其异多聚体或同多聚体)抑制选自以下的一种或多种ActRII-ALK4配体:激活素A、激活素B、GDF8、GDF11和BMP10。

[0591] 可以生成组合衍生的变体,其具有相对于参考多肽(例如,ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)(包括其同多聚体和异多聚体)增加的选择性或大体上增加的效力。这样的变体在从重组DNA构建体表达时可以用于基因疗法方案中。同样,诱变可以产生变体,所述变体具有与相应的未修饰的多肽(包括其同多聚体和异多聚体)不同的细胞内半衰期。例如,可以使改变的蛋白质对于蛋白水解降解或其他细胞过程更稳定或更不稳定,从而导致未修饰多肽的破坏或其他方式的失活。这样的变体和编码它们的基因可以用于通过调节多肽的半衰期来改变多肽复合物水平。例如,短半衰期可以产生更短暂的生物

学效应,并且在诱导性表达系统的一部分时,可以允许更严格地控制细胞内的重组多肽复合物水平。在Fc融合蛋白中,可以在接头(如果有的话)和/或Fc部分中进行突变以改变多肽(包括其同多聚体和异多聚体)的半衰期。

[0592] 组合文库可以借助编码多肽文库的简并基因文库来产生,所述多肽各自包括多肽(例如,ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)(包括其同多聚体和异多聚体)的至少一部分。例如,可以将合成寡核苷酸的混合物酶促连接至基因序列中,使得潜在ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素编码核苷酸序列的简并集合可作为单独多肽来表达,或者可替代地,作为更大的融合蛋白的集合来表达(例如,用于噬菌体展示)。

[0593] 有许多方式可以由简并寡核苷酸序列生成潜在同系物的文库。简并基因序列的化学合成可以在自动DNA合成仪中进行,然后可以将合成基因连接至适当的载体中进行表达。简并寡核苷酸的合成是本领域中熟知的[Narang,SA(1983)Tetrahedron 39:3;Itakura等人(1981)Recombinant DNA,Proc.3rd Cleveland Sympos.Macromolecules,编辑AG Walton,Amsterdam:Elsevier pp273-289;Itakura等人(1984)Annu.Rev.Biochem.53:323;Itakura等人(1984)Science 198:1056;以及Ike等人(1983)Nucleic Acid Res.11:477]。这样的技术已经用于其他蛋白质的定向进化[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;以及美国专利号:5,223,409、5,198,346和5,096,815]。

[0594] 可替代地,可以利用其他形式的诱变来生成组合文库。例如,本公开文本的多肽(例如,ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)(包括其同多聚体和异多聚体)可以通过以下方式从文库生成并分离:使用例如丙氨酸扫描诱变进行筛选[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)Biochemistry30:10832-10838;以及Cunningham等人(1989)Science 244:1081-1085],接头扫描诱变[Gustin等人(1993)Virology 193:653-660;以及Brown等人(1992)Mol.Cell Biol.12:2644-2652;McKnight等人(1982)Science 232:316],饱和诱变[Meyers等人,(1986)Science 232:613];PCR诱变[Leung等人(1989)Method Cell Mol Biol 1:11-19];或者随机诱变,包括化学诱变[Miller等人(1992)A Short Course in Bacterial Genetics,CSHL Press,Cold Spring Harbor,NY;以及Greener等人(1994)Strategies in Mol Biol 7:32-34]。接头扫描诱变(特别是在组合背景中)是一种用于鉴定多肽(例如,ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)(包括其同多聚体和异多聚体)的截短(生物活性)形式的有吸引力的方法。

[0595] 本领域中已知多种技术用于筛选通过点突变和截短产生的组合文库的基因产物,并且就此而言,用于筛选具有某种特性的基因产物的cDNA文库。这样的技术将大体上能适应用于对通过多肽(例如,ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)(包括其同多聚体和异多聚体)的组合诱变生成的基因文库的快速筛选。用于筛选大基因文库的最广泛使用的技术通常包括将所述基因文库克隆至可复制的表达载体中,用所得载体文库转化适当的细胞以及在检测所需活性促进相对容易地分离编码基因(所述基因的产物被检测到)的

载体的条件下表达所述组合基因。优选的测定包括配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)结合测定和/或配体介导的细胞信号传导测定。

[0596] 如本领域技术人员将了解,大多数本文所述的突变、变体或修饰可以在核酸水平上进行,或者在一些情形中通过翻译后修饰或化学合成来进行。这样的技术是本领域中熟知的,并且其中一些描述于本文中。部分地,本公开文本鉴定多肽(例如,ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)(包括其同多聚体和异多聚体)的功能活性部分(片段)和变体,它们可以用作用于在本文所述的方法和用途的范围内生成和使用其他变体多肽的指导。

[0597] 在某些实施方案中,本公开文本的多肽(例如,ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)(包括其同多聚体和异多聚体)的功能活性片段可以通过筛选从本文公开的编码多肽的核酸的相应片段重组产生的多肽来获得。另外,片段可以使用本领域中已知的技术化学地合成,如常规Merrifield固相f-Moc或t-Boc化学。可以产生(以重组方式或通过化学合成)片段并进行测试,以鉴定那些可以用作ActRII和/或ALK4受体和/或一种或多种配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)的拮抗剂(抑制剂)的肽基片段。

[0598] 在某些实施方案中,除了在多肽中天然存在的任何修饰外,本公开文本的多肽(例如,ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)(包括其同多聚体和异多聚体)或其变体还可以包含翻译后修饰。这样的修饰包括但不限于乙酰化、羧基化、糖基化、磷酸化、脂化和酰化。因此,所述多肽(包括其同多聚体和异多聚体)可以含有非氨基酸元件,如聚乙二醇、脂质、多糖或单糖以及磷酸盐。这样的非氨基酸元件对多肽功能性的作用可以如本文针对其他多肽变体所述加以测试。当在细胞中通过切割新生形式的多肽来产生本公开文本的多肽时,翻译后加工对于蛋白质的正确折叠和/或功能可能也是重要的。不同细胞(例如,CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3或HEK293)对于这样的翻译后活性具有特定的细胞机构和特征机制,并且可以进行选择以确保对多肽的正确修饰和加工。

[0599] I)核酸和制造方法

[0600] 在某些方面,本公开文本提供编码任何本文公开的多肽(包括例如ActRIIB、ActRIIA、ALK4或ALK7多肽(例如,可溶ActRIIB、ActRIIA、ALK4或ALK7多肽)或卵泡抑制素多肽)以及任何本文公开的变体的分离的和/或重组的核酸。例如,SEQ ID NO:4编码天然存在的ActRIIB前体多肽,而SEQ ID NO:3编码可溶性ActRIIB多肽。主题核酸可以是单链的或双链的。这样的核酸可以是DNA或RNA分子。这些核酸可以用于例如用于制备ActRIIB、ActRIIA、ALK4或ALK7多肽的方法中,或者用作直接治疗剂(例如,在基因疗法方法中)。

[0601] 在某些方面,本公开文本涉及分离的和/或重组的核酸,所述分离的和/或重组的核酸包含如本文所述的ActRIIB、ActRIIA、ALK4、ALK7或一种或多种卵泡抑制素多肽中的一种或多种的编码序列。例如,在一些实施方案中,本公开文本涉及一种分离的和/或重组的核酸,所述分离的和/或重组的核酸与对应于SEQ ID No:3、4、10、32、35、38、41、44、47、221、222、223、224、233、234、235、236、237、238、239、240、243、248、250、251、252、255、277、331、334、337、340、343、346、349、352、355、369、370、382、397、407、423和424中任一个的核酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施方案中,本公开文本的分离的和/或重组的多核苷酸序列包含与本文所述的编码序列(例如,与对应于SEQ ID No:3、4、10、32、35、38、41、44、47、221、222、223、224、

233、234、235、236、237、238、239、240、243、248、250、251、252、255、277、331、334、337、340、343、346、349、352、355、369、370、382、397、407、423和424中任一个的核酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的核酸)可操作地连接的启动子序列。在一些实施方案中，本公开文本涉及载体，所述载体包含本文所述的分离的和/或重组的核酸(例如，与对应于SEQ ID No:3、4、10、32、35、38、41、44、47、221、222、223、224、233、234、235、236、237、238、239、240、243、248、250、251、252、255、277、331、334、337、340、343、346、349、352、355、369、370、382、397、407、423和424中任一个的核酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的核酸)。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种细胞，所述细胞包含本文所述的分离的和/或重组的多核苷酸序列(例如，与对应于SEQ ID No:3、4、10、32、35、38、41、44、47、221、222、223、224、233、234、235、236、237、238、239、240、243、248、250、251、252、255、277、331、334、337、340、343、346、349、352、355、369、370、382、397、407、423和424中任一个的核酸序列至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的核酸)。在一些实施方案中，所述细胞是CHO细胞。在一些实施方案中，所述细胞是COS细胞。

[0602] 在某些实施方案中，编码本公开文本的变体ActRIIB(或者其同多聚体或异多聚体)、ALK4或ALK7多肽的核酸应理解为包括作为SEQ ID No:3、4、10、32、35、38、41、44、47、221、222、223、224、233、234、235、236、237、238、239、240、243、248、250、251、252、255、277、331、334、337、340、343、346、349、352、355、369、370、382、397、407、423和424中任一个的变体的核酸。变体核苷酸序列包括相差一个或多个核苷酸取代、添加或缺失的序列，包括等位基因变体，因此，将包括与SEQ ID No:3、4、10、32、35、38、41、44、47、221、222、223、224、233、234、235、236、237、238、239、240、243、248、250、251、252、255、277、331、334、337、340、343、346、349、352、355、369、370、382、397、407、423和424中的任一个中指定的核苷酸序列不同的编码序列。

[0603] 在某些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB(或者其同多聚体或异多聚体)、ALK4或ALK7多肽由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID No:3、4、10、32、35、38、41、44、47、221、222、223、224、233、234、235、236、237、238、239、240、243、248、250、251、252、255、277、331、334、337、340、343、346、349、352、355、369、370、382、397、407、423和424中的任一个至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽(或者其同多聚体或异多聚体)由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:3至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽(或者其同多聚体或异多聚体)由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:4至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽(或者其同多聚体或异多聚体)由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:10至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的变

体ActRIIB多肽(或者其同多聚体或异多聚体)由分离的和/或重组的核酸序列编码,所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:32至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在某些实施方案中,本公开文本的变体ActRIIB多肽(或者其同多聚体或异多聚体)由分离的和/或重组的核酸序列编码,所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:35至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在某些实施方案中,本公开文本的变体ActRIIB多肽(或者其同多聚体或异多聚体)由分离的和/或重组的核酸序列编码,所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:38至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在某些实施方案中,本公开文本的变体ActRIIB多肽(或者其同多聚体或异多聚体)由分离的和/或重组的核酸序列编码,所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:41至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在某些实施方案中,本公开文本的变体ActRIIB多肽(或者其同多聚体或异多聚体)由分离的和/或重组的核酸序列编码,所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:44至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在某些实施方案中,本公开文本的变体ActRIIB多肽(或者其同多聚体或异多聚体)由分离的和/或重组的核酸序列编码,所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:47至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0604] 在某些实施方案中,本公开文本的变体ActRIIB多肽(或者其同多聚体或异多聚体)由分离的和/或重组的核酸序列编码,所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:277至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在某些实施方案中,本公开文本的变体ActRIIB多肽(或者其同多聚体或异多聚体)由分离的和/或重组的核酸序列编码,所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:331至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在某些实施方案中,本公开文本的变体ActRIIB多肽(或者其同多聚体或异多聚体)由分离的和/或重组的核酸序列编码,所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:334至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在某些实施方案中,本公开文本的变体ActRIIB多肽(或者其同多聚体或异多聚体)由分离的和/或重组的核酸序列编码,所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:337至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在某些实施方案中,本公开文本的变体ActRIIB多肽(或者其同多聚体或异多聚体)由分离的和/或重组的核酸序列编码,所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:340至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在某些实施方案中,本公开文本的变体ActRIIB多肽(或者其同多聚体或异多聚体)由分离的和/或重组的核酸序列编码,所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:343至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在某些实施方案中,本公开文本的变体ActRIIB多肽(或者其同多聚体或异多聚体)由分离的和/或重组的核酸序列编码,所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:346至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、

94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽(或者其同多聚体或异多聚体)由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:349至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽(或者其同多聚体或异多聚体)由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:352至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽(或者其同多聚体或异多聚体)由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:355至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽(或者其同多聚体或异多聚体)由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:382至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽(或者其同多聚体或异多聚体)由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:397至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIB多肽(或者其同多聚体或异多聚体)由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:407至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0605] 在某些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIA多肽(或者其同多聚体或异多聚体)由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:369至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的变体ActRIIA多肽(或者其同多聚体或异多聚体)由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:370至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0606] 在某些实施方案中，本公开文本的ALK4多肽由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:221至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的ALK4多肽由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:222至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的ALK4多肽由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:223至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的ALK4多肽由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:224至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的ALK4多肽由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:423至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％

或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的ALK4多肽由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:424至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0607] 在某些实施方案中，本公开文本的ALK7多肽由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:233至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的ALK7多肽由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:234至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的ALK7多肽由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:235至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的ALK7多肽由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:236至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的ALK7多肽由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:237至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的ALK7多肽由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:238至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的ALK7多肽由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:239至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的ALK7多肽由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:240至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0608] 在某些实施方案中，本公开文本的ALK4-Fc融合多肽由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:243至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的ALK4-Fc融合多肽由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:248至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的ALK4-Fc融合多肽由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:250至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的ALK4-Fc融合多肽由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:251至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的ALK4-Fc融合多肽由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列与SEQ ID NO:252至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在某些实施方案中，本公开文本的ALK7-Fc融合多肽由分离的和/或重组的核酸序列编码，所述分离的和/或重组的核酸序列

与SEQ ID NO:255至少70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0609] 在某些方面，应进一步理解，编码变体ActRIIB多肽的主题核酸包括作为SEQ ID NO:3的变体的核酸。变体核苷酸序列包括相差一个或多个核苷酸取代、添加或缺失的序列，如等位基因变体；并且因此将包括与SEQ ID NO:4中指定的编码序列的核苷酸序列不同的编码序列。

[0610] 在某些实施方案中，本公开文本提供分离的或重组的核酸序列，所述分离的或重组的核酸序列与SEQ ID NO:3至少75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。本领域普通技术人员将了解，与SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:3的变体互补的核酸序列也在本公开文本的范围内。在其他实施方案中，本公开文本的核酸序列可以与异源核苷酸序列分离、重组和/或融合，或者在DNA文库中。

[0611] 在其他实施方案中，本公开文本的核酸还包括在高严格度条件下与编码本公开文本的呈同聚或异聚形式的ActRIIB或ActRIIA多肽、ALK4或ALK7多肽或者本公开文本的卵泡抑制素多肽的核酸杂交的核苷酸序列、其互补序列或片段。如上文所讨论，本领域技术人员将容易地理解，促进DNA杂交的适当严格度条件可以变化。本领域的普通技术人员应容易地理解，促进DNA杂交的适当严格度条件可以变化。例如，可以在约45℃下在6.0x氯化钠/柠檬酸钠(SSC)下进行杂交，随后进行在50℃下2.0x SSC的洗涤。例如，洗涤步骤中的盐浓度可以选自在50℃下约2.0x SSC的低严格度至在50℃下约0.2x SSC的高严格度。另外，洗涤步骤中的温度可以从室温(约22℃)下的低严格度条件增加至约65℃下的高严格度条件。温度和盐两者都可以变化；或者温度或盐浓度可以保持恒定而改变另一变量。在一个实施方案中，本公开文本提供核酸，将其在室温下6x SSC的低严格度条件下杂交，之后进行在室温下2x SSC的洗涤。

[0612] 由于遗传密码的简并性而与如本公开文本中所示的核酸不同的分离的核酸也在本公开文本的范围内。例如，多个氨基酸由超过一个三联体指定。指定相同氨基酸的密码子或同义密码子(例如，CAU和CAC是组氨酸的同义密码子)可以导致不影响多肽氨基酸序列的“沉默”突变。然而，预期在哺乳动物之间将存在确实导致主题多肽的氨基酸序列变化的DNA序列多态性。本领域技术人员将了解，由于天然等位基因变异，在给定物种的个体之间可能存在编码特定多肽的核酸的一个或多个核苷酸(最多约3-5％的核苷酸)中的这些变异。任何和所有这样的核苷酸变异和所得氨基酸多态性都在本公开文本的范围内。

[0613] 在某些实施方案中，本公开文本的重组核酸可以在表达构建体中与一个或多个调节核苷酸序列可操作地连接。调节核苷酸序列通常对于用于表达的宿主细胞将是适当的。对于各种宿主细胞，多种类型的适当表达载体和合适的调节序列是本领域中已知的。通常，所述一个或多个调节核苷酸序列可以包括但不限于启动子序列、前导序列或信号序列、核糖体结合位点、转录起始序列和终止序列、翻译起始序列和终止序列以及增强子或激活子序列。本公开文本涵盖本领域中已知的组成型或诱导型启动子。所述启动子可以是天然存在的启动子或组合超过一种启动子的元件的杂合启动子。表达构建体可以存在于细胞中的附加体如质粒上，或者可以将表达构建体插入染色体中。在优选实施方案中，表达载体含有可选择的标记基因，以允许选择转化的宿主细胞。可选择的标记基因是本领域中公知的，并且将随着所用宿主细胞而变化。

[0614] 在某些方面，主题核酸在包含编码本公开文本的多肽(例如，变体ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)的核苷酸序列的表达载体中提供，与至少一个调节序列可操作地连接。调节序列是本领域公认的并且进行选择以引导本公开文本的多肽(例如，变体ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)的表达。因此，术语调节序列包括启动子、增强子和其他表达控制元件。示例性调节序列描述于以下文献中：Goeddel；Gene Expression Technology:Methods in Enzymology,Academic Press,San Diego,CA(1990)。例如，控制与其可操作地连接的DNA序列的表达的众多种表达控制序列中的任一种可以用于这些载体中，以表达编码本公开文本的多肽(例如，变体ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)的DNA序列。这样的有用的表达控制序列包括例如SV40的早期和晚期启动子、tet启动子、腺病毒或巨细胞病毒即时早期启动子、RSV启动子、lac系统、trp系统、TAC或TRC系统、表达由T7 RNA聚合酶引导的T7启动子、噬菌体λ的主要操纵子和启动子区、fd外壳蛋白的控制区、3-磷酸甘油酸激酶或其他糖酵解酶的启动子、酸性磷酸酶(例如，Pho5)的启动子、酵母α-配对因子的启动子、杆状病毒系统的多角体启动子和已知控制原核细胞或真核细胞或其病毒的基因的表达的其他序列以及其各种组合。应理解，表达载体的设计可以取决于诸如以下的因素：要转化的宿主细胞的选择和/或期望表达的多肽类型。此外，还应考虑载体的拷贝数、控制该拷贝数的能力以及所述载体编码的任何其他多肽(如抗生素标记物)的表达。

[0615] 本公开文本的重组核酸可以通过以下方式来产生：将克隆的基因或其部分连接至适合于在原核细胞、真核细胞(酵母、禽类、昆虫或哺乳动物)或二者中表达的载体中。用于产生重组变体ActRIIB多肽的表达媒介物包括质粒和其他载体。例如，适合的载体包括以下类型的质粒：用于在原核细胞(如大肠杆菌)中表达的pBR322来源的质粒、pEMBL来源的质粒、pEX来源的质粒、pBTac来源的质粒以及pUC来源的质粒。

[0616] 一些哺乳动物表达载体含有促进载体在细菌中增殖的原核序列、以及在真核细胞中表达的一个或多个真核转录单元二者。pcDNAI/amp、pcDNAI/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo和pHyg来源的载体为适合用于转染真核细胞的哺乳动物表达载体的例子。这些载体中的一些用来自细菌质粒(如pBR322)的序列修饰，以促进在原核细胞和真核细胞二者中的复制和抗药性选择。可替代地，病毒如牛乳头瘤病毒(BPV-1)或EB病毒(pHEBo、pREP来源的和p205)的衍生物可以用于多肽在真核细胞中的瞬时表达。其他病毒(包括逆转录病毒)表达系统的例子可以发现于下文基因疗法递送系统的描述中。在质粒的制备和宿主生物体的转化中采用的不同方法是本领域中熟知的。对于用于原核细胞和真核细胞两者的其他适合的表达系统以及一般重组程序，参见Molecular Cloning A Laboratory Manual,第2版,Sambrook,Fritsch和Maniatis编辑(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)第16和17章。在一些情况下，可能需要通过使用杆状病毒表达系统来表达重组多肽。这样的杆状病毒表达系统的例子包括pVL来源的载体(如pVL1392、pVL1393和pVL941)、pAcUW来源的载体(如pAcUW1)和pBlueBac来源的载体(如含有β-gal的pBlueBac III)。

[0617] 在优选实施方案中，载体将被设计为用于在CHO细胞中产生本公开文本的多肽(例如，变体ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)，如Pcmv-Script载体(Stratagene，拉荷亚，加利福尼亚州)、pcDNA4载体(Invitrogen，卡尔斯巴德，加利福尼亚

州)和pCI-neo载体(Promega,麦迪逊,威斯康辛州)。如将清楚的,主题基因构建体可以用于引起本公开文本的多肽(例如,变体ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)在培养中繁殖的细胞中表达,例如,以产生多肽(包括融合多肽或多肽)用于纯化。

[0618] 在某些实施方案中,本公开文本涉及制备本公开文本的多肽(例如,变体ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)以及如本文所述的包含所述多肽的同多聚体和异多聚体的方法。这样的方法可以包括在合适的细胞(例如,CHO细胞或COS细胞)中表达任何本文公开的核酸。这样的方法可以包括:a)在适合于表达本公开文本的可溶多肽(例如,变体ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)的条件下培养细胞,其中所述细胞包含本公开文本的多肽(例如,变体ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)的表达构建体。在一些实施方案中,所述方法还包括回收表达的本公开文本的多肽(例如,变体ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)。本公开文本的多肽(例如,变体ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)可以使用用于从细胞培养物获得蛋白质的任何熟知的技术作为粗制的、部分纯化的或高度纯化的级分来回收。

[0619] 本公开文本还涉及用包括本公开文本的一种或多种多肽(例如,变体ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)的编码序列的重组基因转染的宿主细胞。所述宿主细胞可以是任何原核细胞或真核细胞。例如,本公开文本的多肽(例如,变体ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)可以在细菌细胞如大肠杆菌(E.coli)、昆虫细胞(例如,使用杆状病毒表达系统)、酵母或哺乳动物细胞中表达。其他合适的宿主细胞是本领域技术人员已知的。

[0620] 因此,本公开文本还涉及产生本公开文本的多肽(例如,变体ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)的方法。例如,可以在适当条件下培养用编码本公开文本的多肽(例如,变体ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)的表达载体转染的宿主细胞以允许进行本公开文本的多肽(例如,变体ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)的表达。本公开文本的多肽(例如,变体ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)可以从含有所述多肽的细胞与培养基的混合物分泌并分离。可替代地,本公开文本的多肽(例如,变体ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)可以保留在胞质中或膜级分中,并且收获、溶解细胞并分离蛋白质。细胞培养物包括宿主细胞、培养基和其他副产物。用于细胞培养的合适的培养基是本领域中熟知的。本公开文本的主题多肽(例如,变体ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)可以使用本领域中已知用于纯化多肽的技术从细胞培养基、宿主细胞或二者分离,所述技术包括离子交换色谱、凝胶过滤色谱、超滤、电泳以及使用对本公开文本的多肽(例如,变体ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)的特定表位具有特异性的抗体的免疫亲和纯化。在优选实施方案中,本公开文本的多肽(例如,变体ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)是融合多肽,其含有有利于纯化的结构域。

[0621] 在优选实施方案中,要根据本文所述的方法使用的ActRII多肽、ALK4多肽、ALK7多肽、以及ActRIIB-ALK4、ActRIIB-ALK7、ActRIIA-ALK4和ActRIIA-ALK7异多聚体是分离的多肽。如本文所用,分离的蛋白质或多肽已经与其天然环境的组分分离者。在一些实施方案中,将本公开文本的多肽纯化至大于95%、96%、97%、98%或99%纯度,如通过例如电泳(例如,SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或色谱(例如,离子交换或反相HPLC)所确

定。用于评估纯度的方法是本领域中熟知的[参见例如,Flatman等人,(2007)J.Chromatogr.B 848:79-87]。在一些实施方案中,要根据本文所述的方法使用的ActRII多肽、ALK4多肽和ActRIIB-ALK4异多聚体是重组多肽。

[0622] 在某些实施方案中,本公开文本的ActRIIB或ActRIIA多肽可以通过多种本领域中已知的技术来产生。例如,这样的ActRIIB或ActRIIA多肽可以使用标准蛋白质化学技术来合成,所述技术如以下文献中所述的那些:Bodansky,M.Principles of Peptide Synthesis,Springer Verlag,Berlin(1993)和Grant G.A.(ed.),Synthetic Peptides:A User's Guide,W.H.Freeman and Company,New York(1992)。另外,自动化肽合成仪可商购获得(例如,Advanced ChemTech Model 396;Milligen/Biosearch 9600)。可替代地,ActRIIB或ActRIIA多肽或其片段或变体可以使用多种表达系统(例如,大肠杆菌、中国仓鼠卵巢细胞、COS细胞、杆状病毒)重组产生,如本文领域中所熟知(也参见上文)。在另一实施方案中,ActRIIB或ActRIIA多肽可以通过使用例如蛋白酶(例如,胰蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶或配对碱性氨基酸转化酶(PACE)消化天然存在的或重组产生的全长ActRIIB或ActRIIA多肽来产生。可以使用计算机分析(使用可商购软件,例如,MacVector、Omega、PCGene,Molecular Simulation,Inc.)来鉴定蛋白水解切割位点。可替代地,这样的ActRIIB或ActRIIA多肽可以从天然存在的或重组产生的全长ActRIIB或ActRIIA多肽产生,如本领域中已知的标准技术,如通过化学切割(例如,溴化氰、羟胺)。

[0623] 在另一个实施方案中,编码纯化前导序列(如在本公开文本的重组多肽(例如,变体ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)的所需部分的N末端处的聚(His)/肠激酶切割位点序列)的融合基因可以允许通过亲和色谱使用Ni^{2+}金属树脂来纯化表达的融合多肽。然后可以通过用肠激酶处理随后去除纯化前导序列,以提供纯化的本公开文本的多肽(例如,变体ActRIIA、ActRIIB、ALK4、ALK7或卵泡抑制素多肽)(例如,参见Hochuli等人,(1987)J.Chromatography 411:177;以及Janknecht等人,PNAS USA88:8972)。

[0624] 用于制备融合基因的技术是熟知的。本质上,根据常规技术采用以下来进行编码不同多肽序列的各种DNA片段的接合:用于连接的钝端或交错端末端、用于提供适当末端的限制性酶消化、视需要的粘性末端填入,用于避免不期望的接合的碱性磷酸酶处理以及酶连接。在另一个实施方案中,可以通过常规技术(包括自动化DNA合成仪)来合成融合基因。可替代地,可以使用锚定引物对基因片段进行PCR扩增,所述锚定引物在两个连续基因片段之间产生了互补的单链突出端,随后可以使所述单链突出端退火以生成嵌合基因序列(参见例如,Current Protocols in Molecular Biology,Ausubel等人编辑,John Wiley& Sons:1992)。

[0625] 3.抗体拮抗剂

[0626] 在某些方面,要根据本文公开的方法和用途(例如,治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或者心力衰竭的一种或多种并发症,或降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的进展率和/或严重性)使用的ActRII-ALK4拮抗剂是抗体(ActRII-ALK4拮抗剂抗体)或抗体组合。ActRII-ALK4拮抗剂抗体或抗体组合可以与例如一种或多种ActRII配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)、ActRII受体(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或I型受体(例如,ALK4)结合。如本文所述,ActRII-ALK4拮抗剂抗体可以单独地或与一种或多种支持疗法或活性剂组合

用于治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低心力衰竭的进展率和/或严重性,特别是治疗、预防一种或多种心力衰竭相关并发症或降低一种或多种心力衰竭相关并发症的进展率和/或严重性。

[0627] 在某些方面,ActRII-ALK4拮抗剂抗体或抗体组合是抑制至少激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、激活素BC、激活素AE和/或激活素BE)的抗体。因此,在一些实施方案中,ActRII-ALK4拮抗剂抗体或抗体组合与至少激活素结合。如本文所用,激活素抗体(或者抗激活素抗体)通常是指如下抗体,所述抗体以足够亲和力与激活素结合,使得所述抗体可用作靶向激活素中的诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中,激活素抗体与无关的非激活素蛋白的结合程度为所述抗体与激活素的结合的小于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量。在某些实施方案中,激活素抗体与在来自不同物种的激活素之间保守的激活素表位结合。在某些优选实施方案中,抗激活素抗体与人激活素结合。在一些实施方案中,激活素抗体可以抑制激活素与I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB和/或ALK4)结合,由此抑制激活素介导的信号传导(例如,Smad信号传导)。应注意,激活素A与激活素B具有类似的序列同源性,因此与激活素A结合的抗体在一些情况下也可以结合至和/或抑制激活素B,这也适用于抗激活素B抗体。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种多特异性抗体(例如,双特异性抗体)及其用途,所述多特异性抗体与激活素结合,并且进一步与例如一种或多种另外的ActRII-ALK4配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)、一种或多种I型受体和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB和/或ALK4)结合。在一些实施方案中,与激活素结合的多特异性抗体不结合或基本上不结合BMP9(例如,与BMP9结合的K_D大于1x 10^{-7}M或具有相对不大的结合,例如,约1x 10^{-8}M或约1x 10^{-9}M)。在一些实施方案中,与激活素结合的多特异性抗体不结合或基本上不结合激活素A(例如,与激活素A结合的K_D大于1x 10^{-7}M或具有相对不大的结合,例如,约1x 10^{-8}M或约1x 10^{-9}M)。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体组合及其用途,其中所述抗体组合包含激活素抗体和一种或多种另外的抗体,所述一种或多种另外的抗体与例如一种或多种另外的ActRII配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)、ActRII受体(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或I型受体(例如,ALK4)结合。在一些实施方案中,包含激活素抗体的抗体组合不包含BMP9抗体。

[0628] 在某些方面,ActRII-ALK4拮抗剂抗体或抗体组合是抑制至少激活素B的抗体。因此,在一些实施方案中,ActRII-ALK4拮抗剂抗体或抗体组合与至少激活素B结合。如本文所用,激活素B抗体(或者抗激活素B抗体)通常是指如下抗体,所述抗体以足够亲和力与激活素B结合,使得所述抗体可用作靶向激活素B中的诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中,激活素B抗体与无关的非激活素B蛋白结合的程度为所述抗体与激活素的结合的小于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量。在某些实施方案中,激活素B抗体与在来自不同物种的激活素B之间保守的激活素B表位结合。在某些优选实施方案中,抗激活素B抗体与人激活素B结合。在一些实施方案中,激活素B抗体可以抑制激活素B与I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB和/或ALK4)结合,由此抑制激活素B介导的信号传导(例如,Smad信号传导)。在一些实施方案中,激活素B抗体可以抑制激活素B与共受体结

合,由此抑制激活素B介导的信号传导(例如,Smad信号传导)。应注意,激活素B与激活素A具有类似的序列同源性,因此与激活素B结合的抗体在一些情况下也可以结合至和/或抑制激活素A。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种多特异性抗体(例如,双特异性抗体)及其用途,所述多特异性抗体与激活素B结合,并且进一步与例如一种或多种另外的ActRII配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)、ActRII受体(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或I型受体(例如,ALK4)结合。在一些实施方案中,与激活素B结合的多特异性抗体不结合或基本上不结合BMP9(例如,与BMP9结合的K_D大于1x 10^{-7}M或具有相对不大的结合,例如,约1x 10^{-8}M或约1x 10^{-9}M)。在一些实施方案中,与激活素B结合的多特异性抗体不结合或基本上不结合激活素A(例如,与激活素A结合的K_D大于1x 10^{-7}M或具有相对不大的结合,例如,约1x 10^{-8}M或约1x 10^{-9}M)。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体组合及其用途,其中所述抗体组合包含激活素B抗体和一种或多种另外的抗体,所述一种或多种另外的抗体与例如一种或多种另外的ActRII配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)、ActRII受体(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或I型受体(例如,ALK4)结合。在一些实施方案中,包含激活素B抗体的抗体组合不包含BMP9抗体。在一些实施方案中,包含激活素B抗体的抗体组合不包含激活素A抗体。

[0629] 在某些方面,ActRII-ALK4拮抗剂抗体或抗体组合是抑制至少GDF8的抗体。因此,在一些实施方案中,ActRII-ALK4拮抗剂抗体或抗体组合与至少GDF8结合。如本文所用,GDF8抗体(或者抗GDF8抗体)通常是指如下抗体,所述抗体以足够亲和力与GDF8结合,使得所述抗体可用作靶向GDF8中的诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中,GDF8抗体与无关的非GDF8蛋白的结合程度为所述抗体与GDF8的结合的小于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量。在某些实施方案中,GDF8抗体与在来自不同物种的GDF8之间保守的GDF8表位结合。在某些优选实施方案中,抗GDF8抗体与人GDF8结合。在一些实施方案中,GDF8抗体可以抑制GDF8与I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB和/或ALK4)结合,由此抑制GDF8介导的信号传导(例如,Smad信号传导)。在一些实施方案中,GDF8抗体可以抑制GDF8与共受体结合,由此抑制GDF8介导的信号传导(例如,Smad信号传导)。应注意,GDF8与GDF11具有高序列同源性,因此与GDF8结合的抗体在一些情况下也可以结合至和/或抑制GDF11。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种多特异性抗体(例如,双特异性抗体)及其用途,所述多特异性抗体与GDF8结合,并且进一步与例如一种或多种另外的ActRII配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)、ActRII受体(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或I型受体(例如,ALK4)结合。在一些实施方案中,与GDF8结合的多特异性抗体不结合或基本上不结合BMP9(例如,与BMP9结合的K_D大于1x 10^{-7}M或具有相对不大的结合,例如,约1x 10^{-8}M或约1x 10^{-9}M)。在一些实施方案中,与GDF8结合的多特异性抗体不结合或基本上不结合激活素A(例如,与激活素A结合的K_D大于1x 10^{-7}M或具有相对不大的结合,例如,约1x 10^{-8}M或约1x 10^{-9}M)。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体组合及其用途,其中所述抗体组合包含GDF8抗体和一种或多种另外的抗体,所述一种或多种另外的抗体与例如一种或多种另外的ActRII配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)、ActRII受体(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或I型受体(例如,ALK4)结合。在一些实施方案中,包含GDF8抗体的抗体组合不包含BMP9抗体。在一些实施方案中,包含GDF8抗体的抗体组合

不包含激活素A抗体。

[0630] 在某些方面,ActRII-ALK4拮抗剂抗体或抗体组合是抑制至少GDF11的抗体。因此,在一些实施方案中,ActRII-ALK4拮抗剂抗体或抗体组合与至少GDF11结合。如本文所用,GDF11抗体(或者抗GDF11抗体)通常是指如下抗体,所述抗体以足够亲和力与GDF11结合,使得所述抗体可用作靶向GDF11中的诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中,GDF11抗体与无关的非GDF11蛋白的结合程度为所述抗体与GDF11的结合的小于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量。在某些实施方案中,GDF11抗体与在来自不同物种的GDF11之间保守的GDF11表位结合。在某些优选实施方案中,抗GDF11抗体与人GDF11结合。在一些实施方案中,GDF11抗体可以抑制GDF11与I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB和/或ALK4)结合,由此抑制GDF11介导的信号传导(例如,Smad信号传导)。在一些实施方案中,GDF11抗体可以抑制GDF11与共受体结合,由此抑制GDF11介导的信号传导(例如,Smad信号传导)。应注意,GDF11与GDF8具有高序列同源性,因此与GDF11结合的抗体在一些情况下也可以结合至和/或抑制GDF8。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种多特异性抗体(例如,双特异性抗体)及其用途,所述多特异性抗体与GDF11结合,并且进一步与例如一种或多种另外的ActRII-ALK4配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)、一种或多种I型受体和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB和/或ALK4)和/或一种或多种共受体结合。在一些实施方案中,与GDF11结合的多特异性抗体不结合或基本上不结合BMP9(例如,与BMP9结合的K_D大于1x 10^{-7}M或具有相对不大的结合,例如,约1x 10^{-8}M或约1x 10^{-9}M)。在一些实施方案中,与GDF11结合的多特异性抗体不结合或基本上不结合激活素A(例如,与激活素A结合的K_D大于1x 10^{-7}M或具有相对不大的结合,例如,约1x 10^{-8}M或约1x 10^{-9}M)。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体组合及其用途,其中所述抗体组合包含GDF11抗体和一种或多种另外的抗体,所述一种或多种另外的抗体与例如一种或多种另外的ActRII配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)、ActRII受体(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或I型受体(例如,ALK4)结合。在一些实施方案中,包含GDF11抗体的抗体组合不包含BMP9抗体。在一些实施方案中,包含GDF11抗体的抗体组合不包含激活素A抗体。

[0631] 在某些方面,ActRII-ALK4拮抗剂抗体或抗体组合是抑制至少BMP6的抗体。因此,在一些实施方案中,ActRII-ALK4拮抗剂抗体或抗体组合与至少BMP6结合。如本文所用,BMP6抗体(或者抗BMP6抗体)通常是指如下抗体,所述抗体可以以足够亲和力与BMP6结合,使得所述抗体可用作靶向BMP6中的诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中,BMP6抗体与无关的非BMP6蛋白的结合程度为所述抗体与BMP6的结合的小于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量。在某些实施方案中,BMP6抗体与在来自不同物种的BMP6之间保守的BMP6表位结合。在某些优选实施方案中,抗BMP6抗体与人BMP6结合。在一些实施方案中,BMP6抗体可以抑制BMP6与I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB和/或ALK4)结合,由此抑制BMP6介导的信号传导(例如,Smad信号传导)。在一些实施方案中,BMP6抗体可以抑制BMP6与共受体结合,由此抑制BMP6介导的信号传导(例如,Smad信号传导)。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种多特异性抗体(例如,双特异性抗体)及其用途,所述多特异性抗体与BMP6结合,并且进一步与例如一种或多种另外的ActRII配体(例如,激活素

A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)、ActRII受体(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或I型受体(例如,ALK4)结合。在一些实施方案中,与BMP6结合的多特异性抗体不结合或基本上不结合BMP9(例如,与BMP9结合的K_D大于1x 10^{-7}M或具有相对不大的结合,例如,约1x 10^{-8}M或约1x10^{-9}M)。在一些实施方案中,与BMP6结合的多特异性抗体不结合或基本上不结合激活素A(例如,与激活素A结合的K_D大于1x 10^{-7}M或具有相对不大的结合,例如,约1x 10^{-8}M或约1x 10^{-9}M)。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体组合及其用途,其中所述抗体组合包含BMP6抗体和一种或多种另外的抗体,所述一种或多种另外的抗体与例如一种或多种ActRII配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)、ActRII受体(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或I型受体(例如,ALK4)结合。在一些实施方案中,包含BMP6抗体的抗体组合不包含BMP9抗体。在一些实施方案中,包含BMP6抗体的抗体组合不包含激活素A抗体。

[0632] 在某些方面,ActRII-ALK4拮抗剂抗体或抗体组合是抑制至少BMP10的抗体。因此,在一些实施方案中,ActRII-ALK4拮抗剂抗体或抗体组合与至少BMP10结合。如本文所用,BMP10抗体(或者抗BMP10抗体)通常是指如下抗体,所述抗体可以以足够亲和力与BMP10结合,使得所述抗体可用作靶向BMP10中的诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中,BMP10抗体与无关的非BMP10蛋白的结合程度为所述抗体与BMP10的结合的小于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或小于约1%,如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量。在某些实施方案中,BMP10抗体与在来自不同物种的BMP10之间保守的BMP10表位结合。在某些优选实施方案中,抗BMP10抗体与人BMP10结合。在一些实施方案中,BMP10抗体可以抑制BMP10与I型和/或II型受体(例如,ActRIIA、ActRIIB和/或ALK4)结合,由此抑制BMP10介导的信号传导(例如,Smad信号传导)。在一些实施方案中,BMP10抗体可以抑制BMP10与共受体结合,由此抑制BMP10介导的信号传导(例如,Smad信号传导)。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种多特异性抗体(例如,双特异性抗体)及其用途,所述多特异性抗体与BMP10结合,并且进一步与例如一种或多种另外的ActRII配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)、ActRII受体(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或I型受体(例如,ALK4)结合。在一些实施方案中,与BMP10结合的多特异性抗体不结合或基本上不结合BMP9(例如,与BMP9结合的K_D大于1x 10^{-7}M或具有相对不大的结合,例如,约1x 10^{-8}M或约1x 10^{-9}M)。在一些实施方案中,与BMP10结合的多特异性抗体不结合或基本上不结合激活素A(例如,与激活素A结合的K_D大于1x 10^{-7}M或具有相对不大的结合,例如,约1x 10^{-8}M或约1x 10^{-9}M)。在一些实施方案中,本公开文本涉及抗体组合及其用途,其中所述抗体组合包含BMP10抗体和一种或多种另外的抗体,所述一种或多种另外的抗体与例如一种或多种另外的ActRII配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)、ActRII受体(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或I型受体(例如,ALK4)结合。在一些实施方案中,包含BMP10抗体的抗体组合不包含BMP9抗体。在一些实施方案中,包含BMP10抗体的抗体组合不包含激活素A抗体。

[0633] 在某些方面,ActRII-ALK4拮抗剂抗体或抗体组合是抑制至少ActRIIB的抗体。因此,在一些实施方案中,ActRII-ALK4拮抗剂抗体或抗体组合与至少ActRIIB结合。如本文所用,ActRIIB抗体(抗ActRIIB抗体)通常是指如下抗体,所述抗体以足够亲和力与ActRIIB结合,使得所述抗体可用作靶向ActRIIB中的诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中,抗ActRIIB抗体与无关的非ActRIIB蛋白的结合程度为所述抗体与ActRIIB的结合的小于约

10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％或小于约1％，如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质-蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量。在某些实施方案中，抗ActRIIB抗体与在来自不同物种的ActRIIB之间保守的ActRIIB表位结合。在某些优选实施方案中，抗ActRIIB抗体与人ActRIIB结合。在一些实施方案中，抗ActRIIB抗体可以抑制一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)与ActRIIB结合。在一些实施方案中，抗ActRIIB抗体是多特异性抗体(例如，双特异性抗体)，所述多特异性抗体与ActRIIB和一种或多种ActRII配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)、ActRII受体(例如，ActRIIA)和/或I型受体(例如，ALK4)结合。在一些实施方案中，本公开文本涉及抗体组合及其用途，其中所述抗体组合包含抗ActRIIB抗体和一种或多种另外的抗体，所述一种或多种另外的抗体与例如一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)、I型受体(例如，ALK4)和/或另外的II型受体(例如，ActRIIA)结合。应注意，ActRIIB与ActRIIA具有序列相似性，因此与ActRIIB结合的抗体在一些情况下也可以结合至和/或抑制ActRIIA。

[0634] 在某些方面，ActRII-ALK4拮抗剂抗体或抗体组合是抑制至少ActRIIA的抗体。因此，在一些实施方案中，ActRII-ALK4拮抗剂抗体或抗体组合与至少ActRIIA结合。如本文所用，ActRIIA抗体(抗ActRIIA抗体)通常是指如下抗体，所述抗体以足够亲和力与ActRIIA结合，使得所述抗体可用作靶向ActRIIA中的诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中，抗ActRIIA抗体与无关的非ActRIIA蛋白的结合程度为所述抗体与ActRIIA的结合的小于约10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％或小于约1％，如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质-蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量。在某些实施方案中，抗ActRIIA抗体与在来自不同物种的ActRIIA之间保守的ActRIIA表位结合。在某些优选实施方案中，抗ActRIIA抗体与人ActRIIA结合。在一些实施方案中，抗ActRIIA抗体可以抑制一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)与ActRIIA结合。在一些实施方案中，抗ActRIIA抗体是多特异性抗体(例如，双特异性抗体)，所述多特异性抗体与ActRIIA和一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)、I型受体(例如，ALK4)和/或另外的II型受体(例如，ActRIIB)结合。在一些实施方案中，本公开文本涉及抗体组合及其用途，其中所述抗体组合包含抗ActRIIA抗体和一种或多种另外的抗体，所述一种或多种另外的抗体与例如一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)、I型受体(例如，ALK4)和/或另外的II型受体(例如，ActRIIB)结合。应注意，ActRIIA与ActRIIB具有序列相似性，因此与ActRIIA结合的抗体在一些情况下也可以结合至和/或抑制ActRIIB。

[0635] 在某些方面，ActRII-ALK4拮抗剂抗体或抗体组合是抑制至少ALK4的抗体。因此，在一些实施方案中，ActRII-ALK4拮抗剂抗体或抗体组合与至少ALK4结合。如本文所用，ALK4抗体(抗ALK4抗体)通常是指如下抗体，所述抗体以足够的亲和力与ALK4结合，使得所述抗体可用作靶向ALK4中的诊断剂和/或治疗剂。在某些实施方案中，抗ALK4抗体与无关的非ALK4蛋白的结合程度为所述抗体与ALK4的结合的小于约10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％或小于约1％，如例如通过放射免疫测定(RIA)、Biacore或者其他蛋白质-蛋白质相互作用或结合亲和力测定所测量。在某些实施方案中，抗ALK4抗体与在来自不同物种的ALK4之间保守的ALK4表位结合。在某些优选实施方案中，抗ALK4抗体与人ALK4结合。在一

些实施方案中，抗ALK4抗体可以抑制一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)与ALK4结合。在一些实施方案中，抗ALK4抗体是多特异性抗体(例如，双特异性抗体)，所述多特异性抗体与ALK4和一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)和/或II型受体(例如，ActRIIA和/或ActRIIB)结合。在一些实施方案中，本公开文本涉及抗体组合及其用途，其中所述抗体组合包含抗ALK4抗体和一种或多种另外的抗体，所述一种或多种另外的抗体与例如一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)和/或II型受体(例如，ActRIIA和/或ActRIIB)结合。

[0636] 术语抗体在本文中以最广泛的含义使用，并且涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如，双特异性抗体)和抗体片段，只要其展现所需的抗原结合活性即可。抗体片段是指除了完整抗体以外的分子，其包含完整抗体的结合完整抗体所结合的抗原的一部分。抗体片段的例子包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')$_2$；双抗体；线性抗体；单链抗体分子(例如，scFv)；以及从抗体片段形成的多特异性抗体[参见例如，Hudson等人(2003)Nat.Med.9:129-134；Plückthun,The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编辑,(Springer-Verlag,New York),第269-315页(1994)；WO 93/16185；以及美国专利号5,571,894；5,587,458；和5,869,046]。双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段，它可以是二价的或双特异性的[参见例如，EP 404,097；WO 1993/01161；Hudson等人(2003)Nat.Med.9:129-134(2003)；以及Hollinger等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448]。三抗体和四抗体也描述于Hudson等人(2003)Nat.Med.9:129-134中。单结构域抗体是包含抗体的重链可变结构域的全部或一部分或者轻链可变结构域的全部或一部分的抗体片段。在某些实施方案中，单结构域抗体是人单结构域抗体[参见例如，美国专利号6,248,516]。本文所公开的抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。在某些实施方案中，本公开文本的抗体包含附接至所述抗体并且能够被检测到的标记(例如，标记可以是放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子)。在某些优选实施方案中，本公开文本的抗体是分离的抗体。在某些优选实施方案中，本公开文本的抗体是重组抗体。

[0637] 本文中的抗体可以属于任何类别。抗体的类别是指其重链所具有的恒定结构域或恒定区的类型。抗体有五种主要类别：IgA、IgD、IgE、IgG和IgM，并且这些类别中的若干个类别可以被进一步分为子类别(同种型)，例如IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1和IgA_2。对应于免疫球蛋白的不同类别的重链恒定结构域被称为α、δ、ε、γ和μ。

[0638] 通常，用于本文所公开方法中的抗体优选地以高结合亲和力特异性与其靶抗原结合。亲和力可以表示为K_D值并且反映固有的结合亲和力(例如，具有最小化的亲合力效应)。通常，结合亲和力是在体外(在无细胞环境中或细胞相关环境中)测量。本领域已知的许多测定(包括本文所公开的那些)中的任一种可以用于获得结合亲和力测量值，包括例如Biacore、放射性标记的抗原结合测定(RIA)和ELISA。在一些实施方案中，本公开文本的抗体与其靶抗原(例如，ActRIIA、ActRIIB、激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)结合的K_D至少为1x 10^{-7}或更强、1x10^{-8}或更强、1x10^{-9}或更强、1x10^{-10}或更强、1x10^{-11}或更强、1x10^{-12}或更强、1x10^{-13}或更强或者1x10^{-14}或更强。

[0639] 在某些实施方案中，K_D是通过用所关注抗体的Fab形式及其靶抗原进行的RIA来测

量，如以下测定所述。Fab对抗原的溶液结合亲和力是通过以下方式来测量：在一个滴定系列的未标记抗原的存在下用最低浓度的放射性标记的抗原(例如，^{125}I标记的)平衡Fab，然后用抗Fab抗体包衣的板捕获所结合抗原[参见例如，Chen等人(1999)J.Mol.Biol.293:865-881]。为了建立用于测定的条件，用捕获抗Fab抗体(例如，来自Cappel Labs)包衣多孔板(例如，来自ThermoScientificMICROTITER®)(例如，过夜)，并且之后用牛血清白蛋白优选地在室温(大约23℃)下封闭。在非吸附板中，将放射性标记的抗原与所关注Fab的连续稀释液混合[例如，与对抗VEGF抗体Fab-12的评估一致，在Presta等人，(1997)Cancer Res.57:4593-4599]。然后将所关注Fab优选地孵育过夜，但是孵育可以持续较长时间段(例如，约65小时)以确保达到平衡。之后，将混合物转移至捕获板以供优选地在室温下孵育约1小时。然后去除溶液，并且优选地用聚山梨醇酯20和PBS混合物将板洗涤若干次。在板干燥后，添加闪烁体(例如，来自Packard的MICROSCINT®)，并且在γ计数器(例如，来自Packard的TOPCOUNT®)上对板计数。

[0640] 根据另一个实施方案，KD是使用表面等离子体共振测定使用例如BIACORE®2000或BIACORE®3000(BIAcore,Inc.，皮斯卡塔韦，新泽西州)用固定化抗原CM5芯片以约10个反应单位(RU)来测量。简单来说，根据供应商的说明书，用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)激活羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片(CM5,BIACORE,Inc.)。例如，可以用10mM乙酸钠(pH 4.8)将抗原稀释至5μg/ml(约0.2μM)，之后以5μl/分钟的流速注射以达到大约10个反应单位(RU)的偶联蛋白。在抗原注射后，注射1M乙醇胺以封闭未反应基团。对于动力学测量，在含有0.05％聚山梨醇酯20(TWEEN-20®)表面活性剂的PBS(PBST)中以大约25μl/min的流速注射Fab的两倍连续稀释液(0.78nM至500nM)。使用例如简单的一对一Langmuir结合模型(BIACORE®评价软件3.2版)通过同时拟合缔合和解离传感图来计算缔合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。将平衡解离常数(K_D)计算为比率k_{off}/k_{on}[参见例如，Chen等人，(1999)J.Mol.Biol.293:865-881]。如果通过上述表面等离子体共振测定测得缔合速率超过例如$10^6M^{-1}s^{-1}$，则可以通过使用荧光淬灭技术测定缔合速率，所述荧光淬灭技术测量在PBS中在浓度递增的抗原存在下，20nM抗抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度(例如，激发＝295nm;发射＝340nm，16nm带通)的增加或降低，如在具有搅拌比色皿的光谱仪如配备停流附件(stop-flow)的分光光度计(Aviv Instruments)或8000系列SLM-AMINCO®分光光度计(ThermoSpectronic)中所测量。

[0641] 抗体片段可以通过多种技术来制备，包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞(例如，大肠杆菌或噬菌体)产生，如本文所述。人ActRIIA、ActRIIB、ALK4、激活素(激活素A、激活素B、激活素C和激活素E)、GDF11、GDF8、BMP10和BMP6的核酸和氨基酸序列是本领域中已知的。另外，用于生成抗体的多种方法是本领域中熟知的，其中一些描述于本文中。因此，用于根据本公开文本使用的抗体拮抗剂可以由本领域技术人员基于本领域的知识和本文提供的传授以常规方式制备。

[0642] 在某些实施方案中，本文提供的抗体是嵌合抗体。嵌合抗体是指如下抗体：其中重链和/或轻链的一部分衍生自特定来源或物种，而重链和/或轻链的其余部分衍生自不同的来源或物种。某些嵌合抗体描述于例如美国专利号4,816,567;以及Morrison等人，(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855中。在一些实施方案中，嵌合抗体包含非人可变区

(例如,衍生自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类动物(如猴子)的可变区)和人恒定区。在一些实施方案中,嵌合抗体是"类别转换"抗体,其中类别或子类别已经从亲代抗体的类别或子类别变化。通常,嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0643] 在某些实施方案中,本文所提供的嵌合抗体是人源化抗体。人源化抗体是指如下嵌合抗体,其包含来自非人超变区(HVR)的氨基酸残基和来自人框架区(FR)的氨基酸残基。在某些实施方案中,人源化抗体将包含至少一个(并且通常两个)可变结构域的基本上全部,其中全部或基本上全部HVR(例如,CDR)对应于非人抗体的那些,并且全部或基本上全部FR对应于人抗体的那些。人源化抗体任选地可以包含源自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体(例如,非人抗体)的"人源化形式"是指已经经历人源化的抗体。人源化抗体和制备它们的方法综述于例如Almagro和Fransson(2008)Front.Biosci.13:1619-1633中,并且进一步描述于例如以下文献中:Riechmann等人,(1988)Nature 332:323-329;Queen等人(1989)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 86:10029-10033;美国专利号5,821,337;7,527,791;6,982,321;和7,087,409;Kashmiri等人,(2005)Methods 36:25-34[描述SDR(a-CDR)移植];Padlan,Mol.Immunol.(1991)28:489-498(描述"表面重修");Dall'Acqua等人(2005)Methods 36:43-60(描述"FR混编");Osbourn等人(2005)Methods 36:61-68;以及Klimka等人Br.J.Cancer(2000)83:252-260(描述用于FR混编的"导向选择"方法)。可以用于人源化的人框架区包括但不限于使用"最佳拟合"方法选择的框架区[参见例如,Sims等人(1993)J.Immunol.151:2296];源自轻链或重链可变区的特定亚组的人抗体共有序列的框架区[参见例如,Carter等人(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285;以及Presta等人(1993)J.Immunol.,151:2623];人成熟(体细胞突变的)框架区或人种系框架区[参见例如,Almagro和Fransson(2008)Front.Biosci.13:1619-1633];以及源自筛选FR文库的框架区[参见例如,Baca等人,(1997)J.Biol.Chem.272:10678-10684;以及Rosok等人,(1996)J.Biol.Chem.271:22611-22618]。

[0644] 在某些实施方案中,本文所提供的抗体是人抗体。人抗体可以使用本领域已知的多种技术来产生。人抗体大体上描述于van Dijk和van de Winkel(2008)Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001)以及Lonberg,Curr.Opin.Immunol.20:450-459中。例如,人抗体可以通过将免疫原(例如,ActRII-ALK4配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)、ActRII受体(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或I型受体(例如,ALK4))施用至转基因动物来制备,所述转基因动物已经被修饰以响应于抗原激发而产生完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。这样的动物通常含有人免疫球蛋白基因座的全部或一部分,其置换内源免疫球蛋白基因座,或者其存在于染色体外或随机整合至动物染色体中。在这样的转基因动物中,通常已经使内源免疫球蛋白基因座失活。对于用于从转基因动物获得人抗体的方法的综述参见例如Lonberg(2005)Nat.Biotech.23:1117-1125;美国专利号6,075,181和6,150,584(描述XENOMOUSE™技术);美国专利号5,770,429(描述HuMab®技术);美国专利号7,041,870(描述K-M MOUSE®技术);以及美国专利申请公开号2007/0061900(描述VelociMouse®技术)。来自由这样的动物产生的完整抗体的人可变区可以例如通过与不同的人恒定区组合来进行进一步修饰。

[0645] 本文所提供的人抗体也可以通过基于杂交瘤的方法来制备。已经描述用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人种间骨髓瘤细胞系[参见例如,Kozbor J.Immunol.,

(1984)133:3001;Brodeur等人(1987)Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,第51-63页,Marcel Dekker,Inc.,New York;以及Boerner等人(1991)J.Immunol.,147:86]。通过人B细胞杂交瘤技术生成的人抗体也描述于Li等人,(2006)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:3557-3562中。另外的方法包括描述于例如以下文献中的那些:美国专利号7,189,826(描述从杂交瘤细胞系产生单克隆人IgM抗体)以及Ni,Xiandai Mianyixue(2006)26(4):265-268(2006)(描述人-人杂交瘤)。人杂交瘤技术(三源杂交瘤(Trioma)技术)也描述于以下文献中:Vollmers和Brandlein(2005)Histol.Histopathol.,20(3):927-937(2005);以及Vollmers和Brandlein(2005)Methods Find Exp.Clin.Pharmacol.,27(3):185-91。本文所提供的人抗体还可以通过分离选自人源噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列来生成。然后可以将这样的可变结构域序列与所需人恒定结构域组合。用于从抗体文库选择人抗体的技术是本领域中已知的并且描述于本文中。

[0646] 例如,本公开文本的抗体可以通过针对具有所需的一种或多种活性的抗体筛选组合文库来分离。本领域已知多种用于产生噬菌体展示文库和针对具有所需结合特征的抗体筛选此类文库的方法。这样的方法综述于例如以下文献中:Hoogenboom等人(2001),Methods in Molecular Biology 178:1-37;O'Brien等人编辑,Human Press,Totowa,N.J.,并且进一步描述于例如以下文献中:McCafferty等人(1991)Nature 348:552-554;Clackson等人,(1991)Nature 352:624-628;Marks等人(1992)J.Mol.Biol.222:581-597;Marks和Bradbury(2003),Methods in Molecular Biology 248:161-175,Lo编辑,Human Press,Totowa,N.J.;Sidhu等人(2004)J.Mol.Biol.338(2):299-310;Lee等人(2004)J.Mol.Biol.340(5):1073-1093;Fellouse(2004)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472;以及Lee等人(2004)J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132。

[0647] 在某些噬菌体展示方法中,通过聚合酶链式反应(PCR)单独克隆VH和VL基因库,并在噬菌体文库中随机重组,然后可以针对抗原结合噬菌体对其进行筛选,如Winter等人(1994)Ann.Rev.Immunol.,12:433-455中所述。噬菌体通常展示作为单链Fv(scFv)片段或作为Fab片段的抗体片段。来自免疫的来源的文库提供针对免疫原(例如,ActRII配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)、ActRII受体(ActRIIA和/或ActRIIB)和/或I型受体(例如,ALK4))的高亲和力抗体而无需构建杂交瘤。可替代地,可以克隆幼稚库(例如,从人)以在不进行任何免疫的情况下提供针对众多种非自身抗原以及自身抗原的抗体的单一来源,如Griffiths等人(1993)EMBO J,12:725-734中所述。最后,还可以通过以下方式合成制备幼稚文库:从干细胞克隆未重排的V基因区段,并使用含有随机序列的PCR引物编码高可变CDR3区域并在体外完成重排,如Hoogenboom和Winter(1992)J.Mol.Biol.,227:381-388中所述。描述人抗体噬菌体文库的专利公开案包括例如:美国专利号5,750,373以及美国专利公开号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936和2009/0002360。

[0648] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是多特异性抗体,例如,双特异性抗体。具有对一种或多种(例如,两种、三种、四种、五种、六种或更多种)抗原上的至少两个不同表位(例如,两个、三个、四个、五个或六个或更多个)的结合特异性的多特异性抗体(通常单克隆抗体)。

[0649] 用于制备多特异性抗体的技术包括但不限于具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链/轻链对的重组共表达[参见例如,Milstein和Cuello(1983)Nature 305:537;国际专利公开号WO 93/08829;以及Traunecker等人(1991)EMBO J.10:3655,以及美国专利号5,731,168(“杵臼结构”工程化)]。多特异性抗体还可以通过以下方式来制备:工程化静电转向效应用于制备抗体Fc-异二聚分子(参见例如,WO 2009/089004A1):交联两种或更多种抗体或片段[参见例如,美国专利号4,676,980;以及Brennan等人(1985)Science,229:81];使用亮氨酸拉链产生双特异性抗体[参见例如,Kostelny等人(1992)J.Immunol.,148(5):1547-1553];使用“双抗体”技术用于制备双特异性抗体片段[参见例如,Hollinger等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448];使用单链Fv(sFv)二聚体[参见例如,Gruber等人(1994)J.Immunol.,152:5368];以及制备三特异性抗体(参见例如,Tutt等人(1991)J.Immunol.147:60)。可以将多特异性抗体制备为全长抗体或抗体片段。具有三个或更多个抗原结合位点的工程化抗体(包括“章鱼抗体”)也包括于本文中[参见例如,US 2006/0025576A1]。

[0650] 在某些实施方案中,本文公开的抗体是单克隆抗体。单克隆抗体是指从基本上同质的抗体群获得的抗体,即构成所述群的单独抗体是相同的和/或结合相同表位,例如含有天然存在的突变或在单克隆抗体制剂的产生期间出现的可能的变体抗体除外,此类变体通常以少量存在。与通常包括针对不同表位的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,单克隆抗体制剂的每种单克隆抗体针对抗原上的单个表位。因此,修饰语“单克隆”表示从基本上同质的抗体群体获得的抗体的特征,并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,要根据本发明方法使用的单克隆抗体可以通过多种技术来制备,包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法和利用含有人免疫球蛋白基因座的全部或部分的转基因动物的方法,此类方法和用于制备单克隆抗体的其他示例性方法描述于本文中。

[0651] 例如,通过使用源自激活素的免疫原,抗蛋白质/抗肽抗血清或单克隆抗体可以通过标准方案来制备[参见例如,Antibodies:A Laboratory Manual,Harlow和Lane编辑(1988)Cold Spring Harbor Press:1988]。哺乳动物如小鼠、仓鼠或兔可以用免疫原形式的激活素多肽或融合蛋白进行免疫,所述免疫原形式的激活素多肽是能够引发抗体反应的抗原性片段。用于赋予蛋白质或肽免疫原性的技术包括与载体缀合或本领域公知的其他技术。激活素多肽的免疫原性部分可以在佐剂的存在下施用。可以通过检测血浆或血清中的抗体效价来监测免疫进程。能以免疫原作为抗原,使用标准ELISA或其他免疫测定评估抗体产生水平和/或结合亲和力水平。

[0652] 在用激活素的抗原制剂对动物进行免疫后,可以获得抗血清,并且如果需要,可以从所述血清分离多克隆抗体。为了产生单克隆抗体,可以从经免疫动物收获产生抗体的细胞(淋巴细胞)并通过标准体细胞融合程序与永生细胞(如骨髓瘤细胞)融合,以产生杂交瘤细胞。这样的技术是本领域中熟知的,并且包括例如杂交瘤技术[参见例如,Kohler和Milstein(1975)Nature,256:495-497]、人B细胞杂交瘤技术[参见例如,Kozbar等人(1983)Immunology Today,4:72],以及EBV-杂交瘤技术以产生人单克隆抗体[Cole等人(1985)Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,Inc.第77-96页]。可以针对可与激活素多肽特异性反应的抗体的产生以免疫化学方式筛选杂交瘤细胞,并且可以从包含这样的杂交瘤细胞的培养物分离单克隆抗体。

[0653] 在某些实施方案中，可以将一个或多个氨基酸修饰引入本文提供的抗体的Fc区中，从而生成Fc区变体。所述Fc区变体可以包含含有在一个或多个氨基酸位置处的氨基酸修饰(例如，取代、缺失和/或添加)的人Fc区序列(例如，人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区)。

[0654] 例如，本公开文本考虑如下抗体变体，所述抗体变体具有一些但非全部效应子功能，这使其成为多种应用的期望候选者，在所述应用中抗体在体内的半衰期是重要的，但某些效应子功能[例如，补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)]是不需要的或有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定以确认CDC和/或ADCC活性的降低/耗尽。例如，可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体缺少FcγR结合(因此可能缺少ADCC活性)，但是保留FcRn结合能力。介导ADCC的原代细胞NK细胞仅表达FcγRIII，而单核细胞表达FcγRI、FcγRII和FcγRIII。造血细胞上的FcR表达总结于例如Ravetch和Kinet(1991)Annu.Rev.Immunol.9:457-492中。用于评估目的分子的ADCC活性的体外测定的非限制性例子描述于以下文献中：美国专利号5,500,362；Hellstrom,I.等人(1986)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:7059-7063]；Hellstrom,I等人(1985)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:1499-1502；美国专利号5,821,337；Bruggemann,M.等人(1987)J.Exp.Med.166:1351-1361。可替代地，可以采用非放射性测定方法(例如，ACTI™，用于流式细胞术的非放射性细胞毒性测定；CellTechnology,Inc.，山景城，加利福尼亚州；和CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定，Promega，麦迪逊，威斯康辛州)。用于这样的测定的有用效应细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可替代地或另外地，可以在体内评估目的分子的ADCC活性，例如，在动物模型中评估，如Clynes等人(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:652-656中披露的动物模型。还可以进行C1q结合测定以确认抗体不能结合C1q，并且因此缺少CDC活性[参见例如，WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA]。为了评估补体激活，可以进行CDC测定[参见例如，Gazzano-Santoro等人(1996)J.Immunol.Methods 202:163；Cragg,M.S.等人(2003)Blood 101:1045-1052；以及Cragg,M.S.和M.J.Glennie(2004)Blood 103:2738-2743]。还可以使用本领域中已知的方法来进行FcRn结合和体内清除/半衰期确定[参见例如，Petkova,S.B.等人(2006)Intl.Immunol.18(12):1759-1769]。具有降低的效应子功能的本公开文本的抗体包括具有Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一个或多个的取代的那些(美国专利号6,737,056)。这样的Fc突变体包括具有氨基酸位置265、269、270、297和327中的两个或更多个处的取代的Fc突变体，包括具有残基265和297的至丙氨酸的取代的所谓的“DANA”Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

[0655] 在某些实施方案中，可能需要产生半胱氨酸工程化的抗体，例如，“thioMAb”，其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基取代。在特定实施方案中，被取代的残基存在于抗体的可及位点处。通过用半胱氨酸取代那些残基，由此将反应性硫醇基定位于抗体的可及位点处，并且可以用于将抗体缀合至其他部分，如药物部分或接头-药物部分，以产生免疫缀合物，如本文中进一步所述。在某些实施方案中，可以用半胱氨酸取代以下残基中的任何一个或多个：轻链的V205(Kabat编号)；重链的A118(EU编号)；和重链Fc区的S400(EU编号)。半胱氨酸工程化的抗体可以如例如美国专利号7,521,541中所述来生成。

[0656] 另外，用于筛选抗体以鉴定期望的抗体的技术可能影响所获得抗体的特性。例如，如果要将抗体用于结合溶液中的抗原，可能需要测试溶液结合。多种不同的技术可用于测

试抗体与抗原之间的相互作用,以鉴定特别期望的抗体。此类技术包括ELISA、表面等离子体共振结合测定(例如,Biacore结合测定,Biacore AB,乌普萨拉,瑞典)、夹心式测定(例如,顺磁性珠粒系统,IGEN International,Inc.,盖瑟斯堡,马里兰州)、蛋白质印迹、免疫沉淀测定和免疫组织化学。

[0657] 在某些实施方案中,考虑了本文所提供的抗体和/或结合多肽的氨基酸序列变体。例如,可能需要改善抗体和/或结合多肽的结合亲和力和/或其他生物学特性。抗体和/或结合多肽的氨基酸序列变体可以通过将适当修饰引入编码抗体和/或结合多肽的核苷酸序列中或者通过肽合成来制备。这样的修饰包括例如抗体和/或结合多肽的氨基酸序列内的残基的缺失和/或插入和/或取代。可以进行缺失、插入和取代的任何组合以获得最终构建体,条件是所述最终构建体具有所需特征,例如,靶结合(例如,以及激活素如激活素E和/或激活素C结合)。

[0658] 可以在HVR中进行改变(例如,取代),以例如改善抗体亲和力。这样的改变可以在HVR“热点”(即,在体细胞成熟过程期间以高频率经历突变的密码子所编码的残基)[参见例如,Chowdhury(2008)Methods Mol.Biol.207:179-196(2008)]和/或SDR(a-CDR)中进行,并测试所得变体VH或VL的结合亲和力。通过构建二级文库并从二级文库重新选择进行亲和力成熟已经描述于本领域中[参见例如,Hoogenboom等人,Methods in Molecular Biology 178:1-37;O'Brien等人编辑,Human Press,Totowa,N.J.,(2001)]。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法中的任何一种(例如,易错PCR、链改组或寡核苷酸指导的诱变),将多样性引入选择进行成熟的可变基因中。然后建立二级文库。然后筛选所述文库以鉴定具有所需亲和力的任何抗体变体。引入多样性的另一种方法涉及HVR指导的方法,其中随机化若干个HVR残基(例如,一次4-6个残基)。抗原结合涉及的HVR残基可以使用例如丙氨酸扫描诱变或建模来特异性地鉴定。特别地,通常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0659] 在某些实施方案中,取代、插入或缺失可以发生在一个或多个HVR中,只要此类改变不显著降低抗体结合至抗原的能力即可。例如,不显著降低结合亲和力的保守改变(例如,如本文所提供的保守取代)可以在HVR中进行。此类改变可以位于HVR“热点”或SDR的外部。在上文提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中,每个HVR未改变,或者含有不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0660] 鉴定抗体和/或结合多肽中可以被靶向用于诱变的残基或区域的有用方法被称为“丙氨酸扫描诱变”,如Cunningham和Wells(1989)Science,244:1081-1085所述。在此方法中,鉴定残基或靶残基组(例如,带电荷的残基,如Arg、Asp、His、Lys和Glu)并用中性或带负电荷的氨基酸(例如,丙氨酸或聚丙氨酸)替代以确定抗体-抗原相互作用是否受到影响。可以在所述氨基酸位置处引入进一步的取代,证明对初始取代的功能敏感性。可替代地或另外地,确定抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴定所述抗体与抗原之间的接触点。可以靶向或消除此类接触残基和邻近残基作为取代候选物。可以筛选变体以确定它们是否含有所需特性。

[0661] 氨基酸序列插入包括氨基和/或羧基末端融合,长度范围从一个残基到含有一百个或更多个残基的多肽,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有N末端甲硫氨酰残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的N末端或C末端与酶(例如,对于ADEPT)或增加抗体的血清半衰期的多肽的融合物。

[0662] 在某些实施方案中，本文所提供的抗体和/或结合多肽可以进一步进行修饰以含有本领域已知并且容易获得的其他非蛋白质性部分。适于衍生化抗体和/或结合多肽的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性例子包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)、和葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、聚丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如，甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛由于其在水中的稳定性而可以在制造中具有优势。所述聚合物可以具有任何分子量，并且可以有支链或无支链。附接至抗体和/或结合多肽的聚合物的数目可以变化，并且如果附接超过一种聚合物，则它们可以是相同或不同的分子。通常，用于衍生化的聚合物的数量和/或类型可以基于包括但不限于以下的考虑因素来确定：要改善的抗体和/或结合多肽的特定特性或功能、抗体衍生物和/或结合多肽衍生物是否将要用于在确定条件下的疗法中。

[0663] 4.小分子拮抗剂

[0664] 在某些方面，要根据本文公开的方法和用途(例如，治疗、预防心力衰竭(例如，扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或者心力衰竭的一种或多种并发症，或降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的进展率和/或严重性)使用的ActRII-ALK4拮抗剂是小分子(ActRII-ALK4小分子拮抗剂)或小分子拮抗剂的组合。ActRII-ALK4小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合可以抑制例如一种或多种ActRII配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)、ActRII受体(ActRIIA和/或ActRIIB)、I型受体(例如，ALK4)、II型受体(例如，ActRIIB和/或ActRIIA)和/或一种或多种信号传导因子。在一些实施方案中，ActRII-ALK4小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合抑制由一种或多种ActRII-ALK4配体介导的信号传导，例如，如在基于细胞的测定(如本文所述的那些)中所确定。如本文所述，ActRII-ALK4小分子拮抗剂可以单独地或与一种或多种支持疗法或活性剂组合用于治疗、预防心力衰竭或降低心力衰竭的进展率和/或严重性，特别是治疗、预防一种或多种心力衰竭相关并发症或降低一种或多种心力衰竭相关并发症的进展率和/或严重性。

[0665] 在一些实施方案中，ActRII-ALK4小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合抑制至少GDF11，任选地进一步抑制以下中的一种或多种：GDF8、激活素(例如，激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、激活素BC、激活素AE和/或激活素BE)、BMP6、BMP10、ActRIIA、ActRIIB、ALK4和一种或多种Smad信号传导因子。在一些实施方案中，ActRII-ALK4小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合抑制至少GDF8，任选地进一步抑制以下中的一种或多种：GDF11、激活素(例如，激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、激活素BC、激活素AE和/或激活素BE)、BMP6、BMP10、ActRIIA、ActRIIB、ALK4和一种或多种Smad信号传导因子。在一些实施方案中，ActRII-ALK4小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合抑制至少激活素(激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、激活素BC、激活素AE和/或激活素BE)，任选地进一步抑制以下中的一种或多种：GDF8、GDF11、BMP6、BMP10、ActRIIA、ActRIIB、ALK4和一种或多种Smad信号传导因子。在一些实施方案中，ActRII-ALK4小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合抑制至少激活素B，任选地进一步抑制以下中的一种或多种：GDF8、GDF11、BMP6、BMP10、ActRIIA、ActRIIB、ALK4和一种或多种Smad信号传导因子。在一些

实施方案中,ActRII-ALK4小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合抑制至少BMP6,任选地进一步抑制以下中的一种或多种:GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、激活素BC、激活素AE和/或激活素BE)、GDF11、BMP10、ActRIIA、ActRIIB、ALK4和一种或多种Smad蛋白(例如,Smad 2和Smad 3)。在一些实施方案中,ActRII-ALK4小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合抑制至少BMP10,任选地进一步抑制以下中的一种或多种:GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、激活素BC、激活素AE和/或激活素BE)、BMP6、GDF11、ActRIIA、ActRIIB、ALK4和一种或多种Smad信号传导因子。在一些实施方案中,ActRII-ALK4小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合抑制至少ActRIIA,任选地进一步抑制以下中的一种或多种:GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、激活素BC、激活素AE和/或激活素BE)、BMP6、GDF11、BMP10、ActRIIB、ALK4和一种或多种Smad信号传导因子。在一些实施方案中,ActRII-ALK4小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合抑制至少ActRIIB,任选地进一步抑制以下中的一种或多种:GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、激活素BC、激活素AE和/或激活素BE)、BMP6、GDF11、BMP10、ActRIIA、ALK4和一种或多种Smad信号传导因子。在一些实施方案中,ActRII-ALK4小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合抑制至少ALK4,任选地进一步抑制以下中的一种或多种:GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、激活素BC、激活素AE和/或激活素BE)、BMP6、GDF11、BMP10、ActRIIA、ActRIIB和一种或多种Smad信号传导因子。在一些实施方案中,如本文公开的ActRII-ALK4小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合不抑制或者基本上不抑制BMP9。在一些实施方案中,如本文公开的ActRII-ALK4小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合不抑制或者基本上不抑制激活素A。

[0666] ActRII-ALK4小分子拮抗剂可以是直接或间接抑制剂。例如,间接小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合可以抑制至少一种或多种ActRII-ALK4配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)、I型受体(例如,ALK4)、II型受体(例如,ActRIIA和/或ActRIIB)和/或一种或多种下游信号传导组分(例如,Smad)的表达(例如,转录、翻译、细胞分泌或其组合)。可替代地,直接小分子拮抗剂或小分子拮抗剂的组合可以直接结合至并抑制例如一种或多种ActRII-ALK4配体(例如,激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)、I型受体(例如,ALK4)、II型受体(例如,ActRIIA和/或ActRIIB)和/或一种或多种下游信号传导组分(例如,Smad)。一种或多种间接ActRII-ALK4小分子拮抗剂与一种或多种直接ActRII-ALK4小分子拮抗剂的组合可以根据本文公开的方法来使用。

[0667] 本公开文本的结合小分子拮抗剂可以使用已知的方法来鉴定和化学合成(参见例如,PCT公开号WO 00/00823和WO 00/39585)。通常,本公开文本的小分子拮抗剂的大小通常低于约2000道尔顿,可替代地大小低于约1500、750、500、250或200道尔顿,其中此类有机小分子能够优选地特异性结合至如本文所述的多肽。这些小分子拮抗剂可以使用熟知技术在不过度实验的情况下加以鉴定。就此而言,应注意,针对能够结合至多肽靶标的分子筛选有机小分子文库的技术是本领域公知的(参见例如,国际专利公开号WO 00/00823和WO 00/39585)。

[0668] 本公开文本的结合有机小分子可以是例如醛、酮、肟、腙、缩氨基脲、卡巴肼、伯胺、仲胺、叔胺、N-取代的肼、酰肼、醇、醚、硫醇、硫醚、二硫化物、羧酸、酯、酰胺、脲、氨基甲酸

酯、碳酸酯、缩酮、硫代缩酮、缩醛、硫代缩醛、芳基卤、芳基磺酸酯、烷基卤、烷基磺酸酯、芳香族化合物、杂环化合物、苯胺、烯烃、炔烃、二醇、氨基醇、噁唑烷、噁唑啉、噻唑烷、噻唑啉、烯胺、磺酰胺、环氧化物、氮丙啶、异氰酸酯、磺酰氯、重氮化合物和酰基氯。

[0669] 5.多核苷酸拮抗剂

[0670] 在某些方面，要根据本文公开的方法和用途(例如，治疗、预防心力衰竭(例如，扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或者心力衰竭的一种或多种并发症，或降低心力衰竭或心力衰竭的一种或多种并发症的进展率和/或严重性)使用的ActRII-ALK4拮抗剂是多核苷酸(ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂)或多核苷酸的组合。ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合可以抑制例如一种或多种ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP6、BMP10)、I型受体(例如，ALK4)、II型受体(例如，ActRIIA和/或ActRIIB)和/或下游信号传导组分(例如，Smad)。在一些实施方案中，ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合抑制由一种或多种ActRII-ALK4配体介导的信号传导，例如，如在基于细胞的测定(如本文所述的那些)中所确定。如本文所述，ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂可以单独地或与一种或多种支持疗法或活性剂组合用于治疗、预防心力衰竭(例如，扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低心力衰竭的进展率和/或严重性)，特别是治疗、预防一种或多种心力衰竭相关并发症或降低一种或多种心力衰竭相关并发症的进展率和/或严重性。

[0671] 在一些实施方案中，ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合抑制至少GDF11，任选地进一步抑制以下中的一种或多种：GDF8、激活素(例如，激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、激活素BC、激活素AE和/或激活素BE)、BMP6、BMP10、ActRIIA、ActRIIB、ALK4和一种或多种Smad信号传导因子。在一些实施方案中，ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合抑制至少GDF8，任选地进一步抑制以下中的一种或多种：GDF11、激活素(例如，激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、激活素BC、激活素AE和/或激活素BE)、BMP6、BMP10、ActRIIA、ActRIIB、ALK4和一种或多种Smad信号传导因子。在一些实施方案中，ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合抑制至少激活素(激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、激活素BC、激活素AE和/或激活素BE)，任选地进一步抑制以下中的一种或多种：GDF8、GDF11、BMP6、BMP10、ActRIIA、ActRIIB、ALK4和一种或多种Smad信号传导因子。在一些实施方案中，ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合抑制至少激活素B，任选地进一步抑制以下中的一种或多种：GDF8、GDF11、BMP6、BMP10、ActRIIA、ActRIIB、ALK4和一种或多种Smad信号传导因子。在一些实施方案中，ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合抑制至少BMP6，任选地进一步抑制以下中的一种或多种：GDF8、激活素(例如，激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、激活素BC、激活素AE和/或激活素BE)、GDF11、BMP10、ActRIIA、ActRIIB、ALK4和一种或多种Smad蛋白信号传导因子。在一些实施方案中，ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合抑制至少BMP10，任选地进一步抑制以下中的一种或多种：GDF8、激活素(例如，激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、激活素BC、激活素AE和/或激活素BE)、BMP6、GDF11、ActRIIA、ActRIIB、ALK4和一种或多种Smad信号传导因子。在一些实施方案中，ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合抑制至少ActRIIA，任选地进一步抑制以下中的一种或多

种:GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、激活素BC、激活素AE和/或激活素BE)、BMP6、GDF11、BMP10、ActRIIB、ALK4和一种或多种Smad信号传导因子。在一些实施方案中,ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合抑制至少ActRIIB,任选地进一步抑制以下中的一种或多种:GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、激活素BC、激活素AE和/或激活素BE)、BMP6、GDF11、ActRIIA、BMP10、ALK4和一种或多种Smad信号传导因子。在一些实施方案中,ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合抑制至少ALK4,任选地进一步抑制以下中的一种或多种:GDF8、激活素(例如,激活素A、激活素B、激活素C、激活素E、激活素AB、激活素AC、激活素BC、激活素AE和/或激活素BE)、BMP6、GDF11、ActRIIA、ActRIIB、BMP10和一种或多种Smad信号传导因子。在一些实施方案中,如本文公开的ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合不抑制或者基本上不抑制BMP9。在一些实施方案中,如本文公开的ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂或多核苷酸拮抗剂的组合不抑制或者基本上不抑制激活素A。

[0672] 在一些实施方案中,本公开文本的多核苷酸拮抗剂可以是反义核酸、RNAi分子[例如,小干扰RNA(siRNA)、小发夹RNA(shRNA)、微小RNA(miRNA)]、适配体和/或核酶。人GDF11、GDF8、激活素(激活素A、激活素B、激活素C和激活素E)、BMP6、ActRIIA、ActRIIB、BMP10、ALK4和Smad信号传导因子的核酸和氨基酸序列是本领域中已知的。另外,生成多核苷酸拮抗剂的许多不同方法是本领域中熟知的。因此,用于根据本公开文本使用的多核苷酸拮抗剂可以由本领域技术人员基于本领域的知识和本文提供的传授以常规方式来制备。

[0673] 可以使用反义技术通过反义DNA或RNA或者通过三螺旋形成来控制基因表达。反义技术论述于例如以下文献中:Okano(1991)J.Neurochem.56:560;Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression,CRC Press,Boca Raton,Fla.(1988)。三螺旋形成论述于例如以下文献中:Cooney等人(1988)Science 241:456;以及Dervan等人,(1991)Science 251:1300。所述方法是基于多核苷酸与互补DNA或RNA的结合。在一些实施方案中,反义核酸包含与本文公开的基因的RNA转录物的至少一部分互补的单链RNA或DNA序列。然而,虽然绝对互补性是优选的,但是并不需要。

[0674] 本文中所提及的“与RNA的至少一部分互补的”序列意指与RNA具有足够互补性,从而能够与所述RNA杂交形成稳定双链体的序列;在本文所公开的基因的双链反义核酸的情况下,可以因此测试双链体DNA的单链,或者可以测定三链体形成。杂交的能力将取决于反义核酸的互补性程度和长度二者。通常,杂交核酸越大,其可以含有的与RNA的碱基错配越多,并且仍然形成稳定的双链体(或如所述情况可以是三链体)。本领域技术人员可以通过使用标准程序确定可耐受的错配程度,以确定所杂交复合物的解链温度。

[0675] 与信使的5’端(例如,直至并且包括AUG起始密码子的5’非翻译序列)互补的多核苷酸应最有效地抑制翻译。然而,已经显示与mRNA的3’非翻译序列互补的序列也有效抑制mRNA的翻译[参见例如,Wagner,R.,(1994)Nature 372:333-335]。因此,与本公开文本的基因的5’或3’非翻译非编码区互补的寡核苷酸可以在反义方法中用于抑制内源mRNA的翻译。与mRNA的5’非翻译区互补的多核苷酸应包括AUG起始密码子的补体。与mRNA编码区互补的反义多核苷酸是不太有效的翻译抑制剂,但是可以根据本公开文本的方法来使用。不论是设计为与本公开文本的mRNA的5’区、3’区还是编码区杂交,反义核酸的长度应为至少六个核苷酸,并且优选为长度范围为6至约50个核苷酸的寡核苷酸。在特定方面,所述寡核苷酸

为至少10个核苷酸、至少17个核苷酸、至少25个核苷酸或至少50个核苷酸。

[0676] 在一个实施方案中，本公开文本的反义核酸是通过从外源序列转录而在细胞内产生。例如，载体或其部分发生转录，从而产生本公开文本的基因的反义核酸(RNA)。这样的载体将含有编码所需反义核酸的序列。这样的载体可以保持游离型或变为染色体整合的，只要其可以被转录以产生所需的反义RNA即可。这样的载体可以通过本领域的重组DNA技术方法标准来构建。载体可以是用于在脊椎动物细胞中复制和表达的质粒、病毒或本领域已知的其他载体。编码本公开文本的所需基因的序列或其片段的表达可以通过本领域已知作用于脊椎动物(优选地人)细胞中的任何启动子来进行。这样的启动子可以是诱导型或组成型的。这样的启动子包括但不限于SV40早期启动子区域[参见例如，Benoist和Chambon(1981)Nature 290:304-310]、劳斯肉瘤病毒的3'长末端重复中所含的启动子[参见例如，Yamamoto等人(1980)Cell 22:787-797]、疱疹胸苷启动子[参见例如，Wagner等人(1981)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.78:1441-1445]以及金属硫蛋白基因的调节序列[参见例如，Brinster等人(1982)Nature 296:39-42]。

[0677] 在一些实施方案中，多核苷酸拮抗剂是靶向以下中的一种或多种的表达的干扰RNA(RNAi)分子：GDF11、GDF8、激活素(激活素A、激活素B、激活素C和激活素E)、BMP6、ActRIIA、ActRIIB、BMP10、ALK4和Smad信号传导因子。RNAi是指干扰所靶向的mRNA的表达的RNA的表达。具体来说，RNAi通过经siRNA(小干扰RNA)与特定mRNA相互作用使所靶向基因沉默。然后靶向ds RNA复合物以供细胞降解。siRNA分子是长度为10至50个核苷酸的双链RNA双链体，其干扰足够互补(例如，与所述基因具有至少80％同一性)的靶基因的表达。在一些实施方案中，siRNA分子包含与靶基因的核苷酸序列至少85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的核苷酸序列。

[0678] 另外的RNAi分子包括短发夹RNA(shRNA)；以及短干扰发夹和微小RNA(miRNA)。shRNA分子含有来自靶基因的通过环连接的有义和反义序列。将shRNA从核转运至胞质中，并且其与mRNA一起降解。Pol III或U6启动子可以用于表达RNA以供进行RNAi。Paddison等人[Genes&Dev.(2002)16:948-958,2002]已经使用折叠成发夹的小RNA分子作为影响RNAi的手段。因此，这样的短发夹RNA(shRNA)分子也有利地用于本文所述的方法中。功能shRNA的茎和环的长度是变化的；在不影响沉默活性的情况下，茎长度可以在约25至约30nt范围内的任何位置，并且环大小可以介于4至约25nt范围内。虽然不希望受任何特定理论的束缚，但是相信，这些shRNA与DICER RNA酶的双链RNA(dsRNA)产物相似，并且在任何事件中，具有抑制特定基因表达的相同能力。shRNA可以从慢病毒载体表达。miRNA是长度为约10至70个核苷酸的单链RNA，其首先转录为特征为“茎-环”结构的前miRNA，随后在通过RISC进一步加工后被加工为成熟miRNA。

[0679] 介导RNAi的分子(包括但不限于siRNA)可以在体外通过以下方式产生：通过化学合成(Hohjoh,FEBS Lett 521:195-199,2002)、dsRNA的水解(Yang等人,Proc Natl Acad Sci USA 99:9942-9947,2002)、通过使用T7 RNA聚合酶的体外转录(Donzeet等人,Nucleic Acids Res 30:e46,2002;Yu等人,Proc Natl Acad Sci USA 99:6047-6052,2002)和通过使用诸如大肠杆菌RNA酶III等核酸酶水解双链RNA(Yang等人,Proc Natl Acad Sci USA99:9942-9947,2002)。

[0680] 根据另一个方面，本公开文本提供了多核苷酸拮抗剂，包括但不限于诱饵DNA、双

链DNA、单链DNA、复合DNA、包封DNA、病毒DNA、质粒DNA、裸RNA、包封RNA、病毒RNA、双链RNA、能够产生RNA干扰的分子或其组合。

[0681] 在一些实施方案中，本公开文本的多核苷酸拮抗剂是适配体。适配体是结合至并来自与靶分子特异性结合的三级结构的核酸分子，包括双链DNA和单链RNA分子。适配体的生成和治疗用途是本领域中充分确立的(参见例如，美国专利号5,475,096)。关于适配体的其他信息可见于美国专利申请公开号20060148748。核酸适配体是使用本领域已知的方法来选择，例如通过指数富集配体系统进化(SELEX)法来选择。SELEX是用于具有与靶分子的高特异性结合的核酸分子的体外进化的方法；如例如以下文献中所述：美国专利号5,475,096、5,580,737、5,567,588、5,707,796、5,763,177、6,011,577和6,699,843。另一种鉴定适配体的筛选方法描述于美国专利号5,270,163中。SELEX法是基于核酸形成多种二维和三维结构的能力，以及在核苷酸单体内充当配体可获得的化学通用性(与实际上任何化学化合物(无论是单体还是聚合物，包括其他核酸分子和多肽)形成特异性结合对)。任何大小或组成的分子都可以用作靶标。SELEX方法涉及从候选寡核苷酸的混合物中选择以及使用相同的通用选择方案的结合、分隔和扩增的逐步迭代，以达到所需的结合亲和力和选择性。从核酸混合物(其可以包含随机化序列的区段)开始，SELEX方法包括以下步骤：在有利于结合的条件下使混合物与靶标接触；分隔未结合的核酸与那些已经特异性结合至靶分子的核酸；使核酸-靶标复合物解离；扩增从核酸-靶标复合物解离的核酸以产生富集配体的核酸混合物。将结合、分配、解离和扩增的步骤重复进行产生核酸配体所需的循环数，所述核酸配体以高亲和力和特异性与靶分子结合。

[0682] 通常，将这样的结合分子单独施用至动物[参见例如，O'Connor(1991)J.Neurochem.56:560]，但是这样的结合分子还可以在体内从宿主细胞吸收的多核苷酸表达并在体内表达[参见例如，Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression,CRC Press,博卡拉顿,佛罗里达州(1988)]。

[0683] 6.心力衰竭

[0684] 部分地，本公开文本涉及一种治疗心力衰竭的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如，ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗扩张型心肌病的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗与肌营养不良(例如，DMD)相关的心力衰竭的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗遗传性心肌病的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗与迪谢内肌营养不良(DMD)相关的心力衰竭的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗与肢带型肌营养不良(LGMD)相关的心力衰竭的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗与弗里德赖希共济失调相关的心力衰竭的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗与强直性肌营养不良相关的心力衰竭的方法。在一些实施方案中，所述方法涉及患有扩张型心肌病(DCM)的心力衰竭患者。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗肥厚型心肌病(HCM)的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗致心律失常性心肌病(AC)的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗左心室致密化不全性心肌病(LVNC)的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗限制型心肌病(RC)的方

法。

[0685] 这些方法特别旨在对动物、更特别是人的治疗性和预防性治疗。术语“受试者”、“个体”或“患者”在整个说明书中是可互换的，并且是指人或非人动物。这些术语包括哺乳动物，如人、非人灵长类动物、实验室动物、牲畜(包括牛、猪、骆驼等)、伴侣动物(例如，犬、猫、其他家养动物等)和啮齿动物(例如，小鼠和大鼠)。在特定实施方案中，所述患者、受试者或个体是人。

[0686] 术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”、“减轻”等在本文中通常用于意指获得期望的药理学和/或生理学作用，并且还可以用于指代改进、减轻所治疗病症(例如，心力衰竭)的一种或多种临床并发症和/或降低其严重性。就完全或部分延迟疾病、病症或其并发症的发作或复发而言，所述作用可以是预防性的，和/或就部分或完全治愈疾病或病症和/或可归因于所述疾病或病症的不利影响而言，所述作用可以是治疗性的。如本文所用的“治疗”涵盖对哺乳动物、特别是人的疾病或病症的任何治疗。如本文所用，“预防”障碍或病症的治疗剂是指如下化合物，其在统计样本中相对于未治疗的对照样品降低了治疗的样品中所述障碍或病症的发生率，或者相对于未治疗的对照样品延迟了疾病或病症的发作。

[0687] 通常，如本公开文本中所述对疾病或病症的治疗或预防(例如，ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)是通过以“有效量”施用本公开文本的一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂来实现。药剂的有效量是指在所需剂量和时间段下，有效实现所需治疗或预防结果的量。本公开文本药剂的“治疗有效量”可根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及药剂在个体中引发所需反应的能力的因素而变化。“预防有效量”是指在剂量和持续时间上有效实现所需预防结果所需要的量。

[0688] 用于描述HF的主要术语是基于对左心室射血分数(LVEF)的测量。HF包括宽患者范围(表1)。一些患者具有正常LVEF(其通常被认为≥50％)并且被称为射血分数保留的HF(HFpEF)。其他患者患有LVEF降低的HF(HFrEF)，所述降低的LVEF通常被认为<40％。LVEF在约40％与约49％之间的范围内的患者表示“灰色区域(grey area)”，其有时被定义为中间范围射血分数的HF(HFmrEF)。有时，“灰色区域”中的这些患者被鉴定为具有HFrEF，这取决于临床医师。因为不同的潜在病因、人口统计信息、共病和对疗法的反应，基于LVEF对患有HF的患者的区分是重要的。在1990年后发表的大多数临床试验基于LVEF(通常使用超声心动图显像、放射性核素技术或心脏磁共振(CMR)来测量)来选择患者，并且据我们所知，只在患有HFrEF的患者中才显示疗法同时降低发病率和死亡率。

[0689] 表1.通过左心室射血分数分析对心力衰竭的定义

[0690]

HF的类型		HFrEF	HFmrEF	HFpEF
标准	1	症状 ± 体征	症状 ± 体征	症状 ± 体征
	2	LVEF < 40%	LVEF 40-49%	LVEF ≥ 50%
	3	-	1.升高水平的利尿钠肽 2. 至少一项另外的标准：	1.升高水平的利尿钠肽 2. 至少一项另外的标准：

[0691]

			a. 相关的结构性心脏病(LVH和/或LAE) b. 舒张功能障碍	a. 相关的结构性心脏病(LVH和/或LAE) b. 舒张功能障碍

[0692] 症状：例如，呼吸急促、踝肿胀和疲劳

[0693] 体征:例如,颈静脉压升高、肺湿啰音和外周性水肿。体征在HF(尤其是HFpEF)的早期中和在用利尿剂治疗的患者中可能不存在。

[0694] 症状和体征是由结构性和/或功能性心脏异常引起的。

[0695] HF=心力衰竭;HFmrEF=中间范围射血分数的心力衰竭;HFpEF=射血分数保留的心力衰竭;HFrEF=射血分数降低的心力衰竭;LAE=左心房扩大;LVEF=左心室射血分数;LVH=左心室肥大;

[0696] 在某些方面,本公开文本涉及一种治疗、预防射血分数保留的心力衰竭(HFpEF)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗具有正常LVEF的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗具有正常LVEF和≥50%的LVEF的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗具有正常LVEF和与保留的射血分数相关的HF(HFpEF)的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗患有HFpEF和升高水平的利尿钠肽的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及治疗患有HFpEF、升高水平的利尿钠肽和结构性心脏病和/或舒张功能障碍的患者。

[0697] 在某些方面,本公开文本涉及一种治疗、预防射血分数降低的心力衰竭(HFrEF)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗具有降低的LVEF的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗具有降低的LVEF和<40%的LVEF的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗具有降低的LVEF和与降低的射血分数相关的HF(HFrEF)的患者的方法。

[0698] 在某些方面,本公开文本涉及一种治疗、预防中间范围射血分数的心力衰竭(HFmrEF)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗具有中间范围LVEF的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗具有中间范围LVEF和在约40%与约49%之间的LVEF的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及治疗具有中间范围LVEF和与中间范围射血分数相关的HF(HFmrEF)的患者。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗患有HmrEF和升高水平的利尿钠肽的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗患有HFmrEF和升高水平的利尿钠肽以及结构性心脏病和/或舒张功能障碍的患者的方法。

[0699] HFpEF的诊断可能比HFrEF的诊断更有挑战性。患有HFpEF的患者通常不具有扩张的LV,而是通常具有增加的LV壁厚度和/或增加的左心房(LA)大小作为充盈压增加的体征。大多数患者具有另外的LV充盈或吸入能力受损的“证据”,也分类为舒张功能障碍,其通常被接受为这些患者的HF的可能病因(因此称为“舒张型HF”)。然而,大多数患有HFrEF(先前称为“收缩型HF”)的患者还具有舒张功能障碍,并且在患有HFpEF的患者中已显示细微的收缩功能异常。因此,阐明保留的或降低的LVEF优先于保留的或降低的“收缩功能”。

[0700] 在先前指南中公认，在HFrEF与HFpEF之间存在灰色区域。这些患者的LVEF范围为40％至49％，因此称为HFmrEF。患有HFmrEF的患者大多可能具有主要为轻度的收缩功能障碍，但是具有舒张功能障碍的特征。

[0701] 没有可检测的LV心肌病的患者可能具有HF的其他心血管原因(例如，肺动脉高压、瓣膜性心脏病等)。患有非心血管病状(例如，贫血、肺病、肾病或肝病)的患者可能具有与HF的症状相似或相同的症状，并且各自可能使HF综合征变复杂或加重。

[0702] 已经使用NYHA功能分级(表2)来描述症状和运动不耐受的严重性。然而，症状严重性与LV功能的许多量度的关联性较差；但是在症状严重性与存活之间存在明显联系，具有轻度症状的患者可能仍具有增加的住院和死亡风险。有时，术语“晚期HF”用于表征具有严重症状、复发性代偿失调和严重心脏功能障碍的患者。

[0703] 表2.基于症状严重性和体力活动的纽约心脏协会(NYHA)HF功能分级

[0704]

I级	不限制体力活动。普通体力活动不会引起过度的呼吸急促、疲劳或心悸。
II级	轻微限制体力活动。静息时舒适，但是普通体力活动引起过度的呼吸急促、疲劳或心悸。
III级	明显限制体力活动。静息时舒适，但是低于普通的体力活动引起过度的呼吸急促、疲劳或心悸。
IV级	不能在没有不适感的情况下从事任何体力活动。静息时可能存在症状。如果进行任何体力活动，不适感增加。

[0705] 在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有NYHA I级HF的患者的方法。在一些实施方案中，患有NYHA I级HF的患者的体力活动不受限制。在一些实施方案中，患有NYHA I级HF的患者经历体力活动而不会引起过度的呼吸急促、疲劳和/或心悸。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有NYHA II级HF的患者的方法。在一些实施方案中，患有NYHA II级HF的患者的体力活动轻微受限。在一些实施方案中，患有NYHA II级HF的患者经历普通体力活动会引起过度的呼吸急促、疲劳或心悸。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有NYHA III级HF的患者的方法。在一些实施方案中，患有NYHA III级HF的患者的体力活动明显受限。在一些实施方案中，患有NYHA III级HF的患者经历低于普通的体力活动而引起过度的呼吸急促、疲劳或心悸。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有NYHA IV级HF的患者的方法。在一些实施方案中，患有NYHA IV级HF的患者不能在没有不适感的情况下从事任何体力活动。在一些实施方案中，患有NYHA IV级HF的患者经历静息时的症状，并且在进行任何体力活动时，不适感增加。

[0706] 在某些方面，本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如，扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如，ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)，其中所述方法改进所述患者的NYHA功能性心力衰竭等级。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的NYHA等级从IV级降至III级。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的NYHA等级从IV级降至II级。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的NYHA等级从IV级降至I级。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的NYHA等级从III级降至II级。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的NYHA等级从III级降至I级。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的NYHA等级从II级降至I级。

[0707] 美国心脏病学会基金会/美国心脏协会(ACCF/AHA)分级基于结构性变化和症状来

描述HF发展的分期(表3)。ACC/AHA分级系统的重点在于疾病的分期和发展,与肿瘤学中通常使用的方法类似。这些HF分期从先前风险因子(A期)进展至出现亚临床心脏功能障碍(B期),然后是症状性HF(C期),最后是终末期难治性疾病(D期)。ACC/AHA分期从A期进展至D期。

[0708] 表3.美国心脏病学会基金会/美国心脏协会(ACCF/AHA)心力衰竭分期

[0709]

A	具有高HF风险但没有结构性心脏病或HF症状。

[0710]

B	患有结构性心脏病但没有HF的体征或症状。
C	患有结构性心脏病且具有先前或当前HF症状。
D	患有需要专门干预的难治性HF。

[0711] 在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗患有ACCF/AHA A期HF的患者的方法。在一些实施方案中,患有ACCF/AHA A期HF的患者具有高HF风险但没有结构性心脏病或HF症状。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗患有ACCF/AHA B期HF的患者的方法。在一些实施方案中,患有B期HF的患者患有结构性心脏病但没有已知的HF体征或症状。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗患有ACCF/AHA C期HF的患者的方法。在一些实施方案中,患有ACCF/AHA C期HF的患者患有结构性心脏病且具有先前或当前HF症状。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗患有ACCF/AHA D期HF的患者的方法。在一些实施方案中,患有ACCF/AHA D期HF的患者患有需要专门干预的难治性HF。

[0712] 在某些方面,本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂),其中所述方法改进所述患者的ACCF/AHA心力衰竭分期。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的ACCF/AHA分期从D期降低至C期。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的ACCF/AHA分期从D期降低至B期。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的ACCF/AHA分期从D期降低至A期。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的ACCF/AHA分期从C期降低至B期。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的ACCF/AHA分期从C期降低至A期。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的ACCF/AHA分期从B期降低至A期。

[0713] 可以使用Killip分级来描述在心肌梗死后的急性环境中患者的病症的严重性。可以将患有HF合并急性心肌梗死(AMI)的患者根据Killip和Kimball分级为表4中所示的等级。

[0714] 表4.HF合并AMI的Killip分级

[0715]

I级	没有HF的临床体征
II级	具有啰音和S3奔马律的HF
III级	患有症状明显的急性肺水肿
IV级	心源性休克、低血压(SBP, 90 mmHg)以及末梢血管收缩的证据(如少尿、发绀和发汗)

[0716] 在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗患有Killip I级HF合并AMI的患者的方法。在一些实施方案中,患有Killip I级HF合并AMI的患者没有HF的临床体征。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗患有Killip II级HF合并AMI的患者的方法。在一些

实施方案中，患有Killip II级HF合并AMI的患者患有具有啰音和S3奔马律的HF。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有Killip III级HF合并AMI的患者的方法。在一些实施方案中，患有Killip III级HF合并AMI的患者患有症状明显的急性肺水肿。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有Killip IV级HF合并AMI的患者的方法。在一些实施方案中，患有Killip IV级HF合并AMI的患者具有心源性休克、低血压(例如，SBP，90mmHg)以及末梢血管收缩的证据(如少尿、发绀和发汗)。

[0717] 在某些方面，本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如，扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如，ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)，其中所述方法改进所述患者的Killip HF分级。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的Killip等级从IV级降低至III级。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的Killip等级从IV级降低至II级。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的Killip等级从IV级降低至I级。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的Killip等级从III级降低至II级。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的Killip等级从III级降低至I级。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的Killip等级从II级降低至I级。

[0718] 用于诊断心力衰竭的弗雷明汉标准(表5)需要至少两项主要标准的存在或者至少一项主要标准和两项次要标准的存在。尽管这些标准已经用作金参考标准数十年，但是它们主要以静息时充血的存在为基础。重要的是，这种临床特征在患有充分代偿的HF的可走动患者中或者在仅在运动期间发生异常血流动力学的患有HF的患者中通常不存在。因此，尽管具有高度特异性，但是弗雷明汉标准对于HF的诊断往往灵敏度较差。

[0719] 表5.用于诊断心力衰竭的弗雷明汉标准

[0720]

主要标准	夜间阵发性呼吸困难或端坐呼吸 颈静脉怒张 啰音 X射线摄影心脏肥大 急性肺水肿 S3奔马律 大于16 cm水柱的增加的静脉压 大于或等于25秒的循环时间 肝颈静脉反流 响应于治疗在5天中大于或等于4.5 kg的体重减轻
次要标准	双侧踝水肿 夜间咳嗽 普通劳作时呼吸困难 肝肿大 胸腔积液 肺活量从最高记录减小1/3 心动过速（心率大于120/min）

[0721] 在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有用于诊断HF的一项或多项主要弗雷明汉标准的患者的方法。在一些实施方案中，患者具有以下中的一种或多种：夜间阵发性呼吸困难或端坐呼吸、颈静脉怒张、啰音、X射线摄影心脏肥大、急性肺水肿、S3奔马律、大于16cm水柱的增加的静脉压、大于或等于25秒的循环时间、肝颈静脉反流以及响应于治疗

在5天中大于或等于4.5kg的体重减轻。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有用于诊断HF的一项或多项次要弗雷明汉标准的患者的方法。在一些实施方案中，患者具有以下中的一种或多种：双侧踝水肿、夜间咳嗽、普通劳作时呼吸困难、肝肿大、胸腔积液、肺活量从最高记录减小1/3以及心动过速(心率大于120/min)。在一些实施方案中，患者具有至少两项弗雷明汉主要标准。在一些实施方案中，患者具有至少一项主要弗雷明汉标准和至少两项次要弗雷明汉标准。

[0722] 在某些方面，本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如，扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如，ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)，其中所述方法减少所述患者具有的用于心力衰竭的弗雷明汉标准的数量。在一些实施方案中，所述方法涉及减少所述患者具有的用于心力衰竭的主要弗雷明汉标准的数量。在一些实施方案中，所述方法涉及减少所述患者具有的用于心力衰竭的次要弗雷明汉标准的数量。

[0723] 存在许多关于心力衰竭的诊断医学专业人士可以寻找的心力衰竭的已知症状和体征。一些症状可能是非特异性的，并且因此无助于辨别HF与其他问题。HF的由于液体潴留所致的症状和体征可以用利尿剂疗法快速消退。诸如颈静脉压升高和心尖冲动移位的体征可能具有较高特异性，但是更难以检测并且再现性较差。HF在没有相关病史(例如，心脏损伤的潜在病因)的个体中是少见的，而某些特征，特别是既往心肌梗死，通常在具有适当症状和体征的患者中增加HF的可能性。症状和体征在随时间监测患者对治疗的反应和稳定性方面是重要的。尽管进行治疗但症状仍持续存在表明需要另外的疗法，并且症状的恶化是严重的发展(将患者置于紧急入院和死亡的风险中)并且应及时进行医药治疗。

[0724] 表6.心力衰竭的体征和症状

[0725]

症状	体征
典型的	较高特异性的
呼吸急促 端坐呼吸 夜间阵发性呼吸困难 运动耐力降低 疲劳、疲乏、运动后恢复时间延长 踝肿胀	颈静脉压升高 肝颈静脉反流 第三心音(奔马律) 心尖冲动侧移位
不太典型的	较低特异性的
夜间咳嗽 哮鸣 胀气感 食欲不振 意识错乱(尤其在老年人中) 抑郁 心悸 头晕 晕厥 俯身呼吸困难	体重增加(>2 kg/周) 体重减轻(在晚期HF中) 组织消耗(恶病质) 心脏杂音 外周性水肿(踝、骶骨、阴囊) 肺捻发音 进气减少和肺底叩诊浊音(胸腔积液) 心动过速 不规则脉搏 呼吸急促 陈-施呼吸 肝肿大 腹水 手足厥冷 少尿 脉压窄

[0726] 在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有一种或多种典型的和/或不太典型的HF症状的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有一种或多种特异性的和/或较低特异性的HF体征的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及治疗具有一种或多种HF的典型症状、不太典型的症状、特异性体征和/或较低特异性体征的患者。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有一种或多种典型HF症状的患者的方法。在一些实施方案中，患者具有选自以下的一种或多种症状：呼吸急促、端坐呼吸、夜间阵发性呼吸困难、运动耐力降低、疲劳、疲乏、运动后恢复时间延长以及踝肿胀。在一些实施方案中，患者具有一种或多种不太典型的HF症状。在一些实施方案中，患者具有选自以下的一种或多种不太典型的症状：夜间咳嗽、哮鸣、胀气感、食欲不振、意识错乱(尤其在老年人中)、抑郁、心悸、头晕、晕厥和俯身呼吸困难。在一些实施方案中，患者具有一种或多种HF体征。在一些实施方案中，患者具有选自以下的HF的一种或多种体征：颈静脉压升高、肝颈静脉反流、第三心音(奔马律)、心尖冲动侧移位。在一些实施方案中，患者具有HF的一种或多种较低特异性体征。在一些实施方案中，患者具有选自以下的HF的一种或多种较低特异性体征：体重增加(>2kg/周)、体重减轻(在晚期HF中)、组织消耗(恶病质)、心脏杂音、外周性水肿(踝、骶骨、阴囊)、肺捻发音、进气减少和肺底叩诊浊音(胸腔积液)、心动过速、不规则脉搏、呼吸急促、陈-施呼吸、肝肿大、腹水、手足厥冷、少尿和脉压窄。

[0727] 在某些方面，本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如，扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如，ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)，其中所述方法减少所述患者具有的心力衰竭的体征和/或症

状的数量。在一些实施方案中,所述方法涉及减少所述患者具有的心力衰竭的体征的数量。在一些实施方案中,所述方法涉及减少所述患者具有的心力衰竭的症状的数量。

[0728] 遗传性心肌病

[0729] 遗传性心肌病尤其被经典地分为扩张型心肌病(DCM)、肥厚型心肌病(HCM)、致心律失常性心肌病(AC)和限制型心肌病(RCM),其中每一种都可能是HF综合征的病因。在这些表型之间可能存在广泛重叠;例如,HCM、左心室致密化不全性心肌病(LVNC)和/或AC可能进展至具有收缩功能障碍的扩张的心室并因此具有DCM外观。在遗传性心肌病中,与在其他形式的HF中一样,高级成像提供基于结构的分级的精细化以及用于补充形态表型的功能信息,从而使人深入了解收缩性、舒张功能、应变、同步性、纤维化和能量学。在某些方面,本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂),其中所述患者患有遗传性心肌病。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗患有遗传性心肌病的患者的扩张型心肌病。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗患有遗传性心肌病的患者的肥厚型心肌病。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗患有遗传性心肌病的患者的致心律失常性心肌病。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗患有遗传性心肌病的患者的左心室致密化不全性心肌病。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗患有遗传性心肌病的患者的限制型心肌病。

[0730] 遗传性心肌病占HF整体的小部分,但是这可以随年龄和群体而明显变化。在患有HF的儿童群体中,通常鉴定家族性和假定的单基因起源。在患有HF的青年人中,遗传性疾病的患病率也较高。类似地,在成人的特发性DCM中,在家族筛选后发现的家族性疾病的比例较高,通常为约>30%。对HF的敏感性作为复杂性状也是可遗传的,并且发现有一名年龄<75岁的患有HF的双亲是患上HF的重要风险因子。

[0731] 遗传性心肌病的一些常见特征已经出现。第一,单独基因内的不同变体可以产生对比表型。例如,编码肌节蛋白心肌肌钙蛋白I的基因(TNNI3)中的突变可能引起HCM、DCM或RCM表型。重要的是,在几乎所有情况下,每种特定突变始终产生相同的定性表型(例如,给定变体引起DCM或HCM,但不同时引起二者)。然而,在给定的心肌病表型中存在显著的定量变异性,即使在疾病基因和等位基因相同时,这被称为表型异质性。第二,每种心肌病表型由多种基因突变之一引起(遗传异质性)。例如,超过50种基因中的突变可以引起DCM表型(基因座异质性),并且在这些基因内,描述多种不同的致病突变(等位基因异质性)。因此许多突变是罕见的并且通常对单独家族具有特异性,几乎不存在热点或常见突变。这种异质性的后果在于通常,仅测试患者的已知等位基因作为诊断测试不太有效,并且通常需要系统测序来代替。此外,鉴于人基因组中罕见变体的高频率,在先证者中鉴定的错义变体的致病性必须加以验证。第三,遗传性心肌病显示可变的外显率(例如,展示表型的携带致病突变的个体的比例),即使在同一家族内。表达度(例如,在具有致病突变的患者中出现的表型的严重性)也是高度可变的,意味着临床表现、病程和结局在受影响家族内可能显著不同。

[0732] 肌肉萎缩疾病

[0733] 肌肉萎缩是指肌肉量的进行性损失和/或是指肌肉的进行性弱化和退化,所述肌

肉包括控制运动的骨骼肌或随意肌、控制心脏的心肌(心肌病)以及平滑肌。慢性肌肉萎缩是一种慢性病症(即在长时间段中持续存在),其特征为肌肉量的进行性损失、肌肉的弱化和退化。

[0734] 在肌肉萎缩期间发生的肌肉量损失的特征可以是因分解代谢所致的肌肉蛋白降解。蛋白质分解代谢由于蛋白质降解的极高速率、蛋白质合成的极低速率或者二者的组合而发生。肌肉蛋白分解代谢不论是由高程度的蛋白质降解引起的还是低程度的蛋白质合成引起的,都导致肌肉量减少和肌肉萎缩。

[0735] 肌肉萎缩与慢性、神经性、遗传性或感染性病状、疾病、疾患或病症相关。这些包括肌营养不良(例如,贝克肌营养不良(BMD)、先天性肌营养不良(CMD)、迪谢内肌营养不良(DMD)、埃默里-德赖弗斯肌营养不良(EDMD)、面肩胛肱型肌营养不良(FSHD)、肢带型肌营养不良(LGMD)、强直性肌营养不良(DM)和眼咽型肌营养不良(OPMD));肌肉萎缩,如脊髓灰质炎后肌肉萎缩(PPMA);恶病质,如心脏性恶病质、AIDS恶病质和癌症恶病质、营养不良、麻风、糖尿病、肾病、慢性阻塞性肺病(COPD)、癌症、终末期肾衰竭、肌少症、肺气肿、骨质软化、HIV感染和AIDS。

[0736] 另外,其他情况和病症与肌肉萎缩相关并且可能引起肌肉萎缩。这些包括慢性腰痛、高龄、中枢神经系统(CNS)损伤、周围神经损伤、脊髓损伤、化学损伤、中枢神经系统(CNS)损坏、周围神经损坏、脊髓损坏、化学损坏、烧伤、在肢体被固定时发生的废用性去适应作用、由于疾病或损伤所致的长期住院,以及酒精中毒。

[0737] 肌肉萎缩如果不消退,可能会引起悲惨的健康后果。例如,在肌肉萎缩期间发生的变化可能导致身体状态变弱,这对个体的健康有害,从而导致对梗塞的敏感性增加和较差的体能状态。另外,肌肉萎缩是患有恶病质和AIDS的患者的发病和死亡的强预测因子。在基础科学和临床两个水平上都迫切需要创新的方法来预防和治疗肌肉萎缩,特别是慢性肌肉萎缩。

[0738] 在某些方面,本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂),其中所述患者患有肌肉萎缩疾病。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗患有一种或多种肌肉萎缩疾病的患有HFrEF的患者。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗患有肌肉萎缩疾病的患者的方法,所述肌肉萎缩疾病是肌营养不良。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗患有选自以下的一种或多种肌营养不良的患者的方法:贝克肌营养不良(BMD)、先天性肌营养不良(CMD)、迪谢内肌营养不良(DMD)、埃默里-德赖弗斯肌营养不良(EDMD)、面肩胛肱型肌营养不良(FSHD)、肢带型肌营养不良(LGMD)、强直性肌营养不良(DM)和眼咽型肌营养不良(OPMD)。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗患有一种或多种肌肉萎缩如脊髓灰质炎后肌肉萎缩(PPMA)的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗患有选自心脏性恶病质、AIDS恶病质和癌症恶病质的一种或多种恶病质的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗患有营养不良的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗患有麻风的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗患有糖尿病的患者的方法。在一些

实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有肾病的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有慢性阻塞性肺病(COPD)的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有癌症的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有终末期肾衰竭的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有肌少症的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有骨质软化的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有HIV感染的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有AIDS的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有心肌病的患者的方法。

[0739] 肌营养不良

[0740] 迪谢内肌营养不良

[0741] 迪谢内肌营养不良(DMD)是X连锁隐性障碍，其影响1/5000的男性并且是肌营养不良的最常见类型。DMD由抗肌萎缩蛋白(由基因DMD编码)的不存在引起，所述抗肌萎缩蛋白是通过将肌膜锚定至肌纤维的最外层肌丝层来将肌节与细胞外基质相连的蛋白质。DMD是进行性婴儿神经肌肉病症，其特点为肌肉萎缩和无力、骨骼变形、丧失独立行走的能力到10岁、呼吸功能障碍到20岁，以及最终在20岁与40岁年龄之间发生心肺衰竭和死亡。尽管临床医师的了解有所增加，但是在症状发作与最终诊断时间之间有平均2.5年的延迟。DMD的心血管表现最常表示为扩张型心肌病(DCM)、心律失常和充血性心力衰竭(HF)。在某些方面，本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如，扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如，ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)，其中所述患者患有DMD。在一些实施方案中，所述方法涉及治疗患有DMD的患有HFrEF心力衰竭的患者。

[0742] 在患有DMD的患者中最常见的突变(大约65％)是抗肌萎缩蛋白基因(DMD)(其为人基因组中的最大基因之一)的一个或多个外显子的缺失，导致成熟蛋白质抗肌萎缩蛋白完全不存在。在6％-10％的病例中发生复制，而无义、错义和深度内含子变化总共占分子缺陷的剩余25％。抗肌萎缩蛋白位于骨骼肌和心肌肌膜的内侧上，并且其与大量膜蛋白相互作用，在信号转导的调节中起重要作用。患有DMD的患者中抗肌萎缩蛋白的缺失导致抗肌萎缩蛋白相关糖蛋白复合物(DGC)的去稳定，从而引起在收缩和松弛的重复循环期间的肌膜不稳定，以及通过肌节生成的力传递的减少。在心脏中，连通膜完整性一起，抗肌萎缩蛋白的缺少影响L型钙通道以及机械拉伸激活的受体的功能。这导致细胞内钙水平的增加，因此，激活卡配因和蛋白酶，它们由此降解收缩蛋白，促进细胞死亡和纤维化。

[0743] 当前用于DMD诊断的护理标准建议绕过肌肉活检，首先进行遗传测定。由于在大多数患者中鉴定到一个或多个外显子的缺失和复制，最划算的是首先通过多重连接探针扩增技术(MLPA)检查这些突变。早期遗传测定的相关性因以下事实而明显：不同类型的突变携带不同的预后和表型特征。例如，在DMD的5’端(外显子3-9)或3’端(外显子48-52)出现的缺失更常与心脏受累相关，但是力学解释是不清楚的。

[0744] 有人建议，在6岁时首先用ECG和超声心动图显像进行基线心脏评估，然后在没有症状的情况下每半年进行评估直至10岁。建议在10岁时或者在心脏体征和症状发作时(如

果它们更早出现)转为使用ECG和超声心动图显像每年进行定期评估。连通短PR间期和右心室肥大一起,窦性心动过速是患有DMD的患者在童年期期间的常见发现,即使在他们不动时。在一些实施方案中,使用超声心动图显像评估患有心力衰竭和DMD的患者。在一些实施方案中,使用ECG评估患有心力衰竭和DMD的患者。

[0745] 超声心动图显像和ECG标准地用于筛选和检测DMD患者的心血管异常,但是这些工具并非总是适合检测疾病进展的早期的临床上无症状的阶段。就此而言,新出现具有心肌延迟强化的心血管磁共振(CMR)作为用于检测患有DMD的患者的早期心脏受累的有前景的方法。心脏功能障碍的早期检测允许建立各种类别的药物(如皮质类固醇、β-阻断剂、ACE抑制剂、抗盐皮质激素利尿剂)以及在用于这类患者的多模式和多学科护理中的新型药理学和手术解决方案的治疗制度。在一些实施方案中,使用CMR评估患有心力衰竭和DMD的患者。在一些实施方案中,使用具有心肌延迟强化的CMR评估患有心力衰竭和DMD的患者。

[0746] 有几种已知的用于心力衰竭的治疗,已知可将其开给患有HF的DMD患者。为了延迟LV功能障碍的发作和/或治疗LV功能障碍,通常开皮质类固醇(例如,盐皮质激素、糖皮质激素)、肾素-血管紧张素系统(RAAS)的抑制剂(例如,ACE抑制剂)和/或β阻断剂。皮质类固醇是在患有DMD的患者的治疗中引入的最相关的药物类别,对所述疾病的自然史具有显著影响。早期类固醇治疗有效减慢骨骼肌萎缩和功能障碍,维持离床活动并且与脊柱侧凸风险和肺衰竭的减少相关。另外,类固醇施用也可能对患有DMD的患者的LV功能具有正面影响,但是目前对此过程的潜在确切机制并不清楚。此外,已经显示用一种或多种ACE抑制剂对年龄为9.5至13岁的患有DMD的患者的早期治疗延迟LV功能障碍的发作和进展。在某些方面,本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂),其中还向所述患者施用一种或多种皮质类固醇(例如,盐皮质激素、糖皮质激素)、肾素-血管紧张素系统(RAAS)的抑制剂(例如,ACE抑制剂)和/或β阻断剂。

[0747] 此外,可以开给DMD患者一种或多种抑制COX的一氧化氮供体,最近已经将其引入患有DMD的患者的治疗中。这类药物的结构与非类固醇抗炎药类似,但是运输一氧化氮的能力更强,从而减少骨骼肌和心肌二者中的炎症。在某些方面,本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂),其中还向所述患者施用一种或多种抑制COX的一氧化氮供体。

[0748] 用于治疗DMD的其他疗法包括但不限于终止密码子连读方法、基于病毒载体的基因疗法和用于外显子跳读的反义寡核苷酸(AON)(例如,吗啉基)。对于DMD中的基因疗法,主要目标是递送抗肌萎缩蛋白基因的替代拷贝。为了完成DMD中的基因转移,一些疗法旨在利用病毒(具体而言AAV病毒)的作用,其将在理论上将抗肌萎缩蛋白基因递送至肌细胞中以制造抗肌萎缩蛋白。抗肌萎缩蛋白基因的大尺寸可能造成困难,因为病毒可以携带的载荷的大小存在限制。为了解决这个问题,通常在基因疗法中使用更小的但仍有功能的抗肌萎

缩蛋白形式。微小抗肌萎缩蛋白(rAAV2.5-CMV-微小抗肌萎缩蛋白)是微型化的工作抗肌萎缩蛋白基因,已经在患有DMD的男孩中加以测试。此外,已经开发出称为微型抗肌萎缩蛋白的甚至更小的抗肌萎缩蛋白形式,其含有来自抗肌萎缩蛋白基因的产生功能性蛋白所需的微量信息。SGT-001是递送工程化的微型抗肌萎缩蛋白的基因疗法。另一种类似的药物称为rAAVrh74.MHCK7.微型抗肌萎缩蛋白。用于治疗DMD的开发中的其他基因疗法包括但不限于SRP-9001和GALGT2。将包装在腺相关病毒(AAV)载体或递送媒介物中的微型抗肌萎缩蛋白基因通过静脉内(IV)输注全身施用至身体。用于外显子跳读的反义寡核苷酸(AON)是短合成核酸序列,其与互补的靶mRNA序列结合并导致内切核酸酶介导的转录物敲低或剪接调节。AON介导的外显子跳读可以通过以下方式来校正阅读框:去除框外(out-of-frame)外显子或来自DMD前体mRNA的外显子,从而产生截短的但部分功能性的抗肌萎缩蛋白。第一代AON具有未修饰的磷酸核糖骨架,使得它们易被核酸酶降解。第二代和第三代AON含有化学修饰的结构,从而不仅增加AON对核酸酶降解的抗性,还增强其药理学特性。二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物(PMO)代表用于DMD的反义疗法的最先进的应用。PMO的脱氧核糖/核糖部分被吗啉环替代,并且带电荷的磷酸二酯亚基间连接被不带电荷的二氨基磷酸酯连接替代,从而使得PMO具有核酸酶抗性并且是电荷中性的,这赋予甚至更强的对通常靶向带电荷分子的核酸酶的抗性。另外,由于缺少电荷,PMO更安全,因为它们不太可能激活Toll样受体,Toll样受体是一类参与产生针对致病物质的先天免疫应答的受体。用于治疗DMD的RNAi技术包括但不限于依特普森(SRP-4051)、戈洛迪森(SRP-4053)、卡西默森(SRP-4045)、肽缀合的依特普森(SRP-5051)、SRP-5053、SRP-5045、SRP-5052、SRP-5044、SRP-5050、维托拉森(NS-065/NCNP-01)、NS-089/NCNP-02(外显子跳读44)、DS-5141b(外显子跳读45)、苏沃迪森(WVE-210,201)和德瑞萨泼森(PRO051)。其他类似的疗法包括由肽核酸(PNA)制得的单链寡脱氧核苷酸(ssODN)(例如,靶向DMD外显子10的PNA-ssODN)、嵌合肽-PMO缀合物(例如,用二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物(PMO)缀合肌肉特异性肽(MSP)和细胞穿膜肽(B肽),M12-PMO)、M12-PMO(外显子23跳读)以及M12-PMO(外显子10跳读)。氨基糖苷衍生的化合物最近已经用于患有DMD的患者中,因为它们结合核糖体的60S亚基并“松弛”提前终止密码子,且对幼稚的无义三联体没有明显影响。最近已批准属于此类别的化合物Ataluren has用于治疗DMD。已经证实肌营养相关蛋白(一种与抗肌萎缩蛋白非常类似的蛋白质)的过表达是抗肌萎缩蛋白表达的部分拯救者。几种其他治疗策略旨在通过减少或预防肌肉坏死和纤维化(例如,他达拉非)或者通过增加肌肉量(例如,肌生成抑制蛋白抑制剂)来靶向疾病进展,目前正在研究中。最后,细胞疗法使得能将正常的表达抗肌萎缩蛋白的卫星细胞移植到患者的骨骼肌中,以获得与固有肌纤维的融合物并由此将抗肌萎缩蛋白表达散步到患者的细胞中。尽管未在心肌细胞上测试,但是这些方法对于恢复心脏中的抗肌萎缩蛋白是有潜在前景的。在某些方面,本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂),其中还向所述患者施用一种或多种终止密码子连读方法、基于病毒载体的基因疗法、用于外显子跳读的反义寡核苷酸(AON)、Ataluren has、肌营养相关蛋白过表达、他达拉非、肌生成抑制蛋白抑制剂以及细胞疗法。在某些方面,本公开文本涉及治疗、预防心

力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂),其中还向所述患者施用以下中的一种或多种:rAAV2.5-CMV-微小抗肌萎缩蛋白、SGT-001、rAAVrh74.MHCK7.微型抗肌萎缩蛋白、SRP-9001和GALGT2。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病),其包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和rAAV2.5-CMV-微小抗肌萎缩蛋白。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病),其包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和SGT-001。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病),其包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和rAAVrh74.MHCK7.微型抗肌萎缩蛋白。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病),其包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和SRP-9001。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病),其包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和GALGT2。在某些方面,本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂),其中还向所述患者施用以下中的一种或多种:依特普森(SRP-4051)、戈洛迪森(SRP-4053)、卡西默森(SRP-4045)、肽缀合的依特普森(SRP-5051)、SRP-5053、SRP-5045、SRP-5052、SRP-5044、SRP-5050、维托拉森(NS-065/NCNP-01)、NS-089/NCNP-02(外显子跳读44)、DS-5141b(外显子跳读45)、苏沃迪森(WVE-210,201)、德瑞萨泼森(PRO051)、PNA-ssODN、M12-PMO(外显子23跳读)和M12-PMO(外显子10跳读)。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病),其包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和依特普森。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病),其包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、

ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和戈洛迪森。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病),其包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和卡西默森(SRP-4045)。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病),其包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和肽缀合的依特普森(SRP-5051)。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病),其包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和SRP-5053。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病),其包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和SRP-5045。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病),其包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和SRP-5052。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病),其包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和SRP-5044。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病),其包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和SRP-5050。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病),其包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和维托拉森。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病),其包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和NS-089/NCNP-02(外显子跳读44)。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病),其包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和DS-5141b(外显子跳读45)。在一些实施方案中,所述方法涉

及治疗心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病),其包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和苏沃迪森(WVE-210,201)。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病),其包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和德瑞萨泼森。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病),其包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和PNA-ssODN。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病),其包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和M12-PMO(外显子23跳读)。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病),其包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和M12-PMO(外显子10跳读)。

[0749] 肢带型肌营养不良

[0750] 肢带型肌营养不良(LGMD)是指许多近端无力大于远端无力的进行性肌肉疾病。其特征在于进行性肌肉萎缩,主要影响髋部和肩部肌肉。常染色体显性病症命名为LGMD1X,其中X的目前范围为A至H,并且常染色体隐性病症是LGMD 2X,其中X的目前范围为A至Q。LGMD的列表长且仍在扩展,其中每个种类中定期出现新字母。一些更常见的LGMD是以下类型:1A、1B、1C、2A、2B、2C-2F、2I和2L。LGMD 1A型涉及肌收缩蛋白(MYOT)基因中的一个或多个突变。LGMD 1B型涉及核纤层蛋白A/C(LMNA)基因中的一个或多个突变。LGMD 1C型涉及小窝蛋白-3(CAV3)基因中的一个或多个突变。LGMD 2A型涉及卡配因-3(CAPN3)基因中的一个或多个突变。LGMD 2B型涉及Dysferlin(DYSF)基因中的一个或多个突变。LGMD 2C-F型分别涉及γ-肌聚糖蛋白(SGCG)、α-肌聚糖蛋白(SGCA)、β-肌聚糖蛋白(SGCB)和/或δ-肌聚糖蛋白(SGCD)基因中的一个或多个突变。LGMD 2I型涉及FKRP基因中的一个或多个突变。LGMD 2L型涉及阿诺他明-5(ANO5)基因中的一个或多个突变。

[0751] 在某些方面,本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂),其中所述患者还患有肢带型肌营养不良。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗患有肢带型肌营养不良的患有HFrEF心力衰竭的患者。在一些实施方案中,患有肢带型肌营养不良和心力衰竭的患者具有肌收缩蛋白(MYOT)基因中的一个或多个突变。在一些实施方案中,患有肢带型肌营养不良和心力衰竭的患者具有核纤层蛋白A/C

(LMNA)基因中的一个或多个突变。在一些实施方案中,患有肢带型肌营养不良和心力衰竭的患者具有小窝蛋白-3(CAV3)基因中的一个或多个突变。在一些实施方案中,患有肢带型肌营养不良和心力衰竭的患者具有卡配因-3(CAPN3)基因中的一个或多个突变。在一些实施方案中,患有肢带型肌营养不良和心力衰竭的患者具有Dysferlin(DYSF)基因中的一个或多个突变。在一些实施方案中,患有肢带型肌营养不良和心力衰竭的患者具有γ-肌聚糖蛋白(SGCG)、α-肌聚糖蛋白(SGCA)、β-肌聚糖蛋白(SGCB)和/或δ-肌聚糖蛋白(SGCD)基因中的一个或多个突变。在一些实施方案中,患有肢带型肌营养不良和心力衰竭的患者具有fukutin相关蛋白(FKRP)基因中的一个或多个突变。在一些实施方案中,患有肢带型肌营养不良和心力衰竭的患者具有阿诺他明-5(ANO5)基因中的一个或多个突变。

[0752] 在某些方面,本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂),其中还向所述患者施用以下中的一种或多种:SRP-9003、SRP-9004、SRP-9005、SRP-6004、SRP-9006和LGMD2A。

[0753] 弗里德赖希共济失调

[0754] 弗里德赖希共济失调(FRDA或FA)是随时间恶化的常染色体隐性遗传性疾病,其引起行走困难、手臂和腿的感觉丧失以及言语障碍。症状可以在5岁与15岁之间的年龄开始,并且许多患者患上肥厚型心肌病,并且将在其青少年时期就需要行动辅助工具,如手杖、助行器或轮椅。随着疾病进展,患者丧失其视力和听力。其他并发症包括脊柱侧凸和糖尿病。在心脏中,FRDA患者通常患上一定纤维化,并且许多患者随时间患上左心室肥大和左心室扩张。

[0755] 所述病症是由染色体9上的FXN基因中的突变引起的。FXN基因编码称为共济蛋白的蛋白质。在FRDA中,患者产生较少共济蛋白。脊髓中神经组织的变性引起共济失调;通过与小脑连接来引导手臂和腿的肌肉运动所必需的感觉神经元特别受影响。脊髓变得更细并且神经细胞失去一些髓鞘。

[0756] 在某些方面,本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂),其中所述患者还患有弗里德赖希共济失调。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗患有弗里德赖希共济失调肌营养不良的患有HFrEF心力衰竭的患者。在一些实施方案中,患有弗里德赖希共济失调肌营养不良和心力衰竭的患者具有共济蛋白(FXN)基因中的一个或多个突变。

[0757] 强直性肌营养不良

[0758] 强直性肌营养不良是影响肌肉功能的长期常染色体显性遗传障碍。症状包括逐渐恶化的肌肉损失和无力,并且肌肉通常收缩且无法松弛(肌强直)。其他症状可能包括白内障、智力残疾和心脏传导问题。强直性肌营养不良在世界范围内影响超过8,000分之一的人。尽管强直性肌营养不良可能在任何年龄发生,但通常在20多岁和30多岁发作。

[0759] 有两个主要类型的强直性肌营养不良:1型,由于编码强直性肌营养不良蛋白激酶的DMPK基因中的突变所致;以及2型,由于编码CCHC型锌指核酸结合蛋白的CNBP基因中的突变所致。症状和体征的表现随类型显著变化,2型往往是更轻的疾病。症状可能在婴儿期至成年期的任何时间出现。强直性肌营养不良引起全身无力,通常始于手部、足部、颈部或面部的肌肉中。其缓慢地进展至累及其他肌群,包括心脏。与1型相关的肌无力特别影响小腿、手、颈和面。2型中的肌无力主要涉及颈部、肩部、肘部和髋部的肌肉。

[0760] 在某些方面,本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂),其中所述患者还患有强直性肌营养不良。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗患有强直性肌营养不良的患有HFrEF心力衰竭的患者。在一些实施方案中,患有强直性肌营养不良和心力衰竭的患者具有强直性肌营养不良蛋白激酶(DMPK)基因中的一个或多个突变。.在一些实施方案中,患有强直性肌营养不良和心力衰竭的患者具有CCHC型锌指核酸结合蛋白(CNBP)基因中的一个或多个突变。

[0761] 扩张型心肌病(DCM)

[0762] 扩张型心肌病(DCM)是射血分数降低的HF(HFrEF)的第二常见病因。其为具有自身多种病因的异质性障碍,但是据估计20%至50%的DCM是由以孟德尔方式遗传的基因突变引起的。在某些方面,本公开文本涉及治疗、预防扩张型心肌病或降低扩张型心肌病的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗患有DCM的患有HFrEF的患者。

[0763] DCM在病理学上的特征为左心室扩张,在功能上的特征为进行性收缩性衰竭,并且在组织学上的特征为心肌细胞肥大、肌原纤维损失和间质纤维化。患有DCM的患者可能最初无症状,但是随着左心室衰竭发生劳力性呼吸困难、端坐呼吸和疲劳。右心室衰竭通常由于心肌病并行受累而存在,或者继发于左心室衰竭。DCM的并发症(如心律失常、二尖瓣反流或心内血栓栓塞)可能是所述疾病的呈现特征。进行性HF或心律失常性猝死所致的死亡率是显著的。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗患有左心室扩张的患者的方法。DCM本身可能由对心脏的多种损伤引起,其中之一是遗传性疾病。在一些实施方案中,本公开文本涉及治疗患有进行性收缩性衰竭的患者。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗患有心肌细胞肥大、肌原纤维损失和间质纤维化中的一种或多种的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗患有遗传形式的DCM的患者的方法。

[0764] 当前已识别出超过50种与DCM相关的基因,其中大多编码心肌细胞肌节中的蛋白质。DCM中的关键疾病基因示于表7中。目前已经在大约30%至35%的患有家族性DCM的患者中鉴定出突变,其中以下4种基因占大多数:肌连蛋白(TTN)、核纤层蛋白A/C(LMNA)、β-肌球蛋白重链(MYH7)和心肌肌钙蛋白T(TNNT2)。肌连蛋白突变似乎最常见。如果存在传导异常,则通常在多达三分之一的病例中发现LMNA中的突变。所报道基因的多重性代表多种细胞途径,它们都汇聚在临床上无法明显区分的宏观DCM表型上。尽管似乎不存在统一的细胞病理

生理学，可以依据对收缩力生成和调节、力转导和力学感受以及核蛋白和转录因子的致病作用将DCM基因大概地分组(表7)。在这些类别以外，已经提出具有广泛细胞作用的其他候选基因并且将继续出现，例如，关于离子通道功能、自噬以及线粒体调节，但是仍有待充分验证或复证为导致DCM的机械途径。

[0765] 表7.扩张型心肌病(DCM)中的关键疾病基因

[0766]

基因	描述
力生成/调节	
ACTC1	肌动蛋白，α，心肌1
MYH7	肌球蛋白，重链7，心肌，β
TNNT2	肌钙蛋白T 2型(心脏)
TNNI3	肌钙蛋白I 3型(心脏)
TNNC1	肌钙蛋白C 1型(缓慢)
PLN	受磷蛋白
力转导/力学感受	
TTN	肌连蛋白
DMD	抗肌萎缩蛋白
SGCD	肌聚糖蛋白，Δ(35 kDa抗肌萎缩蛋白相关的)
DES	结蛋白
核蛋白/转录	
LMNA	核纤层蛋白A/C
其他	
RBM20	RNA结合基序蛋白20
涉及连接/共分离但未被连接/共分离支持	
ACTN2	辅肌动蛋白，α2
VCL	黏着斑蛋白
TMPO	胸腺生成素
TCAP	肌连蛋白-帽
BAG3	BCL2相关的永生基因3
LDB3	LIM结构域结合3
ANKRD1	锚蛋白重复结构域1(心肌)

[0767] 粗肌丝和细肌丝二者的蛋白质中的突变可能引起DCM。II型肌球蛋白的收缩力生成所固有的β-肌球蛋白重链(MYH7)是DCM中最常突变的肌节基因。MYH7突变发现于5％至10％的DCM病例中。等位基因异质性是广泛的，已报道多种不同的突变。除了HCM和LVNC外，细肌丝蛋白心脏肌动蛋白(ACTC1)是DCM的罕见病因，但却是第一个被鉴定的肌节DCM基因。在ACTC1抗肌萎缩蛋白结合位点处的突变通常与DCM的发展相关。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有MYH7中的一个或多个突变的患有DCM的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有ACTC1中的一个或多个突变的患有DCM的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有ACTC1和MYH7中的一个或多个突变的患有DCM的患者的方法。

[0768] 肌节收缩的调节主要由原肌球蛋白和由T、I和C亚基构成的肌钙蛋白复合物介导。结合原肌球蛋白的肌钙蛋白T(TNNT2)调节肌钙蛋白复合物与细肌丝的相互作用。肌钙蛋白I(TNNI3)在心脏舒张期期间通过对肌动蛋白-肌球蛋白结合的抑制作用来调节肌节激活，并且肌钙蛋白C(TNNC1)在心缩期期间结合钙并促进肌动蛋白与肌球蛋白之间的横桥形成，从而导致收缩。已经在所有3个亚基中鉴定引起DCM的突变并且与受损的钙敏感性相关。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有TNNT2中的一个或多个突变的患有DCM的患

者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有TNNI3中的一个或多个突变的患有DCM的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有TNNC1中的一个或多个突变的患有DCM的患者的方法。

[0769] 在肌节以外，收缩力生成的失调与DCM的发展明显相关。受磷蛋白(PLN)是小的高度保守的磷蛋白，其调节肌质网钙摄取，从而影响肌丝的下游力产生。PLN中的突变引起常染色体显性DCM并且是罕见但充分表征的，其中Arg14del突变因其与室性心律失常的关联而值得注意。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有PLN中的一个或多个突变的患有DCM的患者的方法。

[0770] 力跨越肌节、细胞骨架和细胞外基质的有效传递是正常的心脏收缩功能所必需的。具有主要结构功能的多种蛋白质或者用作调节肌节的力学感受器的那些蛋白质与家族性DCM相关联。关键例子是肌连蛋白、抗肌萎缩蛋白和结蛋白。跨越一半肌节从Z盘至M线的巨型蛋白肌连蛋白起弹性分子弹簧的作用，调节被动张力和主动收缩。肌连蛋白基因(TTN)含有363个外显子和大约33,000个氨基酸，并且与>20种其他结构蛋白、信号传导蛋白和调节蛋白(包括连续蛋白(telethonin)、α-辅肌动蛋白以及Z盘处假定的力学感受器复合物中可能的肌肉LIM)相互作用。肌连蛋白病(titinopathy)的范围还包括骨骼肌表型，包括肢带型肌营养不良、胫骨肌营养不良和伴有早期呼吸衰竭的遗传性肌病;然而，迄今几乎没有关于引起DCM的突变的骨骼肌受累的证据。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有TTN中的一个或多个突变的患有DCM的患者的方法。

[0771] 力转导中的关键蛋白质的另一个例子是抗肌萎缩蛋白(DMD)，它是第一个报道的DCM疾病基因。除了X连锁扩张型心肌病(DCM)外，DMD中的突变引起迪谢内肌营养不良和贝克肌营养不良，它们的特征为进行性骨骼肌无力。抗肌萎缩蛋白是在肌节与细胞外基质之间形成跨膜连接的大型细胞骨架蛋白、抗肌萎缩蛋白相关的糖蛋白复合物，以及其他蛋白质如肌聚糖蛋白。δ-肌聚糖蛋白(SGCD)中的突变还参与DCM，但是它们通常引起肢带型肌营养不良。结蛋白(DES)突变是DCM的罕见病因，但是对于与心律失常以及HF的关联是重要的。已经报道结蛋白单头结构域中的基础突变主要引起伴有传导疾病的右心室心肌病。结蛋白是中间丝蛋白，其与微丝和微管一起维持细胞骨架基础结构和亚细胞空间组织。除了DCM外，结蛋白突变可能引起骨骼肌疾病，包括肌原纤维肌病和肩腓肌综合征。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有DMD中的一个或多个突变的患有DCM的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有DES中的一个或多个突变的患有DCM的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有SGCD中的一个或多个突变的患有DCM的患者的方法。

[0772] 由LMNA突变引起的DCM在临床上与众不同，因为它与进行性传导疾病、最初房室传导阻滞和心源性猝死(SCD)的高风险相关。传导异常通常早于DCM的发展，其可能是孤立的或者涉及相关骨骼肌疾病。还已报道其他罕见的心脏表型，包括早期心房颤动、LVNC、RCM和HCM。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有LMNA中的一个或多个突变的患有DCM的患者的方法。

[0773] DCM中涉及的其他基因示于表7中。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有RBM20中的一个或多个突变的患有DCM的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有ACTN2中的一个或多个突变的患有DCM的患者的方法。在一些实施方案

中，本公开文本涉及一种治疗具有VCL中的一个或多个突变的患有DCM的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有TMPO中的一个或多个突变的患有DCM的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有TCAP中的一个或多个突变的患有DCM的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有BAG3中的一个或多个突变的患有DCM的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有LDB3中的一个或多个突变的患有DCM的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有ANKRD1中的一个或多个突变的患有DCM的患者的方法。

[0774] 遗传性DCM的发展随时间而发生，通常具有延长的无症状期，在此期间心脏最初在宏观上形态和功能都正常。在已知个体为基因型阳性和表型阴性(例如，具有已知DCM的家族中的个体)时，鉴于表达度和外显率的易变性，表型的时序和严重性难以预测。通过连续随访，通过超声心动图显像或磁共振成像进行成像通常将在明显症状之前检测到心脏大小或功能的异常。一旦出现明显的症状，与左心室功能障碍的程度存在近似相关性，但是其他因素如舒张功能、心律失常、二尖瓣反流、右侧HF和其他共病会相互影响。

[0775] 鉴于其在一般人群中的患病率，仅HF的家族史通常不足以指示家族性DCM的诊断，但是存在一些强提示性的特征(例如，小于55岁(男性)或65岁(女性)的一级亲属的心脏病发作、原因不明性猝死、复发性或原因不明性晕厥或近乎晕厥、小于60岁的年轻一级亲属的心力衰竭或者一级亲属的心脏移植)。DCM中的遗传模式最常为常染色体显性，但外显率降低，使得所有并非所有具有突变的家族成员将患上DCM。还存在X连锁的常染色体隐性和线粒体形式的可遗传的DCM。表达度也是可变的，并且DCM表型的严重性在受影响的家族成员之间可以明显变化。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有常染色体显性DCM的患有DCM的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有常染色体隐性DCM的患有DCM的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有X连锁DCM的患有DCM的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有线粒体DCM的患有DCM的患者的方法。

[0776] 大约25％的患有扩张型心肌病(DCM)的患者将具有中壁纤维化的证据，中壁纤维化是死亡率和发病率的独立预测因子。具有中壁纤维化的DCM患者与患有缺血性疾病的那些具有类似的结局。因此，与缺血性心肌病一样，纤维化/瘢痕的存在是不良结局的标记物以及对装置疗法的较差反应。

[0777] DCM是心力衰竭的左心室扩张的表型。扩张的表型是异质性的组，其特征为大左心室(LV)腔伴随偏心型重塑或肥大以及收缩性受损。这样的表型可能是对通常在瓣膜疾病或高血压、严重冠心病或先天性疾病中的异常负荷条件的反应，或者主要受限于心肌，像在遗传性或获得性心肌病如DCM中一样。使用经胸超声心动图显像作为用于鉴定表型的一线成像工具。图像通常显示全面左心室或双心室低动力，伴随或不伴随局部室壁运动异常。也可能记录由于环形扩张所致的心室和心房扩张、心内血栓和功能性二尖瓣反流。多普勒参数可以帮助对瓣膜异常和舒张功能障碍的严重性进行定量。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有大左心室(LV)腔伴随偏心型重塑或肥大以及收缩性受损中的一种或多种的患有DCM的患者的方法。

[0778] 尽管超声心动图显像是DCM的一线诊断工具，但是从3D超声心动图显像采集的容积和射血分数(EF)与心脏磁共振成像(CMR)的相关性更高，并且在可行时推荐其使用。CMR

在表型评估中起关键作用。

[0779] 肥厚型心肌病(HCM)

[0780] 肥厚型心肌病(HCM)是最常见的遗传性心脏病,其患病率为大约500分之一。HCM的特征为不当的心肌肥大,其在没有压力超负荷(例如,高血压、主动脉瓣狭窄)或浸润(例如,淀粉样变性)的情况下发展的。HCM中的肥大经典地影响室间隔,引起左心室流出道梗阻,但是可能是尖部肥大、节段性肥大或向心性肥大。组织学疾病特征是间质纤维化、肌细胞增大和混乱。在某些方面,本公开文本涉及治疗、预防或降低的进展率和/或严重性肥厚型心肌病(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗患有HCM的患有HFrEF的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗在不存在压力超负荷和/或浸润的情况下具有不当的心肌肥大的患有HCM的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗具有间质纤维化、肌细胞增大和/或混乱中的一种或多种的患有HCM的患者。

[0781] 多达20%的患有HCM的患者在48±19岁的中值年龄患上HF,并且HF率可能随着通过ICD植入降低心源性猝死所致的死亡率而增加。临床上描述三种HF亚型。第一,约30%的患有HF的HCM患者已经患上进行性左心室扩张、减薄和收缩功能障碍,描述为“竭尽型(burnt-out)”HCM。大约20%的患有HF的HCM患者已经患上归因于左心室流出道梗阻所致的压力超负荷的左心室收缩功能障碍。最后,多达50%的患有HF的HCM患者显示舒张型HF的证据,其射血分数正常或超常但心室舒张受损,舒张期末压升高,左心房扩大,且具有心房颤动。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗患有进行性左心室扩张、减薄和收缩功能障碍的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗患有“竭尽型”HCM的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗患有归因于左心室流出道梗阻所致的压力超负荷的左心室收缩功能障碍的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗患有舒张型HF的患者的方法,所述患者射血分数正常或超常但心室舒张受损,舒张期末压升高,左心房扩大,且具有心房颤动。

[0782] HCM主要是一种肌节疾病,在大约60%的临床同龄组中检测到编码收缩或调节蛋白的八个肌节基因中的突变(表8)。在细胞水平上,HCM突变导致肌丝敏感性和对钙的亲和力增加并且肌动蛋白激活的ATP酶活性增加。像DCM和AC一样,遗传通常为常染色体显性的,具有基因座和等位基因异质性,并且在出现可变表型之前通常存在沉默代偿期。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗具有肌节基因中的突变的患者的方法。在一些实施方案中,患者具有常染色体显性突变。

[0783] 最常见的HCM基因β-肌球蛋白重链(MYH7)和肌球蛋白结合蛋白C(MYBPC3)共占HCM疾病的大约50%。仅在MYH7中已发现大约200个突变。其他关键基因示于表8中。其余肌节基因是心肌肌钙蛋白T(TNNT2)、心肌肌钙蛋白I(TNNI3)、α-原肌球蛋白(TPM1)、心脏肌动蛋白(ACTC1)、必需的肌球蛋白轻链3(MYL3)以及调节性肌球蛋白轻链(MYL2)。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗具有β-肌球蛋白重链(MYH7)中的突变的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗具有肌球蛋白结合蛋白C(MYBPC3)中的突变的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗具有心肌肌钙蛋白T(TNNT2)中的突

变的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有心肌肌钙蛋白I(TNNI3)中的突变的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有α-原肌球蛋白(TPM1)中的突变的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有心脏肌动蛋白(ACTC1)中的突变的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有必需的肌球蛋白轻链3(MYL3)中的突变的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有调节性肌球蛋白轻链(MYL2)中的突变的患者的方法。

[0784] 在约40％的HCM患者中，可以在已知的HCM疾病基因中鉴定出没有原因突变(表8)。这可能意味着，其他基因仍有待定义，或者非孟德尔遗传或非遗传因素也起作用。作为遵循孟德尔遗传模式的单基因疾病的HCM的模型逐渐被认为过度简化。除了致病突变，HCM表型的遗传、表观遗传和环境修饰因子也是重要的，但尚未被充分理解。在具有相同基因型的患者中，在肥大模式和临床过程二者中，这些因子成为高表型变异性的基础。

[0785] 表8.肥厚型心肌病(HCM)中的关键疾病基因

[0786]

基因	描述
肌节	
MYH7	肌球蛋白，重链7，心肌，β
MYBPC3	肌球蛋白结合蛋白C，心脏
TNNT2	肌钙蛋白T 2型(心脏)
TNNI3	肌钙蛋白I 3型(心脏)
TPM1	原肌球蛋白1(α)
MYL2	肌球蛋白，轻链2，调节性心脏，缓慢
MYL3	肌球蛋白，轻链3，碱，心室，骨骼，缓慢
ACTC1	肌动蛋白，α，心肌1
非肌节	
CSRP3	富含半胱氨酸和甘氨酸的蛋白3(心脏LIM蛋白)
肥厚型心肌病拟表型	
PRKAG2	蛋白质激酶，AMP激活的，γ2非催化性亚基
LAMP2	溶酶体相关膜蛋白2
GLA	半乳糖苷酶，α
FHL1	四又二分之一个LIM结构域1

[0787] 致心律失常性心肌病(AC)

[0788] 致心律失常性心肌病(AC)的特征为心室肌的进行性纤维脂肪置换，其导致患者的心律失常、HF和SCD。其经典地描述为右心室的疾病，有时称为致心律失常性右心室心肌病(ARVC)，但是左心室受累逐渐被认可。左心室AC与DCM的区别之处在于对于给定程度的收缩功能障碍，其不规则受累和对心律失常不成比例的倾向。因为可能存在右心室、左心室或双心室受累，已经将所述表型更准确地重命名为AC。特征性组织学发现是不规则纤维化、炎症、肌细胞死亡、壁减薄和动脉瘤形成。AC经典地存在于患有恶性心律失常的先证者中，其可能在青春期或青年期中引起心源性猝死作为疾病的首发表现。具有心律失常特征的“隐匿”期通常在显性心肌病之前。在某些方面，本公开文本涉及治疗、预防致心律失常性心肌病或降低致心律失常性心肌病的进展率和/或严重性的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如，ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)。在一些实施方案中，所述方法涉及治疗患有AC患有HFrEF的患者。在一些实施方案中，所述方法涉及治疗具有心室肌的进行性纤维脂肪置换的患有AC的患者。

[0789] 在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有心室肌的进行性纤维脂肪置换的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有心律失常的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有不规则纤维化、炎症、肌细胞死亡、壁减薄和动脉瘤形成中的一种或多种的患者的方法。

[0790] 约10％与约20％之间的患有AC的患者将患上HF，伴随右心室或左心室(或者双心室)收缩功能障碍，其可能很少是所述疾病的呈现特征。AC在大于50％的病例中是家族性疾病，估计的患病率为1000分之一至5000分之一。像DCM和HCM一样，AC的表型、基因型和等位基因是异质性的。其经典地描述为常染色体显性遗传的，但是这可能是过度简化，有许多患者携带>1个疾病基因中的突变(双重或复合杂合性)。外显率(其为年龄依赖性的，如在其他心肌病中)较低；已经描述AC的两种常染色体隐性形式，即心脏皮肤障碍Naxos病和Carvajal综合征，其包括AC、掌跖角化病和羊毛状发。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有右心室收缩功能障碍的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有左心室收缩功能障碍的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有右心室和左心室收缩功能障碍的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有常染色体显性突变的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有Naxos病的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗患有Carvajal综合征的患者的方法。

[0791] AC在遗传上作为“桥粒疾病”而出现，在编码桥粒复合物的5个基因中鉴定出致病突变(表9)。桥粒是对称的连接复合物，其跨越细胞间膜并实现强化和信号传导作用，从而对闰盘作出贡献。其由桥粒钙黏着蛋白(例如，桥粒胶蛋白2(DSC2)和桥粒黏蛋白2(DSG2))、犰狳蛋白(包括连接斑珠蛋白(JUP)和斑菲素蛋白2(PKP2))和斑蛋白(例如，桥粒斑蛋白(DSP))组成。DSG2和DSC2形成桥粒的跨膜组分并且通过斑珠蛋白和斑菲素蛋白2锚定于细胞内，它们结合桥粒斑蛋白的N末端结构域。桥粒斑蛋白转而在其C末端与结蛋白中间丝连接。除了结构性作用外，桥粒通过斑菲素蛋白2与Wnt/β-连环素信号传导途径相关联，斑菲素蛋白2易位至细胞核以修饰基因表达。AC中的致病突变引起错误定位和桥粒数量的减少、闰盘重塑伴随间隙连接的相关异常形成，以及桥粒斑蛋白/斑珠蛋白的错误掺入。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有桥粒胶蛋白2(DSC2)中的突变的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有桥粒黏蛋白2(DSG2)中的突变的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有桥粒斑蛋白(DSP)中的突变的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有连接斑珠蛋白(JUP)中的突变的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有斑菲素蛋白2(PKP2)中的突变的患者的方法。在一些实施方案中，本公开文本涉及一种治疗具有跨膜蛋白43(TMEM43)中的突变的患者的方法。

[0792] 据报道几种桥粒外基因会引起AC，包括TMEM43和TGFB3。也已经提出AC的其他候选基因，包括TTN和PLN，但是这些未被连接支持，并且在经典的致心律失常性右心室心肌病、左优势型AC与伴随心律失常的DCM之间存在表型边界的模糊。最近已经报道LMNA中的突变模拟AC表型。

[0793] 表9.致心律失常性心肌病(AC)中的关键疾病基因

[0794]

基因	描述
桥粒	
PKP2	斑菲素蛋白2
DSC2	桥粒胶蛋白2
DSG2	桥粒黏蛋白2
DSP	桥粒斑蛋白
JUP	连接斑珠蛋白
桥粒外	
TMEM43	跨膜蛋白43

[0795] 左心室致密化不全性心肌病(LVNC)

[0796] 左心室致密化不全性心肌病(LVNC)是不常见但逐渐被公认的心肌病,其为散发性或家族性,其中心肌的深度小梁形成与进行性收缩功能障碍相关。LVNC表型与HCM和DCM广泛重叠并且通常与结构性心脏病(例如,埃布斯坦综合征、肺动脉瓣闭锁、房/室间隔缺损和动脉导管未闭)共存。它也是包括心脏的多系统障碍的特征,包括巴思综合征和努南综合征。在某些方面,本公开文本涉及治疗、预防左心室致密化不全性心肌病或降低左心室致密化不全性心肌病的进展率和/或严重性,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗患有LVNC的患有HFrEF的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗患有家族性LVNC的患有HFrEF的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗患有散发性LVNC的患有HFrEF的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗患有LVNC的患者,其中心肌的深度小梁形成与进行性收缩功能障碍相关。

[0797] LVNC的诊断病征是致密化不全的2层心肌。已经提出来自胚胎发育心脏的持续致密化不全是发病机制的基础,但是已报道在患上LVNC之前正常的心肌外观。使用心脏磁共振成像对LVNC的诊断灵敏度显著高于超声心动图显像。

[0798] LVNC在临床上表现为HF、血栓栓塞、心律失常或心源性猝死。收缩功能障碍和舒张功能障碍是常见的,且在超过一半的患者中表现时报道HF。HF发展背后的准确机制尚不清楚,但是微血管缺血和纤维化都可能是促成因素。表现可能发生在子宫内、婴儿期中、童年期中或成年期中,并且这即使在家族内也会广泛地变化。

[0799] 在患有巴思综合征、引起DCM或LVNC的X连锁疾病、骨骼肌病、周期性中性粒细胞减少症和生长受限的患者中,TAZ是LVNC中涉及的第一个基因。TAZ编码称为tafazzin的蛋白质家族,tafazzin具有线粒体心磷脂的重塑所需的酰基转移酶功能,继而为正常线粒体形态和OXPHOS所需。当在家族成员中始终见到LVNC表型时(与在具有原本典型的HCM或DCM的家族中的个体中出现者相反),已经发现肌节、细胞骨架和核膜基因中的突变(例如,MYH7、ACTC、TNNT2、MYBPC3和TPM1中的突变)。遗传可以是常染色体显性、隐性或X连锁的,并且外显率是可变的。即使在患有LVNC的限定的同龄组中,通过筛选已知疾病基因获得的突变的产量也保持较低。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗具有TAZ中的突变的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗具有MYH7中的突变的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗具有ACTC中的突变的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗具有TNNT2中的突变的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗具有MYBPC3中的突变的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文

本涉及一种治疗具有TPM1中的突变的患者的方法。

[0800] 也已经连同由α-肌养蛋白(DTNA)中的突变引起的先天性心脏缺损(主要是心室间隔缺损)一起报道LVNC表型。α-肌养蛋白促成抗肌萎缩蛋白相关的糖蛋白复合物,所述糖蛋白复合物是细胞外基质与基于抗肌萎缩蛋白的细胞骨架的正常连接所需的。α-肌养蛋白中的突变还引起肌营养不良表型。在一些实施方案中,患者具有DTNA中的突变。

[0801] 除了DCM,在LVNC中报道LDB3(Cypher/ZASP)中的突变。已经报道与几种其他基因(包括LMNA、MIB1、线粒体基因)中的突变和染色体不平衡/缺失相关的散发性或家族性疾病。已经提出SCN5a中的变体改变心律失常风险。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗具有LDB3中的突变的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗具有LMNA中的突变的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗具有MIB1中的突变的患者的方法。

[0802] 限制型心肌病(RCM)

[0803] 限制型心肌病(RCM)是罕见心肌病,其特征为心室充盈和舒张功能受损伴随相对正常的心室壁厚度和收缩功能。RCM的病因广泛,包括遗传性疾病(散发性或家族性)、浸润(例如,淀粉样变性、结节病)、结缔组织病(例如,系统性硬化病)、糖原贮积病、药物和辐射。一部分仍是特发性的,可能是遗传的,没有已知的明确原因突变。限制性生理学是几种其他心肌病(特别是HCM)的特征,并且在这2种表型中存在一定重叠。非常常见地,在家族中鉴定出具有经典RCM特征的个体,其中大多数受影响的成员患有典型的HCM。在某些方面,本公开文本涉及治疗、预防限制型心肌病或降低限制型心肌病的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗患有RC的患有HFrEF的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗患有RC伴随心室充盈和舒张功能受损且具有相对正常的心室壁厚度和收缩功能的患有HFrEF的患者。

[0804] RCM的预后(特别是在儿童中)较差,其结局比HCM或DCM更差,且5年无移植存活率仅为约22%。导致心房扩大、心房颤动和血栓栓塞风险的舒张期末左心室压升高是常见的。存在从舒张功能障碍至难治性收缩型HF的进展,通常需要心脏移植。

[0805] 发现一些患有RCM的患者携带TNNI3中的突变。随后已经在患有RCM的患者中报道几个肌节基因中的突变,但是在大多数病例中,在所报道的等位基因与RCM的特定表型之间没有令人信服的关联。也已报道非肌节RCM突变。除了DCM,中间丝蛋白结蛋白(DES)中的突变可能引起伴随传导疾病的RCM表型。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗具有TNNI3中的突变的患者的方法。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种治疗具有DES中的突变的患者的方法。

[0806] 7.心力衰竭的诊断

[0807] HFpEF的诊断仍具有挑战性。在HFpEF患者中,LVEF是正常的并且HF的体征和症状通常是非特异性的,并且在HF与其他临床病症之间无法明确区分。慢性HFpEF的诊断是麻烦的,尤其在患有共病且没有明显的中心体液超量体征的典型老年患者中,并且难以找到验证金标准。为了改进诊断HFpEF的特异性,临床诊断应由静息时或运动期间心脏功能障碍的客观量度来支持。HFpEF的诊断通常需要以下各项:HF的症状和/或体征的存在;“保留的”EF

(定义为LVEF≥50%或者有时对于HFmrEF定义为40-49%);升高水平的NP(BNP>35pg/mL和/或NT-proBNP>125pg/mL);HF的其他潜在心脏功能和结构改变的客观证据;并且在不确定的情形中,可能需要应激试验或侵入性测量的升高的LV充盈压来确认诊断。

[0808] 利尿钠肽

[0809] 利尿钠肽(NP)(包括BNP和NT-proBNP)的血浆浓度可以用作初始诊断测试,尤其在非急性环境中,在超声心动图显像并非立即可用时。升高的NP帮助确立初始工作诊断,鉴定需要进一步心脏研究的那些。数值低于用于排除重要心脏功能障碍的截止点的患者通常不需要超声心动图显像。在某些方面,本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂),其中所述患者具有升高水平的一种或多种利尿钠肽。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗患有心力衰竭的患者,其中所述患者具有升高水平的BNP。在一些实施方案中,所述方法涉及治疗患有心力衰竭的患者,其中所述患者具有升高水平的NT-proBNP。在一些实施方案中,患者NP(例如,BNP和/或NT-proBNP)与类似年龄和性别的健康人相比有所升高。

[0810] BNP和NT-proBNP二者都是由于心内压增加所致的心房和心室扩张的标记物。纽约心脏协会(NYHA)开发出基于症状严重性的用于充血性心力衰竭(CHF)的4期功能分级系统。研究已证实,循环BNP和NT-proBNP的测量浓度随着基于NYHA分级的CHF严重性而增加。

[0811] 具有正常血浆NP浓度的患者不可能患有HF。在非急性环境中,B型利尿钠肽(BNP)的正常值上限为35pg/mL,并且N末端pro-BNP(NT-proBNP)的正常值上限为125pg/mL;在急性环境中,应使用更高值[例如,BNP,100pg/mL;NT-proBNP,300pg/mL;以及中间区pro A型利尿钠肽(MR-proANP),120pmol/L]。诊断值类似地应用于HFrEF和HFpEF。平均而言,HFpEF的值通常低于HFrEF。

[0812] NP升高存在多种心血管和非心血管原因,可能减弱其在HF中的诊断效用。其中,AF、年龄和肾衰竭是阻碍对NP测量值的解释的最重要因素。另一方面你,NP水平在肥胖患者中可能不成比例地低。

[0813] BNP

[0814] 在某些方面,本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂),其中所述患者具有升高水平的BNP。在一些实施方案中,所述方法涉及BNP水平为至少35pg/mL的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及BNP水平为至少40pg/mL的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及BNP水平为至少50pg/mL的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及BNP水平为至少60pg/mL的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及BNP水平为至少70pg/mL的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及BNP水平为至少80pg/mL的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及BNP水平为至少90pg/mL的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及BNP水平为至少100pg/mL的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及BNP

水平为至少150pg/mL的患者。在一些实施方案中，所述方法涉及BNP水平为至少200pg/mL的患者。在一些实施方案中，所述方法涉及BNP水平为至少300pg/mL的患者。在一些实施方案中，所述方法涉及BNP水平为至少400pg/mL的患者。在一些实施方案中，所述方法涉及BNP水平为至少500pg/mL的患者。在一些实施方案中，所述方法涉及BNP水平为至少1000pg/mL的患者。在一些实施方案中，所述方法涉及BNP水平为至少5000pg/mL的患者。在一些实施方案中，所述方法涉及BNP水平为至少10,000pg/mL的患者。在一些实施方案中，所述方法涉及BNP水平为至少15,000pg/mL的患者。在一些实施方案中，所述方法涉及BNP水平为至少20,000pg/mL的患者。

[0815] 在一些实施方案中，本公开文本涉及将心力衰竭患者中的一种或多种利尿钠肽向更正常的水平(例如，如与类似年龄和性别的健康人相比正常)调整的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如，ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少5pg/mL。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少10pg/mL。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少50pg/mL。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少100pg/mL。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少200pg/mL。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少500pg/mL。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少1000pg/mL。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少5000pg/mL。

[0816] 在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少5％(例如，5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或100％)。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少5％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少10％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少15％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少20％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少25％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少30％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少35％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少40％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少45％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少50％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少55％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少60％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少65％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少70％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少75％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少80％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少85％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少90％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少95％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的BNP降低至少100％。

[0817] NT-proBNP

[0818] 在某些方面，本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如，扩张型心肌病(DCM)、与

肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂),其中所述患者的NT-proBNP水平为至少100pg/mL(例如,100、125、150、200、300、400、500、1000、3000、5000、10,000、15,000、20,000、25,000或30,000pg/mL)。在一些实施方案中,所述方法涉及NT-proBNP水平为至少100pg/mL的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及NT-proBNP水平为至少125pg/mL的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及NT-proBNP水平为至少150pg/mL的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及NT-proBNP水平为至少200pg/mL的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及NT-proBNP水平为至少300pg/mL的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及NT-proBNP水平为至少400pg/mL的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及NT-proBNP水平为至少500pg/mL的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及NT-proBNP水平为至少1000pg/mL的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及NT-proBNP水平为至少5000pg/mL的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及NT-proBNP水平为至少10,000pg/mL的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及NT-proBNP水平为至少15,000pg/mL的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及NT-proBNP水平为至少20,000pg/mL的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及NT-proBNP水平为至少25,000pg/mL的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及NT-proBNP水平为至少30,000pg/mL的患者。

[0819] 在一些实施方案中,本公开文本涉及将心力衰竭患者中的一种或多种利尿钠肽向更正常的水平(例如,如与类似年龄和性别的健康人相比正常)调整的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少10pg/mL。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少25pg/mL。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少50pg/mL。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少100pg/mL。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少200pg/mL。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少500pg/mL。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少1000pg/mL。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少5000pg/mL。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少10,000pg/mL。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少15,000pg/mL。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少20,000pg/mL。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少25,000pg/mL。

[0820] 在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少5%(例如,5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少5%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少10%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少15%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少20%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少25%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述

患者的NT-proBNP降低至少30％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少35％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少40％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少45％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少50％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少55％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少60％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少65％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少70％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少75％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少80％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少85％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少90％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少95％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的NT-proBNP降低至少100％。

[0821] 肌钙蛋白水平

[0822] 肌钙蛋白或肌钙蛋白复合物是三种调节蛋白(肌钙蛋白C、肌钙蛋白I和肌钙蛋白T)的复合物，所述复合物是骨骼肌和心肌但非平滑肌的肌肉收缩不可缺少的。血液肌钙蛋白水平可以用作脑卒中的诊断标记物，但是这种测量的灵敏度较低。心脏特异性肌钙蛋白I和T的测量在心肌梗死和急性冠脉综合征的管理中广泛用作诊断和预后指示物。

[0823] 某些亚型的肌钙蛋白(心脏I和T)是对心脏肌肉(心肌)损伤的敏感且特异性的指示物。在血液中测量它们以在患有胸痛或急性冠脉综合征的人中区分不稳定型心绞痛与心肌梗死(心脏病发作)。最近患有心肌梗死的人会具有心肌受损区域和升高的血液心肌肌钙蛋白水平。这可能也发生在患有冠状动脉血管痉挛(一类涉及心脏血管严重收缩的心肌梗死)的人中。在心肌梗死后，肌钙蛋白可能保持较高长达2周。

[0824] 心肌肌钙蛋白是心肌损伤的标记物。指示心肌梗死的肌钙蛋白升高的诊断标准目前由WHO设定为2μg或更高的阈值。其他心脏生物标记物的临界水平也是相关的，如肌酸激酶。直接或间接导致心肌损伤和死亡的其他病症也可能增加肌钙蛋白水平，如肾衰竭。具有正常冠状动脉的个体中的严重心动过速(例如由于室上性心动过速所致)也可能导致肌钙蛋白增加，例如，假定由于需氧量增加和心肌供氧不足所致。

[0825] 在患有心力衰竭的患者中肌钙蛋白增加，其中肌钙蛋白也预示死亡率和室性心律异常。肌钙蛋白可能在炎性病症如心肌炎和伴随心肌受累的心包炎(则其被称为心肌心包炎)中升高。肌钙蛋白也可能指示几种形式的心肌病，如扩张型心肌病、肥厚型心肌病或(左)心室肥大、围生期心肌病、Takotsubo心肌病或浸润性障碍如心脏淀粉样变性。

[0826] 在某些方面，本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如，扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如，ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)，其中所述患者具有升高水平的肌钙蛋白。在一些实施方案中，本公开文本涉及将心力衰竭患者中的一种或多种参数向更正常的水平(例如，如与类似年龄和性别的健康人相比正常)调整的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的

ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的肌钙蛋白水平降低至少1%(例如,1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的肌钙蛋白水平降低至少1%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的肌钙蛋白水平降低至少5%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的肌钙蛋白水平降低至少10%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的肌钙蛋白水平降低至少15%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的肌钙蛋白水平降低至少20%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的肌钙蛋白水平降低至少25%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的肌钙蛋白水平降低至少30%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的肌钙蛋白水平降低至少35%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的肌钙蛋白水平降低至少40%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的肌钙蛋白水平降低至少45%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的肌钙蛋白水平降低至少50%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的肌钙蛋白水平降低至少55%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的肌钙蛋白水平降低至少60%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的肌钙蛋白水平降低至少65%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的肌钙蛋白水平降低至少70%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的肌钙蛋白水平降低至少75%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的肌钙蛋白水平降低至少80%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的肌钙蛋白水平降低至少85%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的肌钙蛋白水平降低至少90%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的肌钙蛋白水平降低至少95%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的肌钙蛋白水平降低至少100%。

[0827] 右心室肥大

[0828] 在某些方面,本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂),其中所述患者患有右心室肥大。在一些实施方案中,本公开文本涉及将心力衰竭患者中的一种或多种参数向更正常的水平(例如,如与类似年龄和性别的健康人相比正常)调整的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的右心室肥大减少至少1%(例如,1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的右心室肥大减少至少1%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的右心室肥大减少至少5%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的右心室肥大减少至少10%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的右心室肥大减少至少15%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的右心室肥大减少至少20%。在一些实

施方案中,所述方法涉及将所述患者的右心室肥大减少至少25%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的右心室肥大减少至少30%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的右心室肥大减少至少35%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的右心室肥大减少至少40%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的右心室肥大减少至少45%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的右心室肥大减少至少50%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的右心室肥大减少至少55%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的右心室肥大减少至少60%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的右心室肥大减少至少65%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的右心室肥大减少至少70%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的右心室肥大减少至少75%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的右心室肥大减少至少80%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的右心室肥大减少至少85%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的右心室肥大减少至少90%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的右心室肥大减少至少95%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的右心室肥大减少至少100%。

[0829] 左心室肥大

[0830] 在某些方面,本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂),其中所述患者患有左心室肥大。在一些实施方案中,本公开文本涉及将心力衰竭患者中的一种或多种参数向更正常的水平(例如,如与类似年龄和性别的健康人相比正常)调整的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的左心室肥大减少至少1%(例如,1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的左心室肥大减少至少1%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的左心室肥大减少至少5%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的左心室肥大减少至少10%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的左心室肥大减少至少15%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的左心室肥大减少至少20%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的左心室肥大减少至少25%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的左心室肥大减少至少30%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的左心室肥大减少至少35%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的左心室肥大减少至少40%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的左心室肥大减少至少45%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的左心室肥大减少至少50%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的左心室肥大减少至少55%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的左心室肥大减少至少60%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的左心室肥大减少至少65%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的左心室肥大减少至少70%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的左心室肥大减少

至少75％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的左心室肥大减少至少80％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的左心室肥大减少至少85％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的左心室肥大减少至少90％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的左心室肥大减少至少95％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的左心室肥大减少至少100％。

[0831] 平滑肌肥大

[0832] 在某些方面，本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如，扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如，ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)，其中所述患者患有左心室肥大。在一些实施方案中，本公开文本涉及将心力衰竭患者中的一种或多种参数向更正常的水平(例如，如与类似年龄和性别的健康人相比正常)调整的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如，ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的平滑肌肥大减少至少1％(例如，1％、5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或100％)。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的平滑肌肥大减少至少1％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的平滑肌肥大减少至少5％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的平滑肌肥大减少至少10％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的平滑肌肥大减少至少15％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的平滑肌肥大减少至少20％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的平滑肌肥大减少至少25％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的平滑肌肥大减少至少30％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的平滑肌肥大减少至少35％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的平滑肌肥大减少至少40％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的平滑肌肥大减少至少45％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的平滑肌肥大减少至少50％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的平滑肌肥大减少至少55％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的平滑肌肥大减少至少60％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的平滑肌肥大减少至少65％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的平滑肌肥大减少至少70％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的平滑肌肥大减少至少75％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的平滑肌肥大减少至少80％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的平滑肌肥大减少至少85％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的平滑肌肥大减少至少90％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的平滑肌肥大减少至少95％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的平滑肌肥大减少至少100％。

[0833] 住院率

[0834] 在某些方面，本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如，扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如，ActRII-

ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)，其中所述方法降低所述患者的住院率(例如，降低至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的住院率降低至少1%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的住院率降低至少2%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的住院率降低至少3%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的住院率降低至少4%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的住院率降低至少5%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的住院率降低至少10%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的住院率降低至少15%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的住院率降低至少20%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的住院率降低至少25%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的住院率降低至少30%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的住院率降低至少35%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的住院率降低至少40%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的住院率降低至少45%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的住院率降低至少50%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的住院率降低至少55%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的住院率降低至少60%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的住院率降低至少65%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的住院率降低至少70%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的住院率降低至少75%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的住院率降低至少80%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的住院率降低至少85%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的住院率降低至少90%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的住院率降低至少95%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的住院率降低至少100%。

[0835] 心力衰竭的恶化率

[0836] 在某些方面，本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如，扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如，ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)，其中所述方法降低所述患者的心力衰竭的恶化率(例如，降低至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少1%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少2%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少3%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少4%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少5%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少10%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少15%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少20%。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少25%。在一些实施方案

中,所述方法涉及将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少30%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少35%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少40%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少45%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少50%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少55%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少60%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少65%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少70%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少75%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少80%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少85%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少90%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少95%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的心力衰竭的恶化率降低至少100%。

[0837] 舒张功能

[0838] 在某些方面,本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂),其中所述方法增加所述患者的LV舒张功能(例如,增加至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的LV舒张功能增加至少5%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的LV舒张功能增加至少10%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的LV舒张功能增加至少15%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的LV舒张功能增加至少20%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的LV舒张功能增加至少25%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的LV舒张功能增加至少30%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的LV舒张功能增加至少35%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的LV舒张功能增加至少40%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的LV舒张功能增加至少45%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的LV舒张功能增加至少50%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的LV舒张功能增加至少55%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的LV舒张功能增加至少60%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的LV舒张功能增加至少65%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的LV舒张功能增加至少70%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的LV舒张功能增加至少75%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的LV舒张功能增加至少80%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的LV舒张功能增加至少85%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的LV舒张功能增加至少90%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的LV舒张功能增加至少95%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的LV舒张功能增加至少100%。

[0839] 射血分数

[0840] 在某些方面,本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂),其中所述患者的射血分数小于45%(例如,10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%或45%)。在一些实施方案中,所述方法涉及射血分数小于10%的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及射血分数小于15%的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及射血分数小于20%的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及射血分数小于25%的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及射血分数小于30%的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及射血分数小于35%的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及射血分数小于40%的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及射血分数小于45%的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及射血分数小于50%的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及射血分数小于55%的患者。在一些实施方案中,所述射血分数为右心室射血分数。在一些实施方案中,所述射血分数为左心室射血分数。在一些实施方案中,所述射血分数是使用超声心动图来测量。在一些实施方案中,所述患者具有保留的左心室射血分数。

[0841] 在一些实施方案中,本公开文本涉及将心力衰竭患者中的射血分数向更正常的水平(例如,如与类似年龄和性别的健康人相比正常)增加的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的射血分数增加至少1%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的射血分数增加至少5%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的射血分数增加至少10%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的射血分数增加至少15%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的射血分数增加至少20%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的射血分数增加至少25%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的射血分数增加至少30%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的射血分数增加至少35%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的射血分数增加至少40%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的射血分数增加至少45%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的射血分数增加至少50%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的射血分数增加至少55%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的射血分数增加至少60%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的射血分数增加至少65%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的射血分数增加至少70%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的射血分数增加至少75%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的射血分数增加至少80%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的射血分数增加至少85%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的射血分数增加至少90%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的射血分数增加至少95%。在一些实施方案中,所述方法涉及将所述患者的射血分数增加至少100%。

[0842] 心排血量

[0843] 通常,静息时的正常心排血量为约2.5-4.2L/min/m2,并且心排血量在不偏离正常

限值的情况下可以下降几乎40％。小于约2.5L/min/m2的低心脏指数通常指示心血管表现的扰动。在某些方面，本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如，扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如，ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)，其中所述方法增加所述患者的心排血量(例如，增加至少5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或100％)。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心排血量增加至少5％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心排血量增加至少10％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心排血量增加至少15％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心排血量增加至少20％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心排血量增加至少25％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心排血量增加至少30％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心排血量增加至少35％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心排血量增加至少40％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心排血量增加至少45％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心排血量增加至少50％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心排血量增加至少55％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心排血量增加至少60％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心排血量增加至少65％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心排血量增加至少70％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心排血量增加至少75％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心排血量增加至少80％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心排血量增加至少85％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心排血量增加至少90％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心排血量增加至少95％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心排血量增加至少100％。在一些实施方案中，所述方法涉及将所述患者的心排血量增加至至少4.2L/min/m2。在一些实施方案中，所述心排血量是在静息时测量的。在一些实施方案中，所述心排血量是使用右心导管来测量。

[0844] 运动能力(6MWD和BDI)

[0845] 在某些方面，本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如，扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如，ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)。可以使用运动能力的任何合适的量度。例如，6分钟步行测试(6MWT)(其测量患者在6分钟内可以行走多远，即6分钟步行距离(6MWD))中的运动能力经常用于评估心力衰竭严重性和疾病进展。博格呼吸困难指数(BDI)是用于评估感观呼吸困难(呼吸不适)的数值标度。它测量呼吸急促的程度，例如在完成6MWT后，其中BDI为0表示无呼吸急促，且10表示最大呼吸急促。在一些实施方案中，所述方法涉及将患有心力衰竭(例如，扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的6MWD增加至少10米。在一些实施方案中，所述方法涉及将患有心力衰竭(例如，扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的6MWD增加至少30米。在一些实

施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的6MWD增加至少40米。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的6MWD增加至少60米。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的6MWD增加至少70米。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的6MWD增加至少80米。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的6MWD增加至少90米。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的6MWD增加至少100米。在一些实施方案中,所述6MWD是在所述患者已经接受4周的本文公开的所利用治疗之后测试的。在一些实施方案中,所述6MWD是在所述患者已经接受8周的本文公开的所利用治疗之后测试的。在一些实施方案中,所述6MWD是在所述患者已经接受12周的本文公开的所利用治疗之后测试的。在一些实施方案中,所述6MWD是在所述患者已经接受16周的本文公开的所利用治疗之后测试的。在一些实施方案中,所述6MWD是在所述患者已经接受20周的本文公开的所利用治疗之后测试的。在一些实施方案中,所述6MWD是在所述患者已经接受22周的本文公开的所利用治疗之后测试的。在一些实施方案中,所述6MWD是在所述患者已经接受24周的本文公开的所利用治疗之后测试的。在一些实施方案中,所述6MWD是在所述患者已经接受26周的本文公开的所利用治疗之后测试的。在一些实施方案中,所述6MWD是在所述患者已经接受28周的本文公开的所利用治疗之后测试的。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的BDI降低至少0.5个指数点。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的BDI降低至少1个指数点。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的BDI降低至少1.5个指数点。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的BDI降低至少2个指数点。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的BDI降低至少2.5个指数点。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的BDI降低至少3个指数点。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的BDI降低至少3.5个指数点。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的BDI降低至少4个指数点。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的BDI降低至少4.5个指数点。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的BDI降低至少5个指数点。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心

力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的BDI降低至少5.5个指数点。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的BDI降低至少6个指数点。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的BDI降低至少6.5个指数点。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的BDI降低至少7个指数点。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的BDI降低至少7.5个指数点。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的BDI降低至少8个指数点。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的BDI降低至少8.5个指数点。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的BDI降低至少9个指数点。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的BDI降低至少9.5个指数点。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的BDI降低至少3个指数点。在一些实施方案中,所述方法涉及将患有心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的患者的BDI降低10个指数点。

[0846] 心脏成像

[0847] 超声心动图

[0848] 如本文所用的术语“超声心动图显像”是指二维/三维超声心动图显像、脉冲波和连续波多普勒、彩色血流多普勒、组织多普勒成像(TDI)心脏超声造影术、变形成像(应变和应变率)以及经胸超声心动图显像(TTE)。TTE通常是用于评估左心室和右心室二者的心肌收缩和舒张功能的精选方法。在一些实施方案中,使用超声心动图显像评估患者的心力衰竭。在一些实施方案中,使用二维超声心动图显像评估患者的心力衰竭。在一些实施方案中,使用三维超声心动图显像评估患者的心力衰竭。在一些实施方案中,使用脉冲波和连续波多普勒超声心动图显像评估患者的心力衰竭。在一些实施方案中,使用超声心动图显像评估患者的心力衰竭。在一些实施方案中,使用彩色血流多普勒超声心动图显像评估患者的心力衰竭。在一些实施方案中,使用组织多普勒成像(TDI)心脏超声造影术评估患者的心力衰竭。在一些实施方案中,使用变形成像(应变和应变率)超声心动图显像评估患者的心力衰竭。在一些实施方案中,使用经胸超声心动图显像(TTE)评估患者的心力衰竭。

[0849] 异常心电图(ECG)增加HF诊断的可能性,但是特异性较低。ECG上的一些异常提供关于病因(例如,心肌梗死)的信息,并且在ECG上的发现可能提供疗法(例如,用于AF的抗凝作用、用于心动过缓的起搏等)的指征。HF在呈现有完全正常的ECG的患者中是不太可能的(灵敏度89%)。因此,ECG的常规用途主要推荐用于排除HF。超声心动图显像是有用的且广泛可用的测试,用于在怀疑患有HF的患者中确立诊断。其提供关于LV结构和收缩功能(例如,在乳头肌水平上在胸骨旁短轴观中通过M模式测量)的信息,包括但不限于LV壁厚度

(LVWT)、LV质量(LVM)、LV舒张末径(LVEDD)、LV收缩末径(LVESD)、缩短分数(FS)(使用等式FS＝100％×[(EDD-ESD)/EDD]来计算)、LV舒张末期容积(LVEDV)、LV收缩末期容积(LVESV)、射血分数(使用等式EF＝100％×[(EDV-ESV)/EDV]来计算)、肥大指数(计算为LVM与LVESV的比率)以及相对壁厚度(计算为LVWT与LVESD的比率)。该信息在确立诊断和确定适当治疗方面具有决定性。在一些实施方案中,患者的LV壁厚度(LVWT)是使用超声心动图显像来测量。在一些实施方案中,患者的LV质量(LVM)是使用超声心动图显像来测量。在一些实施方案中,患者的LV舒张末径(LVEDD)是使用超声心动图显像来测量。在一些实施方案中,患者的LV收缩末径(LVESD)是使用超声心动图显像来测量。在一些实施方案中,患者的缩短分数(FS)是使用超声心动图显像来测量。在一些实施方案中,患者的LV舒张末期容积(LVEDV)是使用超声心动图显像来测量。在一些实施方案中,患者的LV收缩末期容积(LVESV)是使用超声心动图显像来测量。在一些实施方案中,患者的射血分数是使用超声心动图显像来测量。在一些实施方案中,患者的肥大指数是使用超声心动图显像来测量。在一些实施方案中,患者的相对壁厚度是使用超声心动图显像来测量。存在可能指示心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的多种临床表现因素、超声心动图显像特征以及其他特征。在一些实施方案中,对患者进行的超声心动图显示结构性左心异常。在一些实施方案中,所述结构性左心异常是左心瓣膜疾病。在一些实施方案中,所述结构性左心异常是左心房扩大(例如,>4.2cm)。在一些实施方案中,对患者进行的心电图显示左心室肥大(LVH)和/或左心房肥大/扩张(LAH)。在一些实施方案中,对患者进行的心电图显示心房扑动/心房颤动(AF/Afib)。在一些实施方案中,对患者进行的心电图显示左束支传导阻滞(LBBB)。在一些实施方案中,对患者进行的心电图显示Q波的存在。参见例如,Galie N.等人Euro Heart J.(2016)37,67-119。

[0850] 在具有左心衰竭的症状的患者中,可以进行超声心动图来评价各种参数。例如,在一些实施方案中,对患者进行的使用多普勒的超声心动图可能显示增加的充盈压和/或舒张功能障碍的指标(例如,增加的E/E'或>2-3型二尖瓣血流异常)。在一些实施方案中,对患者进行的成像(例如超声心动图、CT扫描、胸部X线检查或MRI)显示柯雷B线。在一些实施方案中,对患者进行的成像(例如超声心动图、CT扫描、胸部X线检查或MRI)显示胸腔积液。在一些实施方案中,对患者进行的成像(例如超声心动图、CT扫描、胸部X线检查或MRI)显示肺水肿。在一些实施方案中,对患者进行的成像(例如,超声心动图、CT扫描、胸部X线检查或MRI)显示左心房扩大。同上。

[0851] HFpEF/HFmrEF心力衰竭中的关键结构改变包括左心房容积指数(LAVI)>34mL/m2和/或左心室质量指数(LVMI)对于男性≥115g/m2且对于女性≥95g/m2。

[0852] HFpEF/HFmEF心力衰竭的关键功能改变包括E/e'≥13和平均e'间隔壁和侧壁<9cm/s。其他(间接)超声心动图显像来源的测量是纵向应变或三尖瓣反流速度(TRV)。

[0853] 超声心动图显像检查还可以包括对右心室(RV)结构和功能的评估,包括但不限于RV和右心房(RA)尺寸,以及对RV收缩功能和/或肺动脉压的估计。在反映RV收缩功能的参数中,以下量度特别重要:三尖瓣环平面收缩期偏移(TAPSE;异常TAPSE<17mm指示RV收缩功能障碍)和组织多普勒来源的三尖瓣外侧环收缩速度(s')(s'速度<9.5cm/s指示RV收缩功能障碍)。肺动脉收缩压是从最大三尖瓣反流射流的最佳记录和三尖瓣收缩梯度,以及基于下腔静脉(IVC)大小及其呼吸相关萎陷对RA压力的估计推导出的。运动或药理学负荷超声心

动图显像可以用于评估诱导性缺血和/或心肌活力，并且可以用于患有瓣膜病(例如动态二尖瓣反流、低流量低梯度主动脉瓣狭窄)的患者的一些临床场景中。还有人提出，负荷超声心动图显像可以允许检测具有劳力性呼吸困难、保留的LVEF以及不确定的静息舒张参数的患者中与运动暴露相关的舒张功能障碍。

[0854] 推荐经胸超声心动图显像(TTE)用于评估怀疑患有HF的患者的心肌结构和功能，以确立HFrEF、HFmrEF或HFpEF的诊断。此外，推荐TTE用于评估LVEF以鉴定患有HF的患者，所述患者将适合于推荐用于HFrEF的循证药理学和装置(ICD、CRT)治疗；用于评估具有HFrEF、HFmrEF或HFpEF的已确立诊断的患者的瓣膜病、右心室功能和肺动脉压，以鉴定适合于矫正瓣膜病的那些；和/或用于评估要暴露于可能潜在地损伤心肌的治疗(例如化学疗法)的患者的心肌结构和功能。在具有患上HF的风险的患者中，在TTE方案中应考虑其他技术(包括收缩组织多普勒速度和变形指数(即应变和应变率))，以在临床前阶段鉴定心肌功能障碍。

[0855] 心脏磁共振(CMR)

[0856] CMR被公认为用于测量左心室和右心室二者的容积、质量和EF的金标准。它是用于具有非诊断超声心动图显像研究的患者的最佳替代性心脏成像模态(特别对于右心成像)，并且是用于患有复杂先天性心脏病的患者的精选方法。心脏磁共振(CMR)测量心脏解剖学和功能定量二者，具有独特的非侵入式组织表征能力，很好地补充超声心动图显像。在短轴上从心尖至心底覆盖LV的CMR成像用于测量左心室(LV)容积、射血分数(EF)和局部功能。3D数据集不受几何假设的影响，因此与二维(2D)超声心动图显像相比不易出错，特别是在重塑的心室中。新型CMR组织表征技术被称为CMR弛豫测量术(T1和T2映射和细胞外体积分数(ECV))，其允许更详细的且定量的方法用于组织表征；以及4D血流，其提供关于腔内流量的定量信息。当前应用似乎特别可用于舒张功能障碍检测，但是应将它们与传统多普勒和组织多普勒(例如，超声心动图显像)分析进行特定比较，以确认在临床实践中的应用性。可以考虑将非侵入式负荷显像(CMR、负荷超声心动图显像、SPECT、PET)用于在关于血运重建作出决定之前评估患有HF和CAD的患者(被认为适合于冠脉血运重建)的心肌缺血和活力。在一些实施方案中，使用CMR评估患者的心力衰竭。在一些实施方案中，使用CMR弛豫测量术(T1和T2映射和细胞外体积分数(ECV))评估患者的心力衰竭。在一些实施方案中，使用CMR和4D血流评估患者的心力衰竭。

[0857] CMR可以提供关于LV结构和收缩功能的信息，包括但不限于LV壁厚度(LVWT)、LV质量(LVM)、LV舒张末径(LVEDD)、LV收缩末径(LVESD)、缩短分数(FS)(使用等式FS＝100％×[(EDD-ESD)/EDD]来计算)、LV舒张末期容积(LVEDV)、LV收缩末期容积(LVESV)、射血分数(使用等式EF＝100％×[(EDV-ESV)/EDV]来计算)、肥大指数(计算为LVM与LVESV的比率)以及相对壁厚度(计算为LVWT与LVESD的比率)。该信息在确立诊断和确定适当治疗方面具有决定性。在一些实施方案中，患者的LV壁厚度(LVWT)是使用CMR来测量。在一些实施方案中，患者的LV质量(LVM)是使用CMR来测量。在一些实施方案中，患者的LV舒张末径(LVEDD)是使用CMR来测量。在一些实施方案中，患者的LV收缩末径(LVESD)是使用CMR来测量。在一些实施方案中，患者的缩短分数(FS)是使用CMR来测量。在一些实施方案中，患者的LV舒张末期容积(LVEDV)是使用CMR来测量。在一些实施方案中，患者的LV收缩末期容积(LVESV)是使用CMR来测量。在一些实施方案中，患者的射血分数是使用CMR来测量。在一些实施方案中，患者的肥大指数是使用CMR来测量。在一些实施方案中，患者的相对壁厚度是使用CMR来测量。

[0858] CMR是使用心肌延迟强化(LGE)以及T1映射来评估心肌纤维化的优选成像方法,并且可以用于确立HF病因。例如,具有LGE的CMR允许区分HF的缺血性与非缺血性起源,并且可以将心肌纤维化/瘢痕可视化。另外,CMR允许表征心肌炎、淀粉样变性、结节病、美洲锥虫病、法布里病致密化不全性心肌病和血色素沉着病的心肌组织。CMR还可以用于评估患有HF和冠心病(CAD)的患者(被认为适合于冠脉血运重建)的心肌缺血和活力。在一些实施方案中,使用具有心肌延迟强化(LGE)和/或T1映射的CMR评估患者的心力衰竭。在一些实施方案中,患者心脏中的纤维化和/或瘢痕是使用CMR来测量。

[0859] CMR的临床限制包括当地专家知识、与超声心动图显像相比的较低可用性和较高成本、关于在具有金属植入物(包括心脏设备)的患者中的安全性的不确定性以及在患有心动过速的患者中不太可靠的测量。幽闭恐惧症是CMR的重要限制。线性钆对比剂禁用于肾小球滤过率(GFR)<30mL/min/1.73m^{2}的患者中,因为它们可能触发肾源性全身纤维化(这在使用更新型环状钆对比剂时可能不用太关注)。

[0860] CMR推荐用于评估具有较差声窗的患者和患有复杂先天性心脏病的患者的心肌结构和功能(包括右心)(考虑CMR的注意事项/禁忌证)。在患有扩张型心肌病的患者中应考虑具有LGE的CMR,以模棱两可的临床数据和其他成像数据的情形中区分缺血性与非缺血性心肌损伤(考虑CMR的注意事项/禁忌证)。CMR推荐用于在怀疑心肌炎、淀粉样变性、结节病、美洲锥虫病、法布里病致密化不全性心肌病和血色素沉着病的情形中表征心肌组织(考虑CMR的注意事项/禁忌证)。

[0861] 多闸门式造影(MUGA)

[0862] 放射性核素血管造影术是核医学领域,其专攻成像以显示心脏的右心室和左心室的功能性,从而允许心力衰竭的知情诊断干预。其涉及使用注射至患者体内的放射性药物以及用于采集的γ照相机。MUGA扫描(多闸门式造影)涉及在心动周期的不同点触发(门控)的采集。MUGA扫描有时也被称为平衡放射性核素心血管造影术、放射性核素心室造影术(RNVG)或门控血池显像,以及SYMA扫描(同步化多闸门式造影扫描)。在一些实施方案中,使用MUGA评估患者的心力衰竭。在一些实施方案中,使用平衡放射性核素心血管造影术评估患者的心力衰竭。在一些实施方案中,使用放射性核素心室造影术(RNVG)评估患者的心力衰竭。在一些实施方案中,使用门控血池显像评估患者的心力衰竭。).在一些实施方案中,使用SYMA扫描(同步化多闸门式造影扫描)评估患者的心力衰竭。

[0863] MUGA独特地提供心脏跳动的电影型影像(例如,能够显示整个心动周期期间的心脏运动的短片),并且允许解释者确定心脏瓣膜和心室的效率。MUGA/电影扫描代表对超声心动图的稳健辅助。关于心排血量(Q)的采集的数学由这两种方法以及支持射血分数作为心缩期心脏/心肌产物的其他便宜模型良好地提供。MUGA扫描优于超声心动图或血管造影片的一个主要优点是其准确性。超声心动图测量心室的缩短分数并且受限于使用者的能力。此外,血管造影片是侵入式的并且通常更昂贵。MUGA扫描提供心脏射血分数的更准确的表示。

[0864] 胸部X线检查

[0865] 胸部X线检查在怀疑患有HF的患者的诊断检查中的用途有限。其最多地用于鉴定对患者的症状和体征的替代性肺性解释(例如,肺部恶性病和/或间质性肺病),但是胸部计算机断层成像(CT)目前是这些类型的肺病的护理标准。对于哮喘或慢性阻塞性肺病(COPD)

的诊断，需要使用肺量计法进行肺功能测试。然而，胸部X线检查可以显示患有HF的患者的肺静脉充血或水肿，并且在急性环境中比在非急性环境中更有帮助。在一些实施方案中，使用胸部X线检查评估患者的心力衰竭。

[0866] 单光子发射计算机体层摄影(SPECT)和放射性核苷酸心室造影

[0867] 单光子发射型CT(SPECT)可以用于评估缺血和心肌活力。门控SPECT也可以产生关于心室容积和功能的信息，但是使患者暴露于电离辐射。3,3-二膦酰基-1,2-丙烷二甲酸(DPD)闪烁成像可以用于检测甲状腺素转运蛋白心脏淀粉样变性。在一些实施方案中，使用SPECT评估患者的心力衰竭。

[0868] 正电子发射体层摄影(PET)

[0869] 正电子发射体层摄影(PET)(单独的或与CT一起)可以用于评估缺血和活力，但是流量示踪剂(N-13氨或O-15水)需要现场的回旋加速器。铷是使用PET的缺血测试的替代性示踪剂，其可以在当地以相对低的成本产生。可用性有限、辐射暴露和成本是主要限制。在一些实施方案中，使用PET评估患者的心力衰竭。

[0870] 冠状动脉造影

[0871] 冠状动脉造影推荐用于患有医学疗法难治的心绞痛的患有HF的患者，条件是所述患者原本适于冠脉血运重建。冠状动脉造影还推荐用于具有症状性室性心律失常或心脏停搏中止的病史的患者。在患有HF且具有冠心病(CAD)的中至高验前概率以及非侵入式应激试验中缺血的存在的患者中应考虑冠状动脉造影，以确立缺血性病因和CAD严重性。在一些实施方案中，使用冠状动脉造影评估患者的心力衰竭。

[0872] 侵入式冠状动脉造影推荐用于患有HF和药理学疗法难治的心绞痛或症状性室性心律失常或心脏停搏中止的患者(其被认为适于潜在的冠脉血运重建)，以确立CAD的诊断及其严重性。在患有HF且具有CAD的中至高验前概率以及非侵入式应激试验中缺血的存在的患者(其被认为适于潜在的冠脉血运重建)中应考虑侵入式冠状动脉造影，以确立CAD的诊断及其严重性。

[0873] 心脏计算机断层扫描术(CT)

[0874] 心脏CT在患有HF的患者中的主要用途是在不存在相对禁忌证的情况下，作为非侵入式手段使具有冠心病(CAD)的低至中验前概率的患有HF的患者或者具有模棱两可的非侵入式应激试验的那些患者的冠状动脉解剖结构可视化，以排除CAD的诊断。然而，所述测试仅在其结果可能影响治疗决定时才被需要。可以在患有HF且具有CAD的低至中验前概率的患者或者具有模棱两可的非侵入式应激试验的那些患者中考虑心脏CT，以排除冠状动脉狭窄。在一些实施方案中，使用心脏计算机断层扫描术评估患者的心力衰竭。

[0875] 测量患者的血液学参数

[0876] 在某些实施方案中，本公开文本提供通过测量患者的一个或多个血液学参数来管理所述患者的方法，所述患者已经用本公开文本的一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂(例如，ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)治疗或者是要用其治疗的候选者。所述血液学参数可以用于评价用于作为要用本公开文本的一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂治疗的候选者的患者的适当给药，监测治疗期间的所述血液学参数，评价在用本公开文本的一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂治疗期间是否要调整剂量，和/或评价本公开文本的一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂

的适当维持剂量。如果一个或多个血液学参数超出正常水平，则可以减少、延迟或终止用一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂给药。

[0877] 可以根据本文所提供的方法测量的血液学参数包括例如红细胞水平、血压、铁储备和使用本领域公认的方法在体液中发现的与增加的红细胞水平相关的其他因素。可以使用来自患者的血液样品来确定此类参数。红细胞水平、血红蛋白水平和/或血细胞比容水平的增加可能导致血压升高。

[0878] 在一个实施方案中，如果作为要用一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂治疗的候选者的患者的一个或多个血液学参数超出正常范围或者在正常范围的高侧，则可以延迟本公开文本的一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂的施用的开始，直至所述血液学参数已经自然地或通过治疗干预恢复到正常的或可接受的水平。例如，如果候选患者是高血压或高血压前期，则可以用降血压剂治疗患者以降低患者的血压。可以使用适合于个体患者病症的任何降血压剂，包括例如利尿剂、肾上腺素能抑制剂(包括α阻滞剂和β阻滞剂)、血管舒张剂、钙通道阻滞剂、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂或血管紧张素II受体阻滞剂。可替代地，可以使用饮食和锻炼方案来治疗血压。类似地，如果候选患者的铁储备低于正常范围或在正常范围的低侧，则可以用适当的饮食和/或铁补充剂方案治疗患者，直到患者的铁储备回到正常水平或可接受的水平。对于具有高于正常的红细胞水平和/或血红蛋白水平的患者，则可以延迟本公开文本的一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂的施用，直至所述水平已经恢复到正常的或可接受的水平。

[0879] 在某些实施方案中，如果作为要用一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂治疗的候选者的患者的一个或多个血液学参数超出正常范围或者在正常范围的高侧，则可以不延迟施用的开始。然而，可以将本公开文本的一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂的给药的剂量或频率设定为会降低在施用本公开文本的一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂时出现血液学参数的不可接受的增加的风险的量。可替代地，可以针对所述患者开发治疗方案，所述治疗方案组合一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂与解决血液学参数的不期望的水平的治疗剂。例如，如果患者的血压升高，则可以将治疗方案设计为包括施用一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂和降血压剂。对于具有低于期望的铁储备的患者，可以开发治疗方案，所述治疗方案包括本公开文本的一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂和铁补充。

[0880] 在一个实施方案中，可以确立作为要用本公开文本的一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂治疗的候选者的患者的一个或多个血液学参数的一个或多个基线参数，并且基于一个或多个基线值确立用于该患者的适当给药方案。可替代地，基于患者的病史确立的基线参数可以用于通知用于患者的适当ActRII-ALK4拮抗剂给药方案。例如，如果健康患者的确立的基线血压读数高于限定的正常范围，则可能不需要使所述患者的血压进入一般群体在用本公开文本的一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂治疗之前被认为正常的范围内。患者的一个或多个血液学参数在用本公开文本的一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂治疗之前的基线值也可以用作相关比较值，用于监测在用本公开文本的一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂治疗期间所述血液学参数的任何变化。

[0881] 在某些实施方案中，一个或多个血液学参数是在正在用一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂治疗的患者中测量的。所述血液学参数可以用于在治疗期间监测患者，并且允许调整或终止使用本公开文本的一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂的给药或使用另一种治疗剂的

另外的给药。例如,如果一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂的施用导致血压、红细胞水平或血红蛋白水平增加或者铁储备减少,则可以降低本公开文本的一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂的剂量的量或频率,以减小本公开文本的一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂对一个或多个血液学参数的影响。如果一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂的施用导致对患者不利的一个或多个血液学参数的变化,则可以将本公开文本的一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂的给药暂时终止,直至一个或多个血液学参数恢复到可接受的水平,或者永久终止。类似地,如果在降低本公开文本的一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂的剂量或频率后未使一个或多个血液学参数在可接受的范围内,则可以终止所述给药。作为替代方案,或者除了减少或终止使用本公开文本的一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂的给药外,可以用另外的治疗剂对患者进行给药,所述另外的治疗剂解决一个或多个血液学参数的不期望的水平,如例如降血压剂或铁补充剂。例如,如果正在用一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂治疗的患者的血压升高,则使用本公开文本的一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂的给药可以以相同水平继续进行,并且将降血压剂添加至治疗方案;可以降低使用本公开文本的一种或多种拮抗剂的给药(例如,降低量和/或频率)并且将降血压剂添加至治疗方案;或者可以终止使用本公开文本的一种或多种拮抗剂的给药,并且可以用降血压剂治疗所述患者。

[0882] 8.用于心力衰竭的另外的治疗和共疗法

[0883] 在某些方面,本公开文本考虑ActRII-ALK4拮抗剂与一种或多种另外的活性剂或其他支持疗法组合用于治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的用途。如本文所用,“与……组合(in combination with)”、“……的组合”、“与……组合(combined with)”或“联合”施用是指任何形式的施用,使得另外的活性剂或支持疗法(例如,第二、第三、第四等)在体内仍然有效(例如,多种化合物在患者体内同时有效,持续一定时间段,其可以包括这些化合物的协同效应)。有效性可能与药剂在血液、血清或血浆中的可测量浓度无关。例如,不同的治疗化合物可以在同一配制品中或在单独配制品中,并行地或依序地,按不同时间表来施用。因此,接受这样的治疗的受试者可以受益于不同活性剂或疗法的组合作用。本公开文本的一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂可以与一种或多种其他另外的药剂或支持疗法(如本文所公开的那些)并行施用,在其之前或之后施用。通常,每种活性剂或疗法将以针对该特定药剂确定的剂量和/或时间表来施用。用于方案中的特定组合将考虑本公开文本的ActRII-ALK4拮抗剂与另外的活性剂或疗法的相容性和/或期望的作用。

[0884] 在患有HF的患者中的一些治疗目标是改进他们的临床状态、功能能力和生活质量,和/或防止入院和降低死亡率。已经显示神经-激素拮抗剂(例如,ACEI、MRA和β-阻断剂)可改进患有HFrEF的患者的存活,并且已被推荐用于治疗患有HFrEF的患者,除非禁用或者不耐受。在某些方面,本公开文本涉及治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低所述心力衰竭的进展率和/或严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂),其中还向所述患者施用以下中的一种或多种:血管紧张素转换酶抑制剂(ACE抑制剂)、β-阻断剂、血管紧张素II受体阻断剂(ARB)、盐皮质激素/醛固酮受体拮抗剂(MRA)或植入型心律转复除颤器(ICD)。在一些实施方案中,所述方法涉及将

ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)施用至有需要的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及将ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和β-阻断剂施用至有需要的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及将ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和血管紧张素II受体阻断剂(ARB)施用至有需要的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及将ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和盐皮质激素/醛固酮受体拮抗剂(MRA)施用至有需要的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及将ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和植入型心律转复除颤器(ICD)施用至有需要的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及将ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和血管紧张素受体肾胰岛素残基溶酶抑制剂(ARNI)施用至有需要的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及将ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)和利尿剂施用至有需要的患者。在一些实施方案中,所述方法涉及将ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)以及肼屈嗪和硝酸异山梨酯、地高辛、洋地黄、N-3多不饱和脂肪酸(PUFA)和I_f通道抑制剂(例如,伊伐布雷定)中的一种或多种施用至有需要的患者。

[0885] 任选地,本文公开的用于治疗、预防心力衰竭或降低心力衰竭的进展率和/或严重性,特别是治疗、预防心力衰竭的一种或多种共病或降低所述一种或多种共病的进展率和/或严重性的方法还可以包括向患者施用一种或多种支持疗法或用于治疗心力衰竭的另外的活性剂。例如,还可以向患者施用选自以下的一种或多种支持疗法或活性剂:ACE抑制剂(例如,苯扎普利、卡托普利、依那普利、赖诺普利、培哚普利、雷米普利(例如,雷米平)、群多普利和佐芬普利);β阻断剂(例如,醋丁洛尔、阿替洛尔、倍他洛尔、比索洛尔、卡替洛尔、卡维地洛、拉贝洛尔、美托洛尔、纳多洛尔、奈必洛尔、喷布洛尔、吲哚洛尔、普萘洛尔、索他洛尔和噻吗洛尔);ARB(例如,氯沙坦、厄贝沙坦、奥美沙坦、坎地沙坦、缬沙坦、非马沙坦、阿齐沙坦、沙普利沙坦和替米沙坦);盐皮质激素/醛固酮受体拮抗剂(MRA)(例如,孕酮、依普利酮和螺内酯);糖皮质激素(例如,倍氯米松、倍他米松、布地奈德、可的松、地夫可特、地塞米松、氢化可的松、甲泼尼龙、泼尼松龙、甲基泼尼松、泼尼松、曲安西龙和非奈利酮);他汀(例如,阿托伐他汀(Lipitor)、氟伐他汀(Lescol)、洛伐他汀(Mevacor、Altocor)、普伐他汀(Pravachol)、匹伐他汀(Livalo)、斯伐他汀(Zocor)和瑞舒伐他汀(Crestor));钠-葡萄糖协同转运蛋白2(SGLT2)抑制剂(例如,卡格列净、达格列净(例如,Farxiga)和恩格列净);植入型心律转复除颤器(ICD);血管紧张素受体肾胰岛素残基溶酶抑制剂(ARNI)(例如,缬沙坦和沙库必曲(肾胰岛素残基溶酶抑制剂));利尿剂(例如,呋塞米、布美他尼、托拉塞米、苄氟噻嗪、氢氯噻嗪、美托拉宗、吲达帕胺、螺内酯/依普利酮、阿米洛利和氨苯蝶啶);以及其

他疗法,包括肼屈嗪和硝酸异山梨酯、地高辛、洋地黄、N-3多不饱和脂肪酸(PUFA)和I_f通道抑制剂(例如,伊伐布雷定)。

[0886] 血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂

[0887] ACE抑制剂推荐用于具有无症状LV收缩功能障碍和心肌梗死史的患者中,以预防HF或延迟HF的发作并延长寿命,或者用于患有无症状LV收缩功能障碍且没有心肌梗死史的患者中,以预防HF或延迟HF发作。在患有稳定CAD的患者中应考虑ACE抑制剂,即使他们未患LV收缩功能障碍,以预防HF或延迟HF发作。已经显示ACE抑制剂降低患有HFrEF的患者的死亡率和发病率,并且被推荐用于所有症状性患者中,除非禁用或不耐受。

[0888] 在一些实施方案中,本公开文本涉及一种通过施用ACE抑制剂来治疗患有心力衰竭的患者的方法。在一些实施方案中,ACE抑制剂选自苯扎普利、卡托普利、依那普利、赖诺普利、培哚普利、雷米普利(例如,雷米平)、群多普利和佐芬普利。在一些实施方案中,向患者施用苯扎普利。在一些实施方案中,向患者施用卡托普利。在一些实施方案中,向患者施用依那普利。在一些实施方案中,向患者施用赖诺普利。在一些实施方案中,向患者施用培哚普利。在一些实施方案中,向患者施用雷米普利。在一些实施方案中,向患者施用群多普利。在一些实施方案中,向患者施用佐芬普利。在一些实施方案中,ACE抑制剂的施用。

[0889] 在一些实施方案中,ACE抑制剂的施用延迟患者的心力衰竭发作。在一些实施方案中,ACE抑制剂的施用预防患者的心力衰竭发作。在一些实施方案中,ACE抑制剂的施用延长患者寿命。在一些实施方案中,ACE抑制剂的施用缩短患者的住院期长度。在一些实施方案中,ACE抑制剂的施用防止患者住院。

[0890] β阻断剂

[0891] β-阻断剂推荐用于具有无症状LV收缩功能障碍和心肌梗死史的患者中,以预防HF或延迟HF发作或延长寿命。β-阻断剂可以降低患有HFrEF的症状性患者的死亡率和发病率,尽管用ACEI和在大多数情形中利尿剂治疗,但是尚未在充血的或代偿失调的患者中进行测试。存在如下共识:β-阻断剂与ACEI互补,并且可以在作出HFrEF的诊断后立即一起开始。

[0892] 在一些实施方案中,本公开文本涉及一种通过施用一种或多种β阻断剂治疗患有心力衰竭的患者的方法。在一些实施方案中,所述一种或多种β阻断剂选自:醋丁洛尔、阿替洛尔、倍他洛尔、比索洛尔、卡替洛尔、卡维地洛、拉贝洛尔、美托洛尔、纳多洛尔、奈必洛尔、喷布洛尔、吲哚洛尔、普萘洛尔、索他洛尔和噻吗洛尔。在一些实施方案中,向患者施用醋丁洛尔。在一些实施方案中,向患者施用阿替洛尔。在一些实施方案中,向患者施用倍他洛尔。在一些实施方案中,向患者施用比索洛尔。在一些实施方案中,向患者施用卡替洛尔。在一些实施方案中,向患者施用卡维地洛。在一些实施方案中,向患者施用拉贝洛尔。在一些实施方案中,向患者施用美托洛尔。在一些实施方案中,向患者施用纳多洛尔。在一些实施方案中,向患者施用奈必洛尔。在一些实施方案中,向患者施用喷布洛尔。在一些实施方案中,向患者施用吲哚洛尔。在一些实施方案中,向患者施用普萘洛尔。在一些实施方案中,向患者施用索他洛尔。在一些实施方案中,向患者施用噻吗洛尔。

[0893] 在一些实施方案中,在患者显示心力衰竭的体征时,向患者施用β阻断剂。在一些实施方案中,在患者不耐受ACE抑制剂时,向患者施用β阻断剂。在一些实施方案中,β阻断剂延迟患者的心力衰竭发作。在一些实施方案中,β阻断剂预防患者的心力衰竭发作。在一些实施方案中,β阻断剂的施用延长患者寿命。在一些实施方案中,β阻断剂的施用缩短患者的

住院期长度。在一些实施方案中,β阻断剂的施用防止患者住院。

[0894] 血管紧张素II受体阻断剂(ARB)

[0895] 血管紧张素II受体阻断剂(ARB)是用于可能不耐受ACE抑制剂的患者的替代方案。已经显示坎地沙坦降低心血管死亡率。缬沙坦已经显示在接受背景ACEI的患有HFrEF的患者中对因HF而住院(但并非对全因住院)的作用。

[0896] 在一些实施方案中,本公开文本涉及一种通过施用一种或多种ARB治疗患有心力衰竭的患者的方法。在一些实施方案中,所述一种或多种ARB选自:氯沙坦、厄贝沙坦、奥美沙坦、坎地沙坦、缬沙坦、非马沙坦、阿齐沙坦、沙普利沙坦和替米沙坦。在一些实施方案中,向患者施用氯沙坦。在一些实施方案中,向患者施用厄贝沙坦。在一些实施方案中,向患者施用奥美沙坦。在一些实施方案中,向患者施用坎地沙坦。在一些实施方案中,向患者施用缬沙坦。在一些实施方案中,向患者施用非马沙坦。在一些实施方案中,向患者施用阿齐沙坦。在一些实施方案中,向患者施用沙普利沙坦。在一些实施方案中,向患者施用替米沙坦。

[0897] 在一些实施方案中,在患者显示心力衰竭的体征时,向患者施用血管紧张素拮抗剂(例如,血管紧张素受体阻断剂,ARB)。在一些实施方案中,在患者不耐受ACE抑制剂时,向患者施用ARB。在一些实施方案中,ARB延迟患者的心力衰竭发作。在一些实施方案中,ARB预防患者的心力衰竭发作。在一些实施方案中,ARB的施用延长患者寿命。在一些实施方案中,ARB的施用缩短患者的住院期长度。在一些实施方案中,ARB的施用防止患者住院。

[0898] 皮质类固醇

[0899] 盐皮质激素/醛固酮受体拮抗剂(MRA)阻断结合醛固酮的受体,并且以不同亲和力程度阻断其他类固醇激素受体(例如皮质类固醇、雄激素)。螺内酯或依普利酮推荐用于患有HFrEF且LVEF≤35%的症状性心力衰竭患者中(尽管用ACE抑制剂和/或β-阻断剂治疗),以降低死亡率和HF住院。

[0900] 在一些实施方案中,本公开文本涉及一种通过施用皮质类固醇治疗患有心力衰竭的患者的方法。在一些实施方案中,向所述患者施用盐皮质激素/醛固酮受体拮抗剂(MRA)。在一些实施方案中,向所述患者施用糖皮质激素。在一些实施方案中,向患者施用选自以下的一种或多种盐皮质激素/醛固酮受体拮抗剂(MRA):孕酮、依普利酮和螺内酯。在一些实施方案中,向患者施用依普利酮。在一些实施方案中,向患者施用螺内酯。

[0901] 在一些实施方案中,在患者显示心力衰竭的体征时,向患者施用MRA。在一些实施方案中,MRA延迟患者的心力衰竭发作。在一些实施方案中,MRA预防患者的心力衰竭发作。在一些实施方案中,MRA的施用延长患者寿命。在一些实施方案中,MRA的施用缩短患者的住院期长度。在一些实施方案中,MRA的施用防止患者住院。

[0902] 在一些实施方案中,向患有心力衰竭的患者施用一种或多种糖皮质激素。在一些实施方案中,糖皮质激素的施用是初始疗法。在一些实施方案中,糖皮质激素选自倍氯米松、倍他米松、布地奈德、可的松、地夫可特、地塞米松、氢化可的松、甲泼尼龙、泼尼松龙、甲基泼尼松、泼尼松、曲安西龙和非奈利酮。在一些实施方案中,向患有心力衰竭的患者施用泼尼松。在一些实施方案中,向患有心力衰竭的患者施用泼尼松龙。在一些实施方案中,向患有心力衰竭的患者施用非奈利酮。在一些实施方案中,向患有心力衰竭的患者施用地夫可特。

[0903] 在一些实施方案中,在患者显示心力衰竭的体征时,向患者施用糖皮质激素。在一

些实施方案中,糖皮质激素延迟患者的心力衰竭发作。在一些实施方案中,糖皮质激素预防患者的心力衰竭发作。在一些实施方案中,糖皮质激素的施用延长患者寿命。在一些实施方案中,糖皮质激素的施用缩短患者的住院期长度。在一些实施方案中,糖皮质激素的施用防止患者住院。

[0904] 他汀

[0905] 使用他汀的治疗推荐用于患有CAD或具有CAD的高风险的患者中,不论他们是否患有LV收缩功能障碍,以预防HF或延迟HF发作并延长寿命。

[0906] 在一些实施方案中,本公开文本涉及一种通过施用一种或多种他汀治疗患有心力衰竭的患者的方法。在一些实施方案中,所述一种或多种他汀选自:阿托伐他汀(Lipitor)、氟伐他汀(Lescol)、洛伐他汀(Mevacor、Altocor)、普伐他汀(Pravachol)、匹伐他汀(Livalo)、斯伐他汀(Zocor)和瑞舒伐他汀(Crestor)。在一些实施方案中,向患者施用阿托伐他汀。在一些实施方案中,向患者施用氟伐他汀。在一些实施方案中,向患者施用洛伐他汀。在一些实施方案中,向患者施用普伐他汀。在一些实施方案中,向患者施用匹伐他汀。在一些实施方案中,向患者施用斯伐他汀。在一些实施方案中,向患者施用瑞舒伐他汀。

[0907] 在一些实施方案中,在患者显示心力衰竭的体征时,向患者施用他汀。在一些实施方案中,在患者具有冠心病(CAD)的高风险时,向患者施用他汀。在一些实施方案中,在患者患有冠心病(CAD)时,向患者施用他汀。在一些实施方案中,他汀延迟患者的心力衰竭发作。在一些实施方案中,他汀预防患者的心力衰竭发作。在一些实施方案中,他汀的施用延长患者寿命。在一些实施方案中,他汀的施用缩短患者的住院期长度。在一些实施方案中,他汀的施用防止患者住院。

[0908] 钠-葡萄糖协同转运蛋白2(SGLT2)抑制剂

[0909] 钠-葡萄糖协同转运蛋白2(SGLT2)抑制剂通常与膳食和运动一起施用,以降低患有2型糖尿病的成人的血糖。SGLT2抑制剂通过使肾经尿液从身体去除糖来降低血糖。使用SGCT2抑制剂的治疗推荐用于患有射血分数降低的心力衰竭(HFrEF)的患者中,以降低因心力衰竭而心血管死亡和住院的风险。

[0910] 在一些实施方案中,本公开文本涉及一种通过施用一种或多种SGLT2抑制剂治疗患有心力衰竭的患者的方法。在一些实施方案中,SGLT2抑制剂是格列净。在一些实施方案中,向患者施用选自以下的一种或多种SGLT2抑制剂:卡格列净、达格列净(例如,Farxiga)和恩格列净。在一些实施方案中,向患者施用卡格列净。在一些实施方案中,向患者施用达格列净(例如,Farxiga)。在一些实施方案中,向患者施用恩格列净。

[0911] 在一些实施方案中,在患者显示心力衰竭的体征时,向患者施用SGLT2抑制剂。在一些实施方案中,在患者未患2型糖尿病时,向患者施用SGLT2抑制剂。在一些实施方案中,在患者患有2型糖尿病时,向患者施用SGLT2抑制剂。在一些实施方案中,SGLT2抑制剂延迟患者的心力衰竭发作。在一些实施方案中,SGLT2抑制剂预防患者的心力衰竭发作。在一些实施方案中,SGLT2抑制剂的施用延长患者寿命。在一些实施方案中,SGLT2抑制剂的施用缩短患者的住院期长度。在一些实施方案中,SGLT2抑制剂的施用防止患者住院。在一些实施方案中,SGLT2抑制剂降低患者的死亡风险。

[0912] 植入型心律转复除颤器(ICD)

[0913] 植入型心律转复除颤器(ICD)推荐用于患有以下中的一种或多种的患者中以预防

猝死并延长寿命:a)缺血性起源的无症状LV收缩功能障碍(例如,LVEF≤30%),其是在急性心肌梗死后至少40天,以及b)无症状非缺血性扩张型心肌病(例如,LVEF≤30%),其接受整骨疗法(osteopathic manipulative treatment,OMT)。在一些实施方案中,本公开文本涉及一种通过施用植入型心律转复除颤器(ICD)治疗患有心力衰竭的患者的方法。

[0914] 在一些实施方案中,在患者显示心力衰竭的体征时,向患者施用ICD。在一些实施方案中,向患有缺血性起源的无症状LV收缩功能障碍(例如,LVEF≤30%)的患者(其是在急性心肌梗死后至少40天)施用ICD。在一些实施方案中,向患有缺血性起源的无症状LV收缩功能障碍(例如,LVEF≤30%)的患者施用ICD。在一些实施方案中,向急性心肌梗死后至少40天的患者施用ICD。在一些实施方案中,向患有无症状非缺血性扩张型心肌病(例如,LVEF≤30%)的患者(其接受最佳医学疗法(OMT))施用ICD。在一些实施方案中,向患有无症状非缺血性扩张型心肌病(例如,LVEF≤30%)的患者施用ICD。在一些实施方案中,向接受最佳医学疗法的患者施用ICD。在一些实施方案中,ICD延迟患者的心力衰竭发作。在一些实施方案中,ICD预防患者的心力衰竭发作。在一些实施方案中,ICD的施用延长患者寿命。在一些实施方案中,ICD的施用缩短患者的住院期长度。在一些实施方案中,ICD的施用防止患者住院。

[0915] 血管紧张素受体肾胰岛素残基溶酶抑制剂

[0916] 已经开发出作用于肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)和中性内肽酶系统的相对新型治疗类别的药剂,称为血管紧张素受体肾胰岛素残基溶酶抑制剂(ARNI)。类别中的第一种是LCZ696,其是在单一物质中组合缬沙坦和沙库必曲(肾胰岛素残基溶酶抑制剂)的部分的分子。通过抑制肾胰岛素残基溶酶,利尿钠肽(NP)、缓激肽和其他肽的降解被减慢。

[0917] 高循环A型利尿钠肽(ANP)和BNP通过与NP受体结合和放大的cGMP生成而发挥生理学作用,从而增强多尿、尿钠增多和心肌舒张和抗重塑。ANP和BNP还抑制肾素和醛固酮分泌。选择性AT1-受体阻断降低血管收缩、水钠潴留和心肌肥大。

[0918] 在一些实施方案中,本公开文本涉及一种通过施用血管紧张素-受体肾胰岛素残基溶酶抑制剂治疗患有心力衰竭的患者的方法。在一些实施方案中,向患者施用沙库必曲/缬沙坦(例如LCZ696,Entresto)。在一些实施方案中,向LVEF≤35%的患有可走动的症状性HFrEF的患者施用沙库必曲/缬沙坦。在一些实施方案中,向具有升高的血浆NP水平(BNP≥150pg/mL和/或NT-proBNP≥600pg/mL,或者,如果患者已经在先前12个月内因HF而住院,BNP≥100pg/mL和/或NT-proBNP≥400pg/mL)的患者施用沙库必曲/缬沙坦。在一些实施方案中,向LVEF≤35%的患有可走动的症状性HFrEF的患者施用沙库必曲/缬沙坦。在一些实施方案中,向估计的GFR(eGFR)≥30mL/min/1.73m2体表面积的患者施用沙库必曲/缬沙坦。

[0919] 在一些实施方案中,在患者显示心力衰竭的体征时,向患者施用沙库必曲/缬沙坦。在一些实施方案中,在患者不耐受ACE抑制剂时,向患者施用沙库必曲/缬沙坦。在一些实施方案中,在患者不耐受β阻断剂时,向患者施用沙库必曲/缬沙坦。在一些实施方案中,在患者不耐受MRA时,向患者施用沙库必曲/缬沙坦。在一些实施方案中,在患者患有HFrEF且保持症状性时,尽管使用ACE抑制剂、β-阻断剂和MRA中的一种或多种治疗,向患者施用沙库必曲/缬沙坦。在一些实施方案中,沙库必曲/缬沙坦延迟患者的心力衰竭发作。在一些实施方案中,沙库必曲/缬沙坦预防患者的心力衰竭发作。在一些实施方案中,沙库必曲/缬沙坦的施用延长患者寿命。在一些实施方案中,沙库必曲/缬沙坦的施用缩短患者的住院期长

度。在一些实施方案中,沙库必曲/缬沙坦的施用防止患者住院。

[0920] 在一些实施方案中,在患者显示心力衰竭的体征时,向患者施用ARNI。在一些实施方案中,在患者不耐受ACE抑制剂时,向患者施用ARNI。在一些实施方案中,在患者不耐受β阻断剂时,向患者施用ARNI。在一些实施方案中,在患者不耐受MRA时,向患者施用ARNI。在一些实施方案中,在患者患有HFrEF且保持症状性时,尽管使用ACE抑制剂、β-阻断剂和MRA中的一种或多种治疗,向患者施用ARNI。在一些实施方案中,ARNI延迟患者的心力衰竭发作。在一些实施方案中,ARNI预防患者的心力衰竭发作。在一些实施方案中,ARNI的施用延长患者寿命。在一些实施方案中,ARNI的施用缩短患者的住院期长度。在一些实施方案中,ARNI的施用防止患者住院。

[0921] 利尿剂

[0922] 利尿剂推荐用于减少患有HFrEF的患者的充血的体征和症状。在患有慢性HF的患者中,髓袢利尿剂和噻嗪类利尿剂可以降低死亡和HF恶化的风险,并且还可能改进运动能力。通常,髓袢利尿剂产生比噻嗪类更强且更短的多尿,但是它们协同作用,并且组合可以用于治疗耐药性水肿。

[0923] 在一些实施方案中,本公开文本涉及一种通过施用一种或多种利尿剂治疗患有心力衰竭的患者的方法。在一些实施方案中,向患者施用选自以下的一种或多种利尿剂:呋塞米、布美他尼、托拉塞米、苄氟噻嗪、氢氯噻嗪、美托拉宗、吲达帕胺、螺内酯/依普利酮、阿米洛利和氨苯蝶啶。

[0924] 在一些实施方案中,向患者施用选自以下的一种或多种髓袢利尿剂:呋塞米、布美他尼和托拉塞米。在一些实施方案中,向患者施用呋塞米。在一些实施方案中,向患者施用布美他尼。在一些实施方案中,向患者施用托拉塞米。

[0925] 在一些实施方案中,向患者施用选自以下的一种或多种噻嗪类利尿剂:苄氟噻嗪、氢氯噻嗪、美托拉宗和吲达帕胺。在一些实施方案中,向患者施用苄氟噻嗪。在一些实施方案中,向患者施用氢氯噻嗪。在一些实施方案中,向患者施用美托拉宗。在一些实施方案中,向患者施用吲达帕胺。

[0926] 在一些实施方案中,向患者施用选自以下的一种或多种留钾利尿剂:螺内酯/依普利酮、阿米洛利和氨苯蝶啶。在一些实施方案中,向患者施用螺内酯/依普利酮。在一些实施方案中,向患者施用阿米洛利。在一些实施方案中,向患者施用氨苯蝶啶。

[0927] 在一些实施方案中,在患者显示心力衰竭的体征时,向患者施用利尿剂。在一些实施方案中,在患者显示充血的体征时,向患者施用利尿剂。在一些实施方案中,在患者具有冠心病(CAD)的高风险时,向患者施用利尿剂。在一些实施方案中,在患者患有冠心病(CAD)时,向患者施用利尿剂。在一些实施方案中,利尿剂延迟患者的心力衰竭发作。在一些实施方案中,利尿剂预防患者的心力衰竭发作。在一些实施方案中,利尿剂的施用延长患者寿命。在一些实施方案中,利尿剂的施用缩短患者的住院期长度。在一些实施方案中,利尿剂的施用防止患者住院。.在一些实施方案中,利尿剂的施用改进患者的六分钟步行测试。

[0928] 其他

[0929] 在一些实施方案中,向患者施用选自以下的一种或多种治疗:肼屈嗪和硝酸异山梨酯、地高辛、洋地黄、N-3多不饱和脂肪酸(PUFA)、I_f通道抑制剂(例如,伊伐布雷定)。在一些实施方案中,向患者施用肼屈嗪和硝酸异山梨酯。在一些实施方案中,向患者施用地高

辛。在一些实施方案中，向患者施用洋地黄。在一些实施方案中，向患者施用N-3多不饱和脂肪酸(PUFA)。在一些实施方案中，向患者施用I_f通道抑制剂(例如，伊伐布雷定)。

[0930] 在一些实施方案中，在患者显示心力衰竭的体征时，向患者施用肼屈嗪和硝酸异山梨酯、地高辛、洋地黄、N-3多不饱和脂肪酸(PUFA)、I_f通道抑制剂(例如，伊伐布雷定)中的一种或多种。在一些实施方案中，肼屈嗪和硝酸异山梨酯、地高辛、洋地黄、N-3多不饱和脂肪酸(PUFA)、I_f通道抑制剂(例如，伊伐布雷定)中的一种或多种延迟患者的心力衰竭发作。在一些实施方案中，肼屈嗪和硝酸异山梨酯、地高辛、洋地黄、N-3多不饱和脂肪酸(PUFA)、I_f通道抑制剂(例如，伊伐布雷定)中的一种或多种预防患者的心力衰竭发作。在一些实施方案中，肼屈嗪和硝酸异山梨酯、地高辛、洋地黄、N-3多不饱和脂肪酸(PUFA)、I_f通道抑制剂(例如，伊伐布雷定)中的一种或多种的施用延长患者寿命。在一些实施方案中，肼屈嗪和硝酸异山梨酯、地高辛、洋地黄、N-3多不饱和脂肪酸(PUFA)、I_f通道抑制剂(例如，伊伐布雷定)中的一种或多种的施用缩短患者的住院期长度。在一些实施方案中，肼屈嗪和硝酸异山梨酯、地高辛、洋地黄、N-3多不饱和脂肪酸(PUFA)、I_f通道抑制剂(例如，伊伐布雷定)中的一种或多种的施用防止患者住院。.在一些实施方案中，肼屈嗪和硝酸异山梨酯、地高辛、洋地黄、N-3多不饱和脂肪酸(PUFA)、I_f通道抑制剂(例如，伊伐布雷定)中的一种或多种的施用改进患者的六分钟步行测试。

[0931] 9.共病

[0932] 共病在HF中是重要的，并且可能影响用于HF的治疗的使用(例如，在患有严重肾功能障碍的一些患者中，也许不可能使用肾素-血管紧张素系统抑制剂)。此外，用于治疗共病的药物可能引起HF恶化(例如，针对关节炎给予的NSAID、一些抗癌药物等)。因此，共病的管理是对患有HF的患者的整体护理的关键组分。在一些实施方案中，要在HF中考虑的一种或多种共病选自动脉高血压、心房颤动、认知功能障碍、糖尿病、高胆固醇血症、铁缺乏、肾功能障碍、代谢综合征、肥胖症、身体去适应作用、钾紊乱、肺病(例如，COPD)和睡眠呼吸暂停。

[0933] 在一些实施方案中，本公开文本考虑治疗心力衰竭(例如，扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的一种或多种共病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如，ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)。在一些实施方案中，本公开文本考虑治疗心力衰竭的一种或多种共病(例如，动脉高血压、心房颤动、认知功能障碍、糖尿病、高胆固醇血症、铁缺乏、肾功能障碍、代谢综合征、肥胖症、身体去适应作用、钾紊乱、肺病(例如，COPD)和睡眠呼吸暂停)的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如，ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)。在一些实施方案中，心力衰竭(例如，扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的一种或多种共病被间接改进。在一些实施方案中，本公开文本考虑预防心力衰竭(例如，扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的一种或多种共病的方法，所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如，ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)。在一些实施方案中，本公开文本考虑降低心力衰竭(例如，扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的进展率的

方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)。在一些实施方案中,本公开文本考虑降低心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的一种或多种共病的进展率的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)。在一些实施方案中,本公开文本考虑降低心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)。在一些实施方案中,本公开文本考虑降低心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)的一种或多种共病的严重性的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)。

[0934] 10.筛选测定

[0935] 在某些方面,本公开文本涉及ActRII-ALK4拮抗剂(例如,ActRII-ALK4配体陷阱拮抗剂、ActRII-ALK4抗体拮抗剂、ActRII-ALK4多核苷酸拮抗剂和/或ActRII-ALK4小分子拮抗剂)用于鉴定化合物(药剂)的用途,所述化合物(药剂)可以用于治疗、预防心力衰竭(例如,扩张型心肌病(DCM)、与肌肉萎缩疾病相关的心力衰竭和遗传性心肌病)或降低心力衰竭的进展率和/或严重性,特别是治疗、预防一种或多种心力衰竭相关共病或降低一种或多种心力衰竭相关共病的进展率和/或严重性。

[0936] 存在多种方法来筛选用于通过靶向一种或多种ActRII-ALK4配体的信号传导(例如,Smad信号传导)治疗心力衰竭的治疗剂。在某些实施方案中,可以进行化合物的高通量筛选以鉴定扰乱ActRII-ALK4配体介导的对所选细胞系的作用的药剂。在某些实施方案中,进行所述测定以筛选和鉴定特异性抑制或减少ActRII-ALK4配体(例如,激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、GDF3、BMP6、GDF8、GDF15、GDF11或BMP10)与其结合配偶体(如II型受体,例如,ActRIIA和/或ActRIIB)的结合的化合物。可替代地,所述测定可以用于鉴定增强ActRII-ALK4配体与其结合配偶体(如II型受体)的结合的化合物。在另一实施方案中,所述化合物可以通过其与II型受体相互作用的能力来鉴定。

[0937] 各种测定形式将能胜任,并且根据本公开文本,本领域普通技术人员将能理解本文未明确描述的测定形式。如本文所述,本发明的测试化合物(药剂)可以通过任何组合化学方法来产生。可替代地,主题化合物可以是在体内或在体外合成的天然存在的生物分子。要针对充当组织生长调节剂的能力加以测试的化合物(药剂)可以例如由细菌、酵母、植物或其他生物产生(例如,天然产物),化学地产生(例如,小分子,包括肽模拟物),或重组地产生。本发明考虑的测试化合物包括非肽基有机分子、肽、多肽、肽模拟物、糖、激素和核酸分子。在某些实施方案中,测试剂是分子量低于约2,000道尔顿的有机小分子。

[0938] 本公开文本的测试化合物可以作为单个的离散实体提供,或者在复杂性较高的文库中提供,如通过组合化学来制备。这些文库可以包含例如醇、烷基卤化物、胺、酰胺、酯、醛、醚和其他类别的有机化合物。尤其是在初始筛选步骤中,测试化合物可以按分离的形式

或作为化合物的混合物被呈递至测试系统。任选地，所述化合物可以任选地用其他化合物衍生并具有促进所述化合物分离的衍生基团。衍生基团的非限制性例子包括生物素、荧光素、地高辛、绿色荧光蛋白、同位素、多组氨酸、磁珠、谷胱甘肽S转移酶(GST)、可光激活的交联剂或其任何组合。

[0939] 在测试化合物和天然提取物的文库的许多药物筛选程序中，需要高通量测定以使在给定时间段中观测的化合物的数目最大化。在无细胞系统(如可以用纯化或半纯化的蛋白质衍生的无细胞系统)中进行的测定通常优选作为“主要”筛选，因为其可以被生成以允许通过测试化合物介导的分子靶标中的改变的快速开发和相对容易的检测。此外，测试化合物的细胞毒性或生物利用度的影响在体外系统中通常可以忽略，而是所述测定主要集中于药物对分子靶标的作用，如在ActRII-ALK4配体(例如，激活素A、激活素B、激活素AB、激活素C、GDF8、GDF15、GDF11、GDF3、BMP6或BMP10)与其结合配偶体(如II型受体，例如，ActRIIA和/或ActRIIB)之间的结合亲和力的改变中可表现。

[0940] 仅为了说明，在本公开文本的示例性筛选测定中，如对于所述测定的意图合适的，使目的化合物与通常能够与ActRIIB配体结合的分离且纯化的ActRIIB多肽接触。然后向所述化合物与ActRIIB多肽的混合物添加含有ActRIIB配体(例如，GDF11)的组合物。ActRIIB/ActRIIB-配体复合物的检测和定量提供用于确定化合物在抑制(或者加强)ActRIIB多肽与其结合蛋白之间的复合物形成方面的功效的手段。所述化合物的功效可以通过从使用各种浓度的测试化合物获得的数据产生剂量-反应曲线来评估。此外，还可以进行对照测定以提供用于比较的基线。例如，在对照测定中，将分离且纯化的ActRIIB配体添加至含有ActRIIB多肽的组合物中，并且在不存在测试化合物的情况下对ActRIIB/ActRIIB配体复合物的形成进行定量。应理解，一般来说，可以混合反应物的顺序可变，并且可以同时混合反应物。此外，代替纯化的蛋白质，可以使用细胞提取物和溶解产物来提供适合的无细胞测定系统。

[0941] ActRII-ALK4配体与其结合蛋白之间的复合物形成可以通过多种技术来检测。例如，使用例如可检测标记的蛋白质，如放射性标记的(例如，^{32}P、^{35}S、^{14}C或^{3}H)、荧光标记的(例如，FITC)或酶标记的ActRIIB多肽和/或其结合蛋白，通过免疫测定，或者通过色谱检测，对复合物形成的调节进行定量。

[0942] 在某些实施方案中，本公开文本考虑在直接或间接测量GDF/BMP配体与其结合蛋白之间的相互作用程度中使用荧光偏振测定和荧光共振能量转移(FRET)测定。此外，其他检测模式，如基于光波导(参见例如，PCT公开WO 96/26432和美国专利号5,677,196)、表面等离子体共振(SPR)、表面电荷传感器和表面力传感器的那些，与本公开文本的许多实施方案相容。

[0943] 此外，本公开文本考虑使用相互作用陷阱测定，也称为“双杂交测定”，用于鉴定破坏或加强ActRII-ALK4配体与其结合配偶体之间的相互作用的药剂。参见例如，美国专利号5,283,317;Zervos等人(1993)Cell 72:223-232;Madura等人(1993)J Biol Chem 268:12046-12054;Bartel等人(1993)Biotechniques 14:920-924;以及Iwabuchi等人(1993)Oncogene 8:1693-1696。在具体的实施方案中，本公开文本考虑使用反向双杂交系统来鉴定解离ActRII-ALK4配体与其结合蛋白之间的相互作用的化合物(例如，小分子或肽)[参见例如，Vidal和Legrain,(1999)Nucleic Acids Res 27:919-29;Vidal和Legrain,(1999)Trends Biotechnol 17:374-81;以及美国专利号5,525,490;5,955,280;和5,965,368]。

[0944] 在某些实施方案中，主题化合物是依据其与ActRII-ALK4配体相互作用的能力来鉴定。所述化合物与ActRII-ALK4配体之间的相互作用可以是共价的或非共价的。例如，这样的相互作用可以在蛋白质水平上使用体外生化方法来鉴定，所述方法包括光交联、放射性标记的配体结合以及亲和色谱[参见例如，Jakoby WB等人(1974)Methods in Enzymology 46:1]。在某些情形中，所述化合物可以在基于机制的测定(如用于检测与ActRII-ALK4配体结合的化合物的测定)中进行筛选。这可以包括固相或流体相结合事件。可替代地，可以将编码ActRII-ALK4配体的基因用报告系统(例如，β-半乳糖苷酶、萤光素酶或绿色荧光蛋白)转染至细胞中，并且优选地通过高通量筛选或者用文库的单独成员针对文库进行筛选。可以使用其他基于机制的结合测定；例如，检测自由能变化的结合测定。结合测定可以用固定至孔、珠或芯片的靶标或通过固定化抗体捕获的靶标来进行，或者通过毛细管电泳进行解析。通常可以使用比色终点或荧光或表面等离子体共振来检测已结合的化合物。

[0945] 11.药物组合物

[0946] 可以将本文所述的治疗剂(例如，ActRII-ALK4拮抗剂)配制为药物组合物。可以使用一种或多种生理学上可接受的载体或赋形剂以常规方式配制根据本公开文本使用的药物组合物。此类配制品通常基本上无热原质以符合大多数法规要求。

[0947] 在某些实施方案中，本公开文本的治疗方法包括全身地或作为植入物或装置局部地施用所述组合物。在施用时，用于本公开文本中使用的治疗组合物呈基本上无热原或无热原的生理上可接受的形式。还可以任选地包括于如上所述的组合物中的除了ActRII-ALK4拮抗剂外的治疗有用的药剂可以在本文公开的方法中与主题化合物同时或依序施用。

[0948] 通常，本文公开的蛋白质治疗剂将经肠胃外施用，并且特别是静脉内或皮下施用。适合于肠胃外施用的药物组合物可以包含一种或多种ActRII-ALK4拮抗剂与一种或多种药学上可接受的无菌等渗水性或非水性溶液、分散液、悬浮液或乳液或者可在即将使用前重构为无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末组合，所述组合可以含有抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂、使配制品与预期接受者的血液等渗的溶质或者助悬或增稠剂。可以用于本公开文本的药物组合物中的合适的水性和非水性载体的例子包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油(如橄榄油)和可注射的有机酯，如油酸乙酯。可以例如通过使用如卵磷脂的包衣材料、在分散液的情况下通过维持所要求的粒度、以及通过使用表面活性剂来维持适当流动性。

[0949] 如果需要，可以在包装或分配器装置中提供组合物和配制品，所述包装或分配器装置可以含有一种或多种含有活性成分的单位剂型。包装可以例如包含金属或塑料箔，如泡罩包装。包装或分配器装置可以附有给药说明书。

[0950] 此外，所述组合物可以以用于递送至标靶组织位点的形式包封或注射。在某些实施方案中，本发明的组合物可以包括能够将一种或多种治疗化合物(例如，ActRII-ALK4拮抗剂)递送至靶组织位点的基质，从而提供用于发育中的组织并且最佳地能够被再吸收到体内的结构。例如，所述基质可以提供ActRII-ALK4拮抗剂的缓释。这样的基质可以由当前用于其他植入医学应用的材料来形成。

[0951] 基质材料的选择基于生物相容性、生物可降解性、机械特性、装饰性外观和界面特性。主题组合物的特定应用将限定适当的配制品。所述组合物的潜在基质可以是可生物降

解的且在化学上定义的硫酸钙、磷酸三钙、羟基磷灰石、聚乳酸和聚酸酐。其他潜在的材料是生物可降解的和生物学上明确限定的，如骨或真皮胶原。其他基质由纯蛋白质或细胞外基质组分组成。其他潜在基质是不可生物降解的和化学成分确定的，如烧结的羟基磷灰石、生物玻璃、铝酸盐或其他陶瓷。基质可以由任何上述类型的材料的组合组成，所述材料诸如聚乳酸和羟基磷灰石或胶原和磷酸三钙。生物陶瓷的组成可以改变，如在铝酸钙-磷酸盐中，并且经加工以改变孔径、粒度、颗粒形状和生物降解性。

[0952] 在某些实施方案中，本发明的方法可以例如以如下形式口服施用：胶囊、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂(使用经调味的基质，通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄芪胶)、粉末、颗粒，或水性液体或非水性液体中的溶液或悬浮液，或水包油或油包水液体乳液，或酏剂或糖浆，或含片(使用惰性基质，如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶)和/或漱口剂等，其各自均含有预定量的药剂作为活性成分。还可以大丸剂、舐剂或糊剂形式施用药剂。

[0953] 在用于口服的固体剂型(胶囊、片剂、丸剂、糖衣丸、粉末、颗粒等)中，可以将一种或多种本发明的治疗性化合物与一种或多种药学上可接受的载体如柠檬酸钠或磷酸二钙和/或以下中的任一种混合：(1)填充剂或增量剂，如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸；(2)粘合剂，如羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶；(3)湿润剂，如甘油；(4)崩解剂，如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠；(5)溶液阻滞剂，如石蜡；(6)吸收促进剂，如季铵化合物；(7)润湿剂，如像鲸蜡醇和甘油单硬脂酸酯；(8)吸收剂，如高岭土和膨润土；(9)润滑剂，如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠及其混合物；以及(10)着色剂。在胶囊、片剂和丸剂的情况下，所述药物组合物还可以包含缓冲剂。类似类型的固体组合物也可作为填充剂用于使用如乳糖或奶糖以及高分子量聚乙二醇等的赋形剂的软和硬填充明胶胶囊中。

[0954] 用于口服施用的液体剂型包括药学上可接受的乳液、微乳液、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。除活性成分之外，液体剂型可以含有在本领域中常用的惰性稀释剂，如水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂，如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(具体地，棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和山梨聚糖的脂肪酸酯及其混合物。除了惰性稀释剂，口服组合物还可以包括佐剂，如润湿剂、乳化剂和助悬剂、甜味剂、调味剂、着色剂、芳香剂和防腐剂。

[0955] 除活性化合物以外，悬浮液还可以含有助悬剂，如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄芪胶以及其混合物。

[0956] 本发明的组合物还可以含有佐剂，如防腐剂、润湿剂、乳化剂以及分散剂。可以通过包括各种抗细菌剂和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等来确保微生物作用的阻止。还可能合乎需要的是在组合物中包含等渗剂，如糖、氯化钠等。此外，可以通过包含延迟吸收的试剂(如单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射药物形式的延长吸收。

[0957] 应理解，剂量方案将由主治医师在考虑改变本公开文本的主题化合物(例如，ActRII-ALK4拮抗剂)的作用的各种因素后确定。所述各种因素包括但不限于患者的年龄、性别和饮食、疾病的严重性、给药时间和其他临床因素。任选地，剂量可以随重构中使用的基质类型和组合物中化合物的类型而变化。向最终组合物中添加其他已知的生长因子也可能影响剂量。可以通过定期评估骨生长和/或修复，例如通过X射线(包括DEXA)、组织形态测定法和四环素标记来监测进展。

[0958] 在某些实施方案中，本发明还提供基因疗法用于ActRII-ALK4拮抗剂的体内产生的基因疗法。这样的疗法将通过将ActRII-ALK4拮抗剂多核苷酸序列引入具有如上文列出的障碍的细胞或组织中来实现其治疗作用。ActRII-ALK4拮抗剂多核苷酸序列的递送可以使用重组表达载体如嵌合病毒或胶体分散系统来实现。对于ActRII-ALK4拮抗剂多核苷酸序列的治疗性递送，优选地使用靶向脂质体。

[0959] 如本文所传授的可以用于基因疗法的各种病毒载体包括腺病毒、疱疹病毒、牛痘或优选RNA病毒如逆转录病毒。优选地，逆转录病毒载体是鼠或禽逆转录病毒的衍生物。可以插入单一外源基因的逆转录病毒载体的例子包括但不限于：莫洛尼鼠白血病病毒(MoMuLV)、哈维鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺瘤病毒(MuMTV)和劳斯肉瘤病毒(RSV)。多种另外的逆转录病毒载体可以掺入多个基因。所有这些载体都可以转移或掺入可选择标记的基因，使得可以鉴别并生成转导的细胞。可以通过附接例如糖、糖脂或蛋白质而使逆转录病毒载体成为靶标特异性的。优选的靶向通过使用抗体来实现。本领域技术人员将认识到，可以将特定多核苷酸序列插入逆转录病毒基因组中或附着至病毒包膜，以允许含有ActRII-ALK4拮抗剂的逆转录病毒载体的靶标特异性递送。在一个优选实施方案中，所述载体靶向骨或软骨。

[0960] 可替代地，可以通过常规的磷酸钙转染，用编码逆转录病毒结构基因gag、pol和env的质粒直接转染组织培养细胞。然后用含有目的基因的载体质粒转染这些细胞。所得细胞将逆转录病毒载体释放到培养基中。

[0961] 用于ActRII-ALK4拮抗剂多核苷酸的另一种靶向递送系统是胶体分散系统。胶体分散系统包括大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠粒和基于脂质的系统，所述系统包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。本发明的优选胶体系统是脂质体。脂质体是人工膜囊泡，其在体外和体内可用作递送媒介物。RNA、DNA和完整病毒粒子可以包封在水性内部并且以生物活性形式递送至细胞(参见例如，Fraley等人，Trends Biochem.Sci.，6:77，1981)。使用脂质体媒介物进行有效基因转移的方法是本领域中已知的，参见例如，Mannino等人，Biotechniques，6:682，1988。脂质体的组成通常是磷脂的组合，通常与类固醇、特别是胆固醇组合。也可以使用其他磷脂或其他脂质。脂质体的物理特征取决于pH、离子强度和二价阳离子的存在。

[0962] 可用于脂质体产生的脂质的例子包括磷脂酰基化合物，如磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、鞘脂、脑苷脂和神经节苷脂。说明性磷脂包括卵磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱和二硬脂酰磷脂酰胆碱。基于例如器官特异性、细胞特异性和细胞器特异性，脂质体的靶向也是可能的，并且是本领域中已知的。

[0963] 本公开文本提供如下配制品，其可以经改变以包括酸和碱来调节pH；并且包括缓冲剂以将pH值保持在狭窄范围内。

[0964] 实施例

[0965] 现在对本发明进行大体上的描述，通过参考以下实施例将更容易地理解本发明，所述实施例仅出于说明本发明的某些实施方案的目的而被包括在内，并且不欲限制本发明。

[0966] 实施例1:ActRIIA-Fc融合蛋白

[0967] 构建可溶ActRIIA融合蛋白，其具有与人或小鼠Fc结构域融合的人ActRIIA的细胞

外结构域,其间具有最小接头。将构建体分别称为ActRIIA-hFc和ActRIIA-mFc。

[0968] ActRIIA-hFc在下文中显示为从CHO细胞系中纯化(SEQ ID NO:380):

[0969] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQ

[0970] GCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPK

[0971] PPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF

[0972] NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPV

[0973] PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN

[0974] NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0975] K

[0976] 缺少C末端赖氨酸的另外的ActRIIA-hFc显示于下文中,如从CHO细胞系所纯化(SEQ ID NO:378):

[0977] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQ

[0978] GCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPK

[0979] PPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF

[0980] NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPV

[0981] PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN

[0982] NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0983] ActRIIA-hFc和ActRIIA-mFc蛋白是在CHO细胞系中表达。考虑了三种不同的前导序列:

[0984] (i)蜜蜂蜂毒肽(HBML):MKFLVNVALVFMVVYISYIYA(SEQ ID NO:7)

[0985] (ii)组织型纤溶酶原激活物(TPA):MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP(SEQ ID NO:8)

[0986]

[0987] (iii)天然的:MGAAAKLAFAVFLISCSSGA(SEQ ID NO:379)。

[0988] 所选形式采用TPA前导序列并且具有以下未加工的氨基酸序列:

[0989] MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGAAILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGCWLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMEVTQPTSNPVTPKPPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:381)

[0990] 这种多肽是由以下核酸序列编码:

[0991] ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCCCGGCGCCGCTATACTTGGTAGATCAGAAACTCAGGAGTGTCTTTTTTTAATGCTAATTGGGAAAAAGACAGAACCAATCAAACTGGTGTTGAACCGTGTTATGGTGACAAAGATAAACGGCGGCATTGTTTTGCTACCTGGAAGAATATTTCTGGTTCCATTGAATAGTGAAACAAGGTTGTTGGCTGGATGATATCAACTGCTATGACAGGACTGATTGTGTAGAAAAAAAGACAGCCCTGAAGTATATTTCTGTTGCTGTGAGGGCAATATGTGTAATGAAAAGTTTTCTTATTTTCCGGAGATGGAAGTCACACAGCCCACTTCAAATCCAGTTACACCTAAGCCACCCACCGGTGGTGGAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT

GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC
GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG
TCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCG
GGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC
TCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC
TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGAATTC(SEQ ID NO:382)

[0992] ActRIIA-hFc和ActRIIA-mFc都非常适合于重组表达。如图14中所示,将蛋白质纯化为单个的界限清晰的蛋白质峰。N末端测序揭示了-ILGRSETQE的单个序列(SEQ ID NO:383)。可以通过一系列柱色谱步骤实现纯化,包括例如以下中按任何顺序的三种或更多种:蛋白A色谱、Q琼脂糖色谱、苯基琼脂糖色谱、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。所述纯化可以通过病毒过滤和缓冲液交换来完成。将ActRIIA-hFc蛋白纯化至纯度>98%(如通过尺寸排阻色谱所测定的)和>95%(如通过SDS PAGE所测定的)。

[0993] ActRIIA-hFc和ActRIIA-mFc显示对配体的高亲和力。使用标准的胺偶联程序将GDF11或激活素A固定化于Biacore™CM5芯片上。将ActRIIA-hFc和ActRIIA-mFc蛋白加载至系统上,并且测量结合。ActRIIA-hFc以5x 10^{-12}的解离常数(K_D)结合至激活素并以9.96x10^{-9}的K_D结合至GDF11。参见图15A-图15B。使用类似的结合测定,确定ActRIIA-hFc对其他TGF-β超家族配体(包括例如激活素B、GDF8、BMP6和BMP10)具有高至中亲和力。ActRIIA-mFc的行为类似。

[0994] ActRIIA-hFc在药代动力学研究中极为稳定。用1mg/kg、3mg/kg或10mg/kg的ActRIIA-hFc蛋白对大鼠给药,并在24、48、72、144和168小时测量蛋白质的血浆水平。在单独研究中,以1mg/kg、10mg/kg或30mg/kg对大鼠给药。在大鼠体内,ActRIIA-hFc具有11-14天的血清半衰期,并且在两周后药物的循环水平极高(对于1mg/kg、10mg/kg或30mg/kg的初始施用,分别为11μg/ml、110μg/ml或304μg/ml)。在食蟹猴体内,血浆半衰期显著大于14天,并且对于1mg/kg、10mg/kg或30mg/kg的初始施用,药物的循环水平分别为25μg/ml、304μg/ml或1440μg/ml。

[0995] 实施例2:ActRIIA-hFc蛋白的表征

[0996] 使用SEQ ID NO:8的组织血纤蛋白溶解酶原前导序列,使ActRIIA-hFc融合蛋白在稳定转染的CHO-DUKX B11细胞中从pAID4载体(SV40 ori/增强子、CMV启动子)表达。所述蛋白质,如上文在实施例1中所述纯化,具有SEQ ID NO:380的序列。Fc部分是人IgG1Fc序列,如SEQ ID NO:380中所示。蛋白质分析揭示,ActRIIA-hFc融合蛋白通过二硫键合形成为同二聚体。

[0997] CHO细胞表达的物质对激活素B配体具有比针对在人293细胞中表达的ActRIIA-hFc融合蛋白所报告者更高的亲和力[参见,del Re等人(2004)J Biol Chem.279(51):53126-53135]。另外,TPA前导序列的使用提供比其他前导序列更高的产量,并且与用天然前导序列表达的ActRIIA-Fc不同,提供高纯度N末端序列。天然前导序列的使用得到两个主要种类的ActRIIA-Fc,各自具有不同的N末端序列。

[0998] 实施例3:替代性ActRIIA-Fc蛋白

[0999] 可以根据本文所述的方法使用的多种ActRIIA变体描述于通过引用以其整体并入

本文的作为WO 2006/012627公开的国际专利申请中(参见例如,第55-58页)。替代构建体可以具有C末端尾部(ActRIIA的细胞外结构域的最后15个氨基酸)的缺失。这种构建体的序列呈现于下文中(Fc部分加下划线)(SEQ ID NO:384):

[1000] ILGRSETQECLFFNANWEKDRTNQTGVEPCYGDKDKRRHCFATWKNISGSIEIVKQGC

[1001] WLDDINCYDRTDCVEKKDSPEVYFCCCEGNMCNEKFSYFPEMTGGGTHTCPPCPAPE

[1002] LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK

[1003] PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQ

[1004] VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF

[1005] LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1006] 实施例4.ActRIIB-Fc融合多肽的生成

[1007] 申请人构建了可溶性ActRIIB融合多肽,其具有与人G1Fc结构域融合的人ActRIIB的细胞外结构域,其间具有接头(三个甘氨酸氨基酸)。所述构建体被称为ActRIIB(20-134)-G1Fc。

[1008] ActRIIB(20-134)-G1Fc显示于下文SEQ ID NO:5中(接头加下划线),如从CHO细胞系所纯化:

[1009] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKG

[1010] CWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT

[1011] GGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW

[1012] YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE

[1013] KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY

[1014] KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:5)

[1015] 缺少C末端赖氨酸的另外的ActRIIB(20-134)-G1Fc显示于下文中,如从CHO细胞系所纯化(SEQ ID NO:378):

[1016] GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKG

[1017] CWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT

[1018] GGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW

[1019] YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE

[1020] KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY

[1021] KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:385)

[1022] ActRIIB(20-134)-G1Fc多肽在CHO细胞系中表达。考虑了三种不同的前导序列:

[1023] (i)蜜蜂蜂毒肽(HBML):MKFLVNVALVFMVVYISYIYA(SEQ ID NO:7)

[1024] (ii)组织型纤溶酶原激活物(TPA):MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP(SEQ ID NO:8)

[1025] (iii)天然的:MTAPWVALALLWGSLCAG(SEQ ID NO:9)。

[1026] 所选形式采用TPA前导序列并且具有以下未加工的氨基酸序列:

[1027] MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPGASGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCE

[1028] GEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEG

[1029] NFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPTGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL

[1030] MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT

[1031] VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL

[1032] TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV

[1033] FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1034] (SEQ ID NO:6)

[1035] 该多肽由以下核酸序列(SEQ ID NO:10)编码：

[1036] ATGGATGCAAT GAAGAGAGGG CTCTGCTGTG TGCTGCTGCT GTGTGGAGCA GTCTTCGTTT CGCCCGGCGC CTCTGGGCGT GGGGAGGCTG AGACACGGGA GTGCATCTAC TACAACGCCA ACTGGGAGCT GGAGCGCACC AACCAGAGCG GCCTGGAGCG CTGCGAAGGC GAGCAGGACA AGCGGCTGCA CTGCTACGCC TCCTGGCGCA ACAGCTCTGG CACCATCGAG CTCGTGAAGA AGGGCTGCTG GCTAGATGAC TTCAACTGCT ACGATAGGCA GGAGTGTGTG GCCACTGAGG AGAACCCCCA GGTGTACTTC TGCTGCTGTG AAGGCAACTT CTGCAACGAG CGCTTCACTC ATTTGCCAGA GGCTGGGGGC CCGGAAGTCA CGTACGAGCC ACCCCCGACA GCCCCCACCG GTGGTGGAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG CCCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TATAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA (SEQ ID NO: 10)

[1037] CHO细胞产生的物质的N末端测序揭示了-GRGEAE的主要序列(SEQ ID NO:11)。值得注意的是,文献中报告的其他构建体以-SGR…序列开始。

[1038] 可以通过一系列柱色谱步骤实现纯化,包括例如以下中按任何顺序的三种或更多种:蛋白A色谱、Q琼脂糖色谱、苯基琼脂糖色谱、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。所述纯化可以通过病毒过滤和缓冲液交换来完成。

[1039] ActRIIB(20-134)-Fc融合多肽也在HEK293细胞和COS细胞中表达。尽管来自所有细胞系和合理培养条件的材料在体内提供具有肌肉构建活性的多肽,但观察到效力的可变性,这可能与细胞系选择和/或培养条件有关。

[1040] 实施例5.计算方法

[1041] 激活素IIB受体(ActRIIB)结合刺激Smad2/3激活的多种TGFβ超家族配体(包括激活素A、激活素B、GDF8和GDF11),以及刺激Smad1/5/8激活的骨形态发生蛋白(BMP)(如BMP9和BMP10)。ActRIIB-Fc融合多肽可以用作与可溶配体结合并通过防止配体与细胞表面受体结合来阻断Smad激活的配体阱。已知ActRIIB-Fc对BMP9介导的Smad1/5/8激活的拮抗作用会导致不期望的副作用,包括鼻出血和毛细管扩张(Campbell,C.等人Muscle Nerve 55:458-464,2017)。为了设计ActRIIB中减少BMP9结合同时保留与刺激Smad2/3激活的配体的结合的突变,比较了三种ActRIIB配体复合物的晶体结构:(1)BMP9:ActRIIB:Alk1,PDB ID＝4fao,(2) ActRIIB:激活素A,PDB ID:1s4y, 以及 (3)GDF11:ActRIIB:Alk5,PDB ID:6mac(可从蛋白质数据库(PDB)https://www.rcsb.org/获得)。基于晶体结构对ActRIIB与

三种配体之间的接触的比较基于由相同的相应ActRIIB残基接触的配体残基的电荷、极性和疏水性差异揭示了突变灶的残基。在鉴定出要靶向以供突变的残基后，使用Schrödinger Bioluminate生物制品建模软件平台(2017-4版:Bioluminate，Schrödinger,LLC，纽约，纽约州)以计算方式预测ActRIIB中会减少与BMP9的结合同时维持其他配体结合活性的突变。

[1042] 考虑从晶体结构的比较中鉴定的所有残基用于突变。进行残基扫描计算，其考虑结构复合物中的分子的稳定性和亲和力二者，产生每种分子(配体和受体)和复合物结构的潜在突变和能量，以及野生型和突变体形式二者的能量差异的指定列表。在分析亲和力/稳定性/主要能量等参数后，鉴定前5%-10%的单一突变。在此分析后进行这些突变的潜在组合。在结构上分析所选单一突变和突变组合以理解结构差异和形成的/损失的接触。最终，对于每种复合物(ActRIIB:配体)筛选出817个单一突变，并且基于Δ亲和力以及选择性地考虑到Δ稳定性(溶剂化)和Δ主要能量来选择最优命中(top hit)。在关注离群值的剔除(striking)时，还考虑其他特性。

[1043] 实施例6.变体ActRIIB-Fc多肽的生成

[1044] 基于实施例4中所述的发现，申请人在ActRIIB的细胞外结构域中生成了一系列突变(序列变异)，并且将这些变体多肽产生为可溶性同二聚融合多肽，其包含通过任选接头接合的变体ActRIIB细胞外结构域和Fc结构域。用于变体ActRIIB-Fc多肽的生成的背景ActRIIB-Fc融合物是ActRIIB-G1Fc，并且在上文实施例4中显示为SEQ ID NO:5。

[1045] 将各种取代突变引入背景ActRIIB-G1Fc多肽中。基于实施例4中呈现的数据，预期这些构建体如果用TPA前导序列来表达，则将缺少N末端丝氨酸。因此，大多数成熟序列可能始于甘氨酸(缺少N末端丝氨酸)，但是一些种类可能呈现有N末端丝氨酸。通过PCR诱变在ActRIIB细胞外结构域中生成突变。在PCR后，将片段通过Qiagen柱纯化，用SfoI和AgeI消化并进行凝胶纯化。将这些片段连接至表达载体pAID4中(参见WO2006/012627)，使得在连接后其产生与人IgG1的融合嵌合体。在转化至大肠杆菌DH5α中之后，挑取菌落并分离DNA。对于鼠构建体(mFc)，用鼠IgG2a取代人IgG1。对所有突变体都进行序列验证。

[1046] 未加工的ActRIIB(F82I-N83R)-G1Fc的氨基酸序列显示于下文中(SEQ ID NO:276)。信号序列和接头序列由实线下划线指示，并且F82I和N83R取代由双下划线指示。SEQ ID NO:276的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1047]
```
  1  MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
 51  GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDIRC YDRQECVATE
101  ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
151  PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
201  DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
251  APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
301  EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351  EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 276)
```

[1048] 该ActRIIB(F82I-N83R)-G1Fc融合多肽由以下核酸序列(SEQ ID NO:277)编码：

[1049]
```
  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 CATCCGTTGC 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 TCCCCCCAAA
 501  ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
 551  TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
[1050]
 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 CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
 851  TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
 901  GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
 951  CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
1001  ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1051  GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG
1101  TAAATGA  (SEQ ID NO: 277)
```

[1051] 成熟ActRIIB(F82I-N83R)-G1Fc融合多肽(SEQ ID NO:278)如下并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

```
   1  GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
  51  IELVKKGCWL DDIRCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
 101  GGPEVTYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
 151  RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
[1052]
 201  VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
 251  REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
 301  FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
(SEQ ID NO: 278)
```

[1053] 未加工的ActRIIB(F82K-N83R)-G1Fc的氨基酸序列显示于下文中(SEQ ID NO:279)。信号序列和接头序列由实线下划线指示,并且F82K和N83R取代由双下划线指示。SEQ ID NO:279的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

```
   1  MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
  51  GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDKRC YDRQECVATE
 101  ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
 151  PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
[1054]
 201  DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
 251  APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
 301  EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
 351  EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 279)
```

[1055] 该ActRIIB(F82K-N83R)-G1Fc融合多肽由以下核酸序列(SEQ ID NO:331)编码:

[1056]

```
   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 CAAGCGTTGC TACGATAGGC AGGAGTGTGT GGCCACTGAG
 301  GAGAACCCCC AGGTGTACTT CTGCTGCTGT GAAGGCAACT TCTGCAACGA
 351  GCGCTTCACT CATTTGCCAG AGGCTGGGGG CCCGGAAGTC ACGTACGAGC
```

[1057]

```
 401  CACCCCCGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
 451  CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCCAAA
 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 CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
 851  TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
 901  GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
 951  CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
1001  ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1051  GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG
1101  TAAATGA  (SEQ ID NO: 331)
```

[1058] 成熟ActRIIB(F82K-N83R)-G1Fc融合多肽(SEQ ID NO:332)如下并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1059]

```
   1  GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
  51  IELVKKGCWL DDKRCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
 101  GGPEVTYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
 151  RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
 201  VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
 251  REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
 301  FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
(SEQ ID NO: 332)
```

[1060] 未加工的ActRIIB(F82T-N83R)-G1Fc的氨基酸序列显示于下文中(SEQ ID NO:333)。信号序列和接头序列由实线下划线指示,并且F82T和N83R取代由双下划线指示。SEQ ID NO:333的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1061]

```
   1  MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
  51  GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDTRC YDRQECVATE
 101  ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
 151  PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
 201  DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
 251  APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
 301  EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
 351  EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 333)
```

[1062] 该ActRIIB(F82T-N83R)-G1Fc融合多肽由以下核酸序列(SEQ ID NO:334)编码:

[1063]

```
   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 CACCCGTTGC 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 TCCCCCCAAA
 501  ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
 551  TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
 601  GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
 651  CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT
```

[1064]

```
 701  GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
 751  GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
 801  ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
 851  TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
 901  GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
 951  CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
1001  ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1051  GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG
1101  TAAATGA  (SEQ ID NO: 334)
```

[1065] 成熟ActRIIB(F82T-N83R)-G1Fc融合多肽(SEQ ID NO:335)如下并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1066]

```
   1  GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
  51  IELVKKGCWL DDTRCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
 101  GGPEVTYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
 151  RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
 201  VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
 251  REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
 301  FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
(SEQ ID NO: 335)
```

[1067] 未加工的ActRIIB(F82T)-G1Fc的氨基酸序列显示于下文中(SEQ ID NO:336)。信号序列和接头序列由实线下划线指示,并且F82T取代由双下划线指示。SEQ ID NO:336的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1068]

```
   1  MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
  51  GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDTNC YDRQECVATE
 101  ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
 151  PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
 201  DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
 251  APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
 301  EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
 351  EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 336)
```

[1069] 该ActRIIB(F82T)-G1Fc融合多肽由以下核酸序列(SEQ ID NO:337)编码:

[1070]

```
   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 CACCAACTGC 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 TCCCCCCAAA
 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 CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
 851  TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
 901  GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
 951  CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
1001  ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1051  GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG
1101  TAAATGA  (SEQ ID NO: 337)
```

[1071]

[1072] 成熟ActRIIB(F82T)-G1Fc融合多肽(SEQ ID NO:338)如下并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1073]

```
   1  GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
  51  IELVKKGCWL DDTNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
 101  GGPEVTYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
 151  RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
 201  VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
 251  REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
 301  FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
```

(SEQ ID NO: 338)

[1074] 未加工的ActRIIB(L79H-F82I)-G1Fc的氨基酸序列显示于下文中(SEQ ID NO:339)。信号序列和接头序列由实线下划线指示,并且L79H和F82I取代由双下划线指示。SEQ ID NO:339的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1075]

```
   1  MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
  51  GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWHDDINC YDRQECVATE
 101  ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
 151  PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
 201  DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
 251  APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
 301  EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
 351  EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 339)
```

[1076] 该ActRIIB(L79H-F82I)-G1Fc融合多肽由以下核酸序列(SEQ ID NO:340)编码:

```
   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  GGCACGATGA CATCAACTGC 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 TCCCCCCAAA
 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 CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
 851  TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
 901  GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
 951  CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
1001  ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1051  GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG
1101  TAAATGA  (SEQ ID NO: 340)
```

[1077]

[1078] 成熟ActRIIB(L79H-F82I)-G1Fc融合多肽(SEQ ID NO:341)如下并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1079]

```
   1  GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
  51  IELVKKGCWH DDINCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
 101  GGPEVTYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
 151  RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
 201  VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
 251  REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
 301  FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
(SEQ ID NO: 341)
```

[1080]

[1081] 未加工的ActRIIB(L79H)-G1Fc的氨基酸序列显示于下文中(SEQ ID NO:342)。信号序列和接头序列由实线下划线指示,并且L79H取代由双下划线指示。SEQ ID NO:342的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1082]

```
   1  MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
  51  GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWHDDFNC YDRQECVATE
 101  ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
 151  PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
 201  DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
 251  APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
 301  EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
 351  EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 342)
```

[1083] 该ActRIIB(L79H)-G1Fc融合多肽由以下核酸序列(SEQ ID NO:343)编码:

```
    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   GGCACGATGA 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 TCCCCCCAAA
  501   ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
[1084] 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 CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
  851   TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
  901   GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
  951   CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
 1001   ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
 1051   GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG
 1101   TAAATGA  (SEQ ID NO: 343)
```

[1085] 成熟ActRIIB(L79H)-G1Fc融合多肽(SEQ ID NO:344)如下并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

```
    1   GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
   51   IELVKKGCWH DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
  101   GGPEVTYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
[1086] 151   RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
  201   VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
  251   REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
  301   FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
```

(SEQ ID NO: 344)

[1087] 未加工的ActRIIB(L79H-F82K)-G1Fc的氨基酸序列显示于下文中(SEQ ID NO:345)。信号序列和接头序列由实线下划线指示,并且L79H和F82K取代由双下划线指示。SEQ ID NO:345的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

```
    1   MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
   51   GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWHDDKNC YDRQECVATE
  101   ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
  151   PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
[1088] 201   DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
  251   APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
  301   EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
  351   EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 345)
```

[1089] 该ActRIIB(L79H-F82K)-G1Fc融合多肽由以下核酸序列(SEQ ID NO:346)编码:

[1090]

```
   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  GGCACGATGA CAAGAACTGC 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 TCCCCCCAAA
 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 CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
 851  TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
 901  GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
 951  CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
1001  ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1051  GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG
1101  TAAATGA  (SEQ ID NO: 346)
```

[1091] 成熟ActRIIB(L79H-F82K)-G1Fc融合多肽(SEQ ID NO:347)如下并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1092]

```
   1  GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
  51  IELVKKGCWH DDKNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
 101  GGPEVTYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
 151  RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
 201  VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
 251  REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
 301  FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
(SEQ ID NO: 347)
```

[1093] 未加工的ActRIIB(E50L)-G1Fc的氨基酸序列显示于下文中(SEQ ID NO:348)。信号序列和接头序列由实线下划线指示,并且E50L取代由双下划线指示。SEQ ID NO:348的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1094]

```
   1  MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
  51  GLERCLGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE
```

[1095]

```
 101  ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
 151  PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
 201  DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
 251  APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
 301  EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
 351  EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 348)
```

[1096] 该ActRIIB(E50L)-G1Fc融合多肽由以下核酸序列(密码子优化的)(SEQ ID NO:349)编码:

```
       1  ATGGATGCGA TGAAACGCGG CCTGTGCTGC GTGCTGCTGC TGTGCGGCGC
      51  GGTGTTTGTG AGCCCGGGCG CCAGCGGCCG CGGCGAAGCG GAAACCCGCG
     101  AATGCATTTA TTATAACGCG AACTGGGAAC TGGAACGCAC CAACCAGAGC
     151  GGCCTGGAAC GCTGCCTGGG CGAACAGGAT AAACGCCTGC ATTGCTATGC
     201  GAGCTGGCGC AACAGCAGCG GCACCATTGA ACTGGTGAAA AAAGGCTGCT
     251  GGCTGGATGA TTTTAACTGC TATGATCGCC AGGAATGCGT GGCGACCGAA
     301  GAAAACCCGC AGGTGTATTT TTGCTGCTGC GAAGGCAACT TTTGCAACGA
     351  ACGCTTTACC CATCTGCCGG AAGCGGGCGG CCCGGAAGTG ACCTATGAAC
     401  CGCCGCCGAC CGCGCCGACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
     451  CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCCAAA
     501  ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
[1097] 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 CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
     851  TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
     901  GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
     951  CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
    1001  ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
    1051  GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG
    1101  TAAATGA  (SEQ ID NO: 349)
```

[1098] 成熟ActRIIB(E50L)-G1Fc融合多肽(SEQ ID NO:350)如下并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

```
       1  GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC LGEQDKRLHC YASWRNSSGT
      51  IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
     101  GGPEVTYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
     151  RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
[1099] 201  VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
     251  REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
     301  FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
(SEQ ID NO: 350)
```

[1100] 未加工的ActRIIB(L38N-L79R)-G1Fc的氨基酸序列显示于下文中(SEQ ID NO:351)。信号序列和接头序列由实线下划线指示,并且L38N和L79R取代由双下划线指示。SEQ ID NO:351的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

```
       1  MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWENERTNQS
      51  GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWRDDFNC YDRQECVATE
     101  ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
[1101] 151  PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
     201  DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
     251  APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
     301  EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
[1102] 351  EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 351)
```

[1103] 该ActRIIB(L38N-L79R)-G1Fc融合多肽由以下核酸序列(SEQ ID NO:352)编码:

```
   1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
  51  AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG
 101  AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGA ACGAGCGCAC CAACCAGAGC
 151  GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC
 201  CTCCTGGCGC AACAGCTCTG GCACCATCGA GCTCGTGAAG AAGGGCTGCT
 251  GGCGCGATGA 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 TCCCCCCAAA
 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 CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
 851  TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
 901  GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
 951  CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
1001  ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1051  GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG
1101  TAAATGA  (SEQ ID NO: 352)
```

成熟ActRIIB(L38N-L79R)-G1Fc融合多肽（SEQ ID NO: 353）如下并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

```
   1  GRGEAETREC IYYNANWENE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
  51  IELVKKGCWR DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
 101  GGPEVTYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
 151  RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
 201  VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
 251  REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
 301  FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
```

(SEQ ID NO: 353)

[1104] 未加工的ActRIIB(V99G)-G1Fc的氨基酸序列显示于下文中(SEQ ID NO:354)。信号序列和接头序列由实线下划线指示，并且V99G取代由双下划线指示。SEQ ID NO:354的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1105]
```
   1  MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
  51  GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE
 101  ENPQGYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
 151  PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
 201  DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
 251  APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
 301  EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
 351  EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 354)
```

[1106] 该ActRIIB(V99G)-G1Fc融合多肽由以下核酸序列(密码子优化的)(SEQ ID NO: 355)编码：

[1107]
```
   1  ATGGATGCGA TGAAACGCGG CCTGTGCTGC GTGCTGCTGC TGTGCGGCGC
  51  GGTGTTTGTG AGCCCGGGCG CCAGCGGCCG CGGCGAAGCG GAAACCCGCG
 101  AATGCATTTA TTATAACGCG AACTGGGAAC TGGAACGCAC CAACCAGAGC
```

[1108]

```
 151  GGCCTGGAAC GCTGCGAAGG CGAACAGGAT AAACGCCTGC ATTGCTATGC
 201  GAGCTGGCGC AACAGCAGCG GCACCATTGA ACTGGTGAAA AAAGGCTGCT
 251  GGCTGGATGA TTTTAACTGC TATGATCGCC AGGAATGCGT GGCGACCGAA
 301  GAAAACCCGC AGGGCTATTT TTGCTGCTGC GAAGGCAACT TTTGCAACGA
 351  ACGCTTTACC CATCTGCCGG AAGCGGGCGG CCCGGAAGTG ACCTATGAAC
 401  CGCCGCCGAC CGCGCCGACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
 451  CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCCAAA
 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 CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
 851  TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
 901  GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
 951  CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
1001  ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1051  GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG
1101  TAAATGA  (SEQ ID NO: 355)
```

[1109] 成熟ActRIIB(V99G)-G1Fc融合多肽(SEQ ID NO:356)如下并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1110]

```
   1  GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
  51  IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQG YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
 101  GGPEVTYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
 151  RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
 201  VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
 251  REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
 301  FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
```

(SEQ ID NO: 356)

[1111] 构建体通过瞬时感染在COS或CHO细胞中表达,并且通过过滤和蛋白A色谱进行纯化。在一些情况下,用条件化的培养基而不是纯化的多肽进行测定。通过SDS-PAGE和分析型尺寸排阻色谱评价用于报告基因测定的样品的纯度。

[1112] 在下文描述的结合测定和/或生物测定中测试突变体。

[1113] 可替代地,可以将类似突变引入ActRIIB细胞外结构域中,所述ActRIIB细胞外结构域具有五个氨基酸的N末端截短和三个氨基酸的C末端截短,如下文所示(SEQ ID NO:357)。

[1114] 该截短的ActRIIB细胞外结构域基于SEQ ID NO:2中的编号表示为ActRIIB(25-131)。

[1115]

```
 25  ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
 75  KGCWLDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
125  TYEPPPT  (SEQ ID NO: 357)
```

[1116] 相应的背景融合多肽ActRIIB(25-131)-G1Fc显示于下文中(SEQ ID NO:12)。

[1117]
```
  1   ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
 51   KGCWLDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
101   TYEPPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
151   VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
201   WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ
251   VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV
301   DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 12)
```

[1118] 实施例7.变体ActRIIB-Fc多肽的活性和配体结合概况

[1119] 为了确定变体ActRIIB-Fc同二聚体的配体结合概况，使用基于Biacore™的结合测定来比较某些变体ActRIIB-Fc多肽的配体结合动力学。将要测试的ActRIIB-Fc多肽使用抗Fc抗体独立地捕获至系统上。然后注射配体并使其流过捕获的受体蛋白。在37℃下分析的变体ActRIIB-Fc多肽的结果显示于图16A和图16B中。使用ActRIIB-G1Fc作为对照多肽。

[1120] 为了确定变体ActRIIB-Fc多肽的活性，使用基于A204细胞的测定来比较与ActRIIB-G1Fc相比，变体ActRIIB-Fc多肽对激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP9和BMP10的信号传导的作用。简言之，该测定使用源自肌肉的人A204横纹肌肉瘤细胞系(ATCC®:HTB-82™)和报告载体pGL3(CAGA)12(Dennler等人，1998,EMBO 17:3091-3100)以及海肾报告质粒(pRLCMV)来控制转染效率。CAGA12基序存在于TGF-β反应性基因(例如，PAI-1基因)中，因此该载体通常用于可以通过Smad2/3发信号的配体，所述配体包括激活素A、GDF11和BMP9。

[1121] 在第1天，将A204细胞转移到一个或多个48孔板中。在第2天，用10μg pGL3(CAGA)12或pGL3(CAGA)12(10μg)+pRLCMV(1μg)和Fugene转染这些细胞。在第3天，将含有0.1％BSA的培养基中稀释的配体与ActRIIB-Fc多肽一起预孵育1h，然后将其添加至细胞。大约六小时后，将细胞用PBS冲洗并裂解。在萤光素酶测定中分析细胞裂解产物以确定Smad激活的程度。

[1122] 使用该测定针对对通过激活素A、激活素B、GDF8、GDF11、BMP9和BMP10的细胞信号传导的抑制作用来筛选变体ActRIIB-Fc多肽。将在人ActRIIB细胞外结构域中掺入氨基酸取代的同二聚Fc融合多肽的效力与包含未修饰的人ActRIIB细胞外结构域的Fc融合多肽ActRIIB-G1Fc的效力相比较。对于所测试的一些变体，不可能计算精确的IC_{50}，但是曲线斜率中抑制的迹象是可检测的。对于这些变体，包括相对IC50的数量级的估计值，即>10nM或>100nM，而不是明确的数字。这样的数据点由下表10中的(*)指示。对于所测试的一些变体，在所测试的浓度范围内在曲线的斜率中无可检测的抑制，其在表10中由“ND”指示。

[1123] 表10.同二聚ActRIIB-Fc构建体的抑制性效力。

[1124]

同二聚 ActRIIB-Fc构建体的抑制性效力						
ActRIIB多肽	IC_{50}(Nm)					
	GDF8	GDF11	激活素A	激活素B	BMP9	BMP10
ActRIIB-G1Fc	0.95	0.12	0.05	0.067	1.82	0.036
F82I-N83R	ND	9.95	1.67	0.08	ND	13.25
F82K-N83R	ND	ND	1.32	0.09	ND	0.53
F82T-N83R	ND	17.94	1.52	0.11	ND	12.57
F82T	2.17	0.27	0.10	0.09	ND	0.07
L79H-F82I	>10*	0.36	>100*	0.15	ND	>100*
L79H	5.76	0.24	>10*	0.07	ND	>100*
L79H-F82K	ND	>100*	ND	0.10	ND	>100*
ND：在所测试的浓度范围内无法检测 * IC_{50}的数量级的估计值						

[1125] 如上文表10中以及图16A和图16B中所示，ActRIIB细胞外结构域中的氨基酸取代可以在各种体外测定中改变ActRIIB:配体结合与下游信号传导活性之间的平衡。通常，申请人实现生成ActRIIB细胞外结构域中的变体的目标，所述变体展现与含有未修饰的ActRIIB细胞外结构域的融合多肽(ActRIIB-G1Fc)相比降低的或无法检测的与BMP9的结合，同时保留其他配体结合特性。

[1126] 另外地，如与ActRIIB-G1Fc相比，变体ActRIIB(L79H-F82I)、ActRIIB(L79H)和ActRIIB(L79H-F82K)在显示与BMP9的结合的降低时，还展现激活素A结合的显著降低，同时保留相对高的对激活素B的亲和力。表10中显示抑制性效力的IC_{50}值与此配体结合趋势一致。类似地，变体ActRIIB(F82K-N83R)、ActRIIB(F82I-N83R)和ActRIIB(F82T-N83R)显示类似的趋势。

[1127] 此外，如与ActRIIB-G1Fc相比，变体ActRIIB(F82K-N83R)、ActRIIB(F82I-N83R)、ActRIIB(F82T-N83R)和ActRIIB(L79H-F82K)在显示与BMP9的结合的降低和保留相对高的对激活素B的亲和力时，还展现GDF8和GDF11结合的显著降低。表10中显示抑制性效力的IC_{50}值与此配体结合趋势一致。

[1128] 另外应注意，如与ActRIIB-G1Fc相比，变体ActRIIB(L79H-F82I)、ActRIIB(L79H)和ActRIIB(L79H-F82K)在显示与BMP9的结合的降低和保留相对高的对激活素B的亲和力时，还展现BMP10结合的降低。表10中显示抑制性效力的IC_{50}值与此配体结合趋势一致。

[1129] 因此，除了实现产生展现降低的至无法检测的与BMP9的结合的ActRIIB变体的目标外，申请人还已经生成多种多样的新型变体多肽，其中许多的特征部分在于独特的配体结合/抑制概况。因此，在这样的选择性拮抗作用有利的某些应用中，这些变体可能比ActRIIB-G1Fc更有用。例子包括治疗性应用，其中期望保留激活素B的拮抗作用，同时降低BMP9以及任选地激活素A、GDF8、GDF11和BMP10中的一种或多种的拮抗作用。

[1130] 实施例8.变体ActRIIB-Fc多肽的生成

[1131] 申请人在ActRIIB的细胞外结构域中生成了一系列突变(序列变异)，并且将这些变体多肽产生为可溶性同二聚融合多肽，其包含通过任选接头接合的变体ActRIIB细胞外结构域和Fc结构域。背景ActRIIB-Fc融合物是ActRIIB-G1Fc，如SEQ ID NO:5中所示。

[1132] 将各种取代突变引入背景ActRIIB-Fc多肽中。基于实施例4中呈现的数据，预期这些构建体如果用TPA前导序列来表达，则将缺少N末端丝氨酸。通过PCR诱变在ActRIIB细胞外结构域中生成突变。在PCR后，将片段通过Qiagen柱纯化，用SfoI和AgeI消化并进行凝胶纯化。将这些片段连接至表达载体pAID4中(参见WO2006/012627)，使得在连接后其产生与人IgG1的融合嵌合体。在转化至大肠杆菌DH5α中之后，挑取菌落并分离DNA。对于鼠构建体(mFc)，用鼠IgG2a取代人IgG1。对所有突变体都进行序列验证。

[1133] 未加工的ActRIIB(K55A)-G1Fc的氨基酸序列显示于下文中(SEQ ID NO:31)。信号序列和接头序列由实线下划线指示，并且K55A取代由双下划线指示。SEQ ID NO:31的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1134]
```
  1  MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
 51  GLERCEGEQD ARLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE
101  ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
151  PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
201  DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
251  APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
301  EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351  EALHNHYTQK SLSLSPGK  (SEQ ID NO: 31)
```

[1135] 该ActRIIB(K55A)-G1Fc融合多肽由以下核酸序列(SEQ ID NO:32)编码：

[1136]
```
   1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
  51  AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG
 101  AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC
 151  GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC GCCCGGCTGC 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
```

[1137]
```
 401  CACCCCCGAC AGCCCCCACC GGTGGTGGAA CTCACACATG CCCACCGTGC
 451  CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCCAAA
 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 CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
 851  TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
 901  GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
 951  CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
1001  ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1051  GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCCCCGGG
1101  TAAA  (SEQ ID NO: 32)
```

[1138] 成熟ActRIIB(K55A)-G1Fc融合多肽(SEQ ID NO:33)如下并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1139]

```
  1   GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDARLHC 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   REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
301   FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
```

(SEQ ID NO: 33)

[1140] 未加工的ActRIIB(K55E)-G1Fc的氨基酸序列显示于下文中(SEQ ID NO:34)。信号序列和接头序列由实线下划线表示,并且K55E取代由双下划线表示。SEQ ID NO:34的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1141]

```
  1   MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
 51   GLERCEGEQD ERLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE
101   ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
151   PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
201   DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
251   APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
301   EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351   EALHNHYTQK SLSLSPGK  (SEQ ID NO: 34)
```

[1142] 该ActRIIB(K55E)-G1Fc融合多肽由以下核酸序列(SEQ ID NO:35)编码:

[1143]

```
  1   ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 51   AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCTCTGGGCG TGGGGAGGCT GAGACACGGG
101   AGTGCATCTA CTACAACGCC AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC
151   GGCCTGGAGC GCTGCGAAGG CGAGCAGGAC GAGCGGCTGC 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 TCCCCCCAAA
501   ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
551   TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
601   GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
651   CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT
```

[1144]

```
701   GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
751   GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
801   ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
851   TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
901   GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
951   CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
1001  ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1051  GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCCCCGGG
1101  TAAA  (SEQ ID NO: 35)
```

[1145] 成熟ActRIIB(K55E)-G1Fc融合多肽(SEQ ID NO:36)如下并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1146]
```
  1  GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDERLHC 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  REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
301  FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
```
(SEQ ID NO: 36)

[1147] 未加工的ActRIIB(F82I)-G1Fc的氨基酸序列显示于下文中(SEQ ID NO:37)。信号序列和接头序列由实线下划线表示,并且F82I取代由双下划线表示。SEQ ID NO:37的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1148]
```
  1  MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
 51  GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDINC YDRQECVATE
101  ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
151  PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
201  DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
251  APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
301  EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351  EALHNHYTQK SLSLSPGK  (SEQ ID NO: 37)
```

[1149] 该ActRIIB(F82I)-G1Fc融合多肽由以下核酸序列(SEQ ID NO:38)编码:

[1150]
```
  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 CATCAACTGC 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 TCCCCCCAAA
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 CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
851  TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
901  GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
951  CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
```

[1151]
```
1001  ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1051  GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG
1101  TAAA  (SEQ ID NO: 38)
```

[1152] 成熟ActRIIB(F82I)-G1Fc融合多肽(SEQ ID NO:39)如下并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1153]
```
  1  GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
 51  IELVKKGCWL DDINCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
101  GGPEVTYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
151  RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
201  VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
251  REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
301  FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
```
(SEQ ID NO: 39)

[1154] 未加工的ActRIIB(F82K)-G1Fc的氨基酸序列显示于下文中(SEQ ID NO:40)。信号序列和接头序列由实线下划线表示,并且F82K取代由双下划线表示。SEQ ID NO:40的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1155]
```
  1  MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
 51  GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDKNC YDRQECVATE
101  ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
151  PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
201  DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
251  APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
301  EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351  EALHNHYTQK SLSLSPGK  (SEQ ID NO: 40)
```

[1156] 该ActRIIB(F82K)-G1Fc融合多肽由以下核酸序列(SEQ ID NO:41)编码:

[1157]
```
   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 CAAGAACTGC 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 TCCCCCCAAA
 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 CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
 851  TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
 901  GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
 951  CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCAAG CTCACCGTGG
1001  ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1051  GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG
1101  TAAA  (SEQ ID NO: 41)
```

[1158] 成熟ActRIIB(F82K)-G1Fc融合多肽(SEQ ID NO:42)如下并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1159]
```
  1  GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
```

[1160]
```
  51  IELVKKGCWL DDKNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
 101  GGPEVTYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
 151  RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
 201  VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
 251  REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
 301  FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
```
(SEQ ID NO: 42)

[1161] 构建体在COS或CHO细胞中表达，并且通过过滤和蛋白A色谱进行纯化。在一些情况下，用条件培养基而不是纯化的蛋白质进行测定。通过SDS-PAGE和蛋白质印迹分析来评价用于报告基因测定的样品的纯度。

[1162] 在下文描述的结合测定和/或生物测定中测试突变体。

[1163] 可替代地，可以将类似突变引入ActRIIB细胞外结构域中，所述ActRIIB细胞外结构域具有五个氨基酸的N末端截短和三个氨基酸的C末端截短，如下文所示(SEQ ID NO: 53)。该截短的ActRIIB细胞外结构域基于SEQ ID NO:2中的编号表示为ActRIIB(25-131)。

[1164]
```
 25  ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
 75  KGCWLDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
125  TYEPPPT
```
(SEQ ID NO: 53)

[1165] 相应的背景融合多肽ActRIIB(25-131)-G1Fc显示于下文中(SEQ ID NO:12)。

[1166]
```
  1  ETRECIYYNA NWELERTNQS GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK
 51  KGCWLDDFNC YDRQECVATE ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV
101  TYEPPPTGGG THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
151  VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD
201  WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ
251  VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV
301  DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK
```
(SEQ ID NO: 12)

[1167] 实施例9.变体ActRIIB-Fc同二聚体的配体结合概况以及变体ActRIIB-Fc多肽在基于细胞的测定中的活性

[1168] 为了确定变体ActRIIB-Fc同二聚体的配体结合概况，使用基于Biacore™的结合测定来比较某些变体ActRIIB-Fc多肽的配体结合动力学。将要测试的ActRIIB-Fc多肽使用抗Fc抗体独立地捕获至系统上。然后注射配体并使其流过捕获的受体蛋白。在37℃下分析的变体ActRIIB-Fc多肽的结果显示于图17中。与包含未修饰的ActRIIB细胞外结构域的Fc融合多肽相比，变体多肽ActRIIB(K55A)-Fc、ActRIIB(K55E)-Fc、ActRIIB(F82I)-Fc和ActRIIB(F82K)-Fc展现它们对BMP9比对GDF11更大的亲和力降低。在25℃下分析的另外的变体ActRIIB-Fc多肽的结果显示于图18中。

[1169] 这些结果证实K55A、K55E、F82I和F82K是降低对BMP9的ActRIIB结合亲和力超过它们降低对激活素A或GDF11的ActRIIB亲和力的取代。因此，在这样的选择性拮抗作用有利的某些应用中，这些变体ActRIIB-Fc多肽可能比未修饰的ActRIIB-Fc多肽更有用。例子包括治疗性应用，其中期望保留激活素A、激活素B、GDF8和GDF11中的一种或多种的拮抗作用，同时降低BMP9的拮抗作用。

[1170] 为了确定变体ActRIIB-Fc多肽的活性，使用基于A204细胞的测定来比较变体ActRIIB-Fc多肽对通过激活素A、GDF11和BMP9的信号传导的作用。简言之，该测定使用源自肌肉的人A204横纹肌肉瘤细胞系(ATCC®:HTB-82™)和报告载体pGL3(CAGA)12(Dennler等

人,1998,EMBO 17:3091-3100)以及海肾报告质粒(pRLCMV)来控制转染效率。CAGA12基序存在于TGF-β反应性基因(例如,PAI-1基因)中,因此该载体通常用于可以通过Smad2/3发信号的配体,所述配体包括激活素A、GDF11和BMP9。

[1171] 在第1天,将A-204细胞转移到一个或多个48孔板中。在第2天,用10μg pGL3(CAGA)12或pGL3(CAGA)12(10μg)+pRLCMV(1μg)和Fugene转染这些细胞。在第3天,将含有0.1%BSA的培养基中稀释的配体与ActRIIB-Fc多肽一起预孵育1h,然后将其添加至细胞。大约六小时后,将细胞用PBS冲洗并裂解。在萤光素酶测定中分析细胞裂解产物以确定Smad激活的程度。

[1172] 该测定用于筛选变体ActRIIB-Fc多肽对通过激活素A、GDF11和BMP9的细胞信号传导的抑制作用。将在人ActRIIB细胞外结构域中掺入氨基酸取代的同二聚Fc融合多肽的效力与包含未修饰的人ActRIIB细胞外结构域的Fc融合多肽的效力进行比较。

[1173]

表11：同二聚ActRIIB-Fc构建体的抑制性效力			
ActRIIB 多肽	IC_{50}(ng/Ml)		
	激活素A	GDF11	BMP9
野生型	8	9	31
A24N	128	99	409
R40A	---	591	1210
E50K	132	180	721
E50P	756	638	~3000
E52A	198	71	359
E52K	762	296	~10000
K55A	15	11	122
K55D	396	365	5500
K55E	19	14	290
K55R	206	318	777
Y60K	---	414	ND
Y60P	---	544	ND
K74R	---	45	165
K74Y	---	ND	ND
K74A / L79P	---	ND	ND
L79K	---	477	ND
L79P	---	ND	ND
L79R	---	234	ND
D80A	---	ND	ND
F82I	11	9	277
F82K	10	15	~5000
F82W	---	276	ND
F82W / N83A	---	389	~40000
V99E	---	ND	ND
V99K	---	ND	---
ND：在所测试的浓度范围内无法检测 --- 未测试			

[1174] 如上表所示，ActRIIB细胞外结构域中的单一氨基酸取代可以在基于细胞的报告基因测定中改变激活素A或GDF11抑制与BMP9抑制之间的平衡。与含有未修饰的ActRIIB细胞外结构域的融合多肽相比，变体ActRIIB(K55A)-Fc、ActRIIB(K55E)-Fc、ActRIIB(F82I)-Fc和ActRIIB(F82K)-Fc显示较低效的对BMP9的抑制(增加的IC_{50}值)，同时维持基本上未减小的对激活素A和GDF11的抑制。

[1175] 这些结果表明,与包含未修饰的ActRIIB细胞外结构域的Fc融合多肽相比,变体ActRIIB-Fc多肽如ActRIIB(K55A)-Fc、ActRIIB(K55E)-Fc、ActRIIB(F82I)-Fc和ActRIIB(F82K)-Fc是激活素A和GDF11的更具选择性的拮抗剂。因此,在这样的选择性拮抗作用有利的某些应用中,这些变体可能比ActRIIB-Fc更有用。例子包括治疗性应用,其中期望保留激活素A、GDF8和GDF11中的一种或多种的拮抗作用,同时降低BMP9和可能的BMP10的拮抗作用。

[1176] 实施例10.ActRIIB-Fc:ActRIIB(L79E)-Fc异二聚体的生成

[1177] 申请人设想可溶性ActRIIB-Fc:ActRIIB(L79E)-Fc异聚复合物的生成,其包含未修饰的人ActRIIB和在位置79具有亮氨酸至谷氨酸取代的人ActRIIB的细胞外结构域,所述细胞外结构域各自分别用位于细胞外结构域与G1Fc结构域之间的接头与G1Fc结构域融合。单独构建体分别称为ActRIIB-Fc融合多肽和ActRIIB(L79E)-Fc融合多肽,并且其各自的序列提供于下文中。

[1178] 如与ActRIIB-Fc或ActRIIB(L79E)-Fc同二聚复合物相反,用于促进ActRIIB-Fc:ActRIIB(L79E)-Fc异聚复合物的形成的方法是在Fc结构域的氨基酸序列中引入改变以指导不对称异聚复合物的形成。使用Fc结构域制备不对称相互作用对的许多不同方法描述于本公开文本中。

[1179] 在一种方法中,分别在SEQ ID NO:43-45和46-48的ActRIIB(L79E)-Fc和ActRIIB-Fc多肽序列中说明,可以改变一个Fc结构域以在相互作用面处引入阳离子氨基酸,同时可以改变另一个Fc结构域以在相互作用面处引入阴离子氨基酸。ActRIIB(L79E)-Fc融合多肽和ActRIIB-Fc融合多肽可以各自采用TPA前导序列(SEQ ID NO:8)。

[1180] ActRIIB(L79E)-Fc多肽序列(SEQ ID NO:43)显示于下文中:

[1181]
```
  1  MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
 51  GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWEDDFNC YDRQECVATE
101  ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
151  PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
201  DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
251  APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
301  EWESNGQPEN NYDTTPPVLD SDGSFFLYSD LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351 EALHNHYTQK SLSLSPG  (SEQ ID NO: 43)
```

[1182] 前导序列(信号)序列和接头加下划线,并且L79E取代由双下划线指示。为了促进ActRIIB-Fc:ActRIIB(L79E)-Fc异二聚体而不是可能的同二聚复合物中任一种的形成,可以将两个氨基酸取代(用酸性氨基酸替代赖氨酸)引入ActRIIB融合多肽的Fc结构域中,如上文由双下划线所指示。SEQ ID NO:43的氨基酸序列可以任选地提供有添加至C末端的赖氨酸。

[1183] 该ActRIIB(L79E)-Fc融合多肽可以由以下核酸序列(SEQ ID NO:44)编码:

[1184]

```
   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  GGGAAGATGA 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 TCCCCCCAAA
 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 CATCCCGGGA GGAGATGACC AAGAACCAGG
 851  TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
 901  GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACGACA CCACGCCTCC
 951  CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTATAGCGAC CTCACCGTGG
1001  ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1051  GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG
1101  T
```

(SEQ ID NO: 44)

[1185]

[1186] 成熟ActRIIB(L79E)-Fc融合多肽(SEQ ID NO:45)如下,并且可以任选地提供有添加至C末端的赖氨酸。

[1187]

```
  1  GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
 51  IELVKKGCWE DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
101  GGPEVTYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
151  RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
201  VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
251  REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYDTT PPVLDSDGSF
301  FLYSDLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PG
```

(SEQ ID NO: 45)

[1188] ActRIIB-Fc融合多肽的互补形式(SEQ ID NO:46)如下:

[1189]

```
  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 NYKTTPPVLK SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351  EALHNHYTQK SLSLSPGK
```

(SEQ ID NO: 46)

[1190] 前导序列和接头序列加下划线。为了用上文SEQ ID NO:43和45的ActRIIB(L79E)-Fc融合多肽指导异二聚体形成,可以将两个氨基酸取代(用赖氨酸替代谷氨酸和天冬氨酸)引入ActRIIB-Fc融合多肽的Fc结构域中,如上文由双下划线所指示。SEQ ID NO:46的氨基酸序列可以任选地提供为从C-末端除去赖氨酸。

[1191] 该ActRIIB-Fc融合多肽可以由以下核酸(SEQ ID NO:47)编码:

[1192]

```
   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 TCCCCCCAAA
 501  ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
 551  TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
 601  GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
```

[1193]

```
 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: 47)
```

[1194] 成熟ActRIIB-Fc融合多肽序列(SEQ ID NO:48)如下并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸：

[1195]

```
   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: 48)

[1196] SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:48的ActRIIB(L79E)-Fc和ActRIIB-Fc多肽分别可以从CHO细胞系共表达和纯化，以产生包含ActRIIB-Fc:ActRIIB(L79E)-Fc的异聚多肽复合物。

[1197] 在使用不对称的Fc融合多肽促进异多聚体复合物的形成的另一种方法中，可以改变Fc结构域以引入互补的疏水相互作用和另外的分子间二硫键，如分别在SEQ ID NO:49-50和51-52的ActRIIB(L79E)-Fc和ActRIIB-Fc多肽序列中所说明。ActRIIB(L79E)-Fc融合多肽和ActRIIB-Fc融合多肽可以各自采用TPA前导序列(SEQ ID NO:8)。ActRIIB(L79E)-Fc多肽序列(SEQ ID NO:49)显示于下文中：

[1198]

```
  1   MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
 51   GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWEDDFNC 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 NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351   EALHNHYTQK SLSLSPG  (SEQ ID NO: 49)
```

[1199] 信号序列和接头序列加下划线，并且L79E取代由双下划线指示。为了促进ActRIIB-Fc:ActRIIB(L79E)-Fc异二聚体而不是可能的同二聚复合物中任一种的形成，可以将两个氨基酸取代(用半胱氨酸替代丝氨酸和用色氨酸替代苏氨酸)引入融合多肽的Fc结构域中，如上文由双下划线所指示。SEQ ID NO:49的氨基酸序列可以任选地提供有添加至C末端的赖氨酸。成熟ActRIIB(L79E)-Fc融合多肽(SEQ ID NO:50)如下：

[1200]

```
  1   GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
 51   IELVKKGCWE 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 PG
```

(SEQ ID NO: 50)

[1201] ActRIIB-Fc融合多肽的互补形式(SEQ ID NO:51)如下并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1202]

```
  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 KGQPREPQVC TLPPSREEMT KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV
301   EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351   EALHNHYTQK SLSLSPGK  (SEQ ID NO: 51)
```

[1203] 前导序列和接头加下划线。为了用上文SEQ ID NO:49-50的ActRIIB(L79E)-Fc融合多肽指导异二聚体形成，可以将四个氨基酸取代(用半胱氨酸置换酪氨酸，用丝氨酸置换苏氨酸，用丙氨酸置换亮氨酸，以及用缬氨酸置换酪氨酸)引入ActRIIB-Fc融合多肽的Fc结构域中，如上文由双下划线所指示。SEQ ID NO:51的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1204] 成熟ActRIIB-Fc融合多肽序列如下并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1205]

```
  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 EPQVCTLPPS
251   REEMTKNQVS LSCAVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
301   FLVSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
```

(SEQ ID NO: 52)

[1206] SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:52的ActRIIB(L79E)-Fc和ActRIIB-Fc多肽分别可以

从CHO细胞系共表达和纯化，以产生包含ActRIIB-Fc:ActRIIB(L79E)-Fc的异聚多肽复合物。

[1207] 各种ActRIIB-Fc:ActRIIB(L79E)-Fc复合物的纯化可以通过一系列柱色谱步骤实现，包括例如以下中按任何顺序的三种或更多种：蛋白A色谱、Q琼脂糖色谱、苯基琼脂糖色谱、尺寸排阻色谱、阳离子交换色谱、多元色谱(例如，用含有静电和疏水性配体的树脂)和基于表位的亲和色谱(例如，用针对ActRIIB的表位的抗体或功能等效配体)。可以通过病毒过滤和缓冲液交换完成纯化。

[1208] 实施例11.ActRIIB-Fc:ActRIIB(L79E)-Fc异聚体的配体结合概况

[1209] 使用基于Biacore™的结合测定来比较ActRIIB-Fc:ActRIIB(L79E)-Fc异二聚体与未修饰的ActRIIB-Fc同二聚体的配体结合动力学。使用抗Fc抗体将融合蛋白捕获到系统上。然后注射配体并使其在37℃下流过捕获的受体蛋白。结果总结于下表中，其中最能表明有效配体阱的配体解离速率(k_d)以粗体表示。

[1210]

表12 在37ºC下与ActRII-Fc同二聚体相比，ActRIIB-Fc:ActRIIB(L79E)-Fc异二聚体的配体结合

配体	ActRIIB-Fc同二聚体			ActRIIB-Fc:ActRIIB(L79E)-Fc异二聚体		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)
激活素A	7.4×10^6	**1.9×10^{-4}**	25	8.8×10^6	1.5×10^{-3}	170
激活素B	8.1×10^6	**6.6×10^{-5}**	8	8.3×10^6	**2.1×10^{-4}**	25
GDF3	1.4×10^6	2.2×10^{-3}	1500	5.8×10^5	5.9×10^{-3}	10000
GDF8	3.8×10^6	**2.6×10^{-4}**	70	3.4×10^6	**5.0×10^{-4}**	150
GDF11	4.1×10^7	**1.7×10^{-4}**	4	4.0×10^7	**3.6×10^{-4}**	9
BMP6	1.3×10^8	7.4×10^{-3}	56	3.3×10^8	1.8×10^{-2}	56
BMP9	5.0×10^6	1.3×10^{-3}	250	短暂*		>2800
BMP10	5.1×10^7	**2.0×10^{-4}**	4	4.8×10^7	2.0×10^{-3}	42
* 由于相互作用的短暂性而不确定						

[1211]

[1212] 在此实施例中，两条ActRIIB多肽链之一中的单一氨基酸取代相对于未修饰的ActRIIB-Fc同二聚体改变Fc-融合多肽的配体结合选择性。与ActRIIB-Fc同二聚体相比，ActRIIB(L79E)-Fc异二聚体在很大程度上保留了与激活素B、GDF8、GDF11和BMP6的高亲和力结合，但展现大约快十倍的针对激活素A和BMP10的解离速率，以及与BMP9的结合强度的甚至更大降低。因此，在这样的选择性拮抗作用有利的某些应用中，变体ActRIIB-Fc异聚体可能比未修饰的ActRIIB-Fc同二聚体更有用。例子包括治疗性应用，其中期望保留激活素B、GDF8、GDF11和BMP6中的一种或多种的拮抗作用，同时降低激活素A、BMP9或BMP10.9的拮抗作用。ActRIIB突变体的生成：

[1213] 生成ActRIIB的细胞外结构域中的一系列突变，并且将这些突变体多肽产生为细

胞外ActRIIB与Fc结构域之间的可溶性融合多肽。激活素和细胞外ActRIIB的共晶结构没有显示细胞外结构域的最终(C末端)15个氨基酸(本文中称为"尾")在配体结合中的任何作用。在晶体结构上未能分辨出这个序列,表明这些残基存在于晶体中未均一包装的柔性环中。Thompson EMBO J.2003年4月1日;22(7):1555-66。这个序列在ActRIIB与ActRIIA之间的保守性也较低。因此,在基础或背景ActRIIB-Fc融合物构建体中省略这些残基。另外地,在此实施例中,背景形式中的位置64由丙氨酸占据。因此,此实施例中的背景ActRIIB-Fc融合物具有以下序列(Fc部分加下划线)(SEQ ID NO:54):SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1214] 令人惊讶地,如下文所讨论,发现C末端尾增强激活素和GDF-11结合,因此ActRIIB-Fc的优选形式具有以下序列(Fc部分加下划线)(SEQ ID NO:55):

[1215] SGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWANSSGTIELVKK

[1216] GCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPPTAP

[1217] TGGGTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW

[1218] YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIE

[1219] KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY

[1220] KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1221] 将各种突变引入背景ActRIIB-Fc多肽中。在ActRIIB细胞外结构域中通过PCR诱变生成突变。在PCR后,经由Qiagen柱纯化片段,用SfoI和AgeI消化并进行凝胶纯化。将这些片段连接至表达载体pAID4中,使得在连接后其产生与人IgG1的融合嵌合体。分离DNA。所有突变体都是在HEK293T细胞中通过瞬时转染产生的。总而言之,在500ml旋转器中,将HEK293T细胞以6x 10^5个细胞/ml设置于250ml体积的Freestyle(Invitrogen)培养基中并生长过夜。第二天,用DNA:PEI(1:1)复合物以0.5ug/ml最终DNA浓度处理这些细胞。在4h后,添加250ml培养基并使细胞生长7天。通过旋转沉降细胞来收获条件培养基并浓缩。

[1222] 在蛋白A柱上纯化所有突变体并用低pH(3.0)甘氨酸缓冲液洗脱。在中和后,将这些突变体针对PBS透析。

[1223] 也在CHO细胞中通过类似方法产生突变体。

[1224] 在下文所述的结合测定和生物测定中测试突变体。在CHO细胞和HEK293细胞中表达的蛋白质在所述结合测定和生物测定中是无法区分的。

[1225] 实施例12:ActRIIB-ALK4异二聚体的生成

[1226] 构建ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异聚复合物,其包含人ActRIIB和人ALK4的细胞外结构域,所述细胞外结构域各自单独地以定位于细胞外结构域与Fc结构域之间的接头融合至Fc结构域。各个构建体分别称为ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽,并且下面提供了各自的序列。

[1227] 与ActRIIB-Fc或ALK4-Fc同二聚复合物相反,用于促进ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异聚复合物形成的方法是在Fc结构域的氨基酸序列中引入改变以指导不对称异聚复合物的形成。使用Fc结构域制备不对称相互作用对的许多不同方法描述于本公开文本中。

[1228] 在一种方法中，在SEQ ID NO:396和398以及SEQ ID No:88和89的ActRIIB-Fc和ALK4-Fc多肽序列中分别说明，一个Fc结构域发生改变以在相互作用面处引入阳离子氨基酸，而另一个Fc结构域发生改变以在相互作用面处引入阴离子氨基酸。ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽各自采用组织纤溶酶原激活物(TPA)前导序列。

[1229] ActRIIB-Fc多肽序列(SEQ ID NO:396)如下所示：

[1230]
```
  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 NYKTTPPVLK SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351  EALHNHYTQK SLSLSPGK
```
(SEQ ID NO: 396)

[1231] 前导序列(信号)序列和接头加下划线。为了促进ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异二聚体而不是可能的同二聚体复合物中任一种的形成，可以将两个氨基酸取代(用赖氨酸置换酸性氨基酸)引入ActRIIB融合蛋白的Fc结构域中，如上文由双下划线所指示。SEQ ID NO:396的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸(K)。

[1232] 该ActRIIB-Fc融合蛋白由以下核酸序列(SEQ ID NO:397)编码：

[1233]
```
   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 TCCCCCCAAA
 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: 397)

[1234]

[1235] 成熟ActRIIB-Fc融合多肽(SEQ ID NO:398)如下，并且可以任选地从C末端去除赖氨酸(K)。

[1236]

```
  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: 398)

[1237] ALK4-Fc融合多肽的互补形式(SEQ ID NO:88)如下：

[1238]

```
  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 KVSNKALPAP IEKTISKAKG
251   QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY
301   DTTPPVLDSD GSFFLYSDLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
351   SLSPG    (SEQ ID NO: 88)
```

[1239] 前导序列和接头加下划线。为了用上述SEQ ID NO:396和398的ActRIIB-Fc融合多肽指导异二聚体形成，可以将两个氨基酸取代(用天冬氨酸置换赖氨酸)引入ALK4-Fc融合多肽的Fc结构域中，如上文由双下划线所指示。SEQ ID NO:88的氨基酸序列可以任选地提供为在C末端添加赖氨酸(K)。

[1240] 该ALK4-Fc融合蛋白由以下核酸(SEQ ID NO:243)编码：

[1241]

```
  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 GTACACCCTG CCCCCATCCC GGGAGGAGAT
801   GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA
851   GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC
901   GACACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTATAG
951   CGACCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT
1001  GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
1051  TCCCTGTCTC CGGGT    (SEQ ID NO: 243)
```

[1242] 成熟ALK4-Fc融合蛋白序列(SEQ ID NO:89)如下并且可以任选地在C末端添加赖氨酸(K)。

[1243]
```
  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: 89)
```

[1244] SEQ ID NO:398和SEQ ID NO:89的ActRIIB-Fc和ALK4-Fc蛋白分别可以从CHO细胞系共表达并纯化,以产生包含ActRIIB-Fc:ALK4-Fc的异聚复合物。

[1245] 在使用不对称Fc融合蛋白促进异多聚体复合物形成的另一种方法中,Fc结构域发生改变以引入互补疏水相互作用和另一个分子间二硫键,分别如SEQ ID NO:402和403以及SEQ ID No:92和93的ActRIIB-Fc和ALK4-Fc多肽序列中所说明。ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽各自采用组织纤溶酶原激活物(TPA)前导序列:MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP(SEQ ID NO:8)。

[1246] ActRIIB-Fc多肽序列(SEQ ID NO:402)如下所示:

[1247]
```
  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 NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351   EALHNHYTQK SLSLSPGK      (SEQ ID NO: 402)
```

[1248] 前导序列(信号)序列和接头加下划线。为了促进ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异二聚体而不是可能的同二聚复合物中任一种的形成,可以将两个氨基酸取代(用半胱氨酸替代丝氨酸和用色氨酸替代苏氨酸)引入融合蛋白的Fc结构域中,如上文由双下划线所指示。SEQ ID NO:402的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸(K)。

[1249] 成熟ActRIIB-Fc融合多肽如下:

[1250]
```
  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: 403)
```

[1251] ALK4-Fc融合多肽的互补形式(SEQ ID NO:92)如下并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸(K)。

[1252]

```
  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 KVSNKALPAP IEKTISKAKG
251  QPREPQVCTL PPSREEMTKN QVSLSCAVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY
301  KTTPPVLDSD GSFFLVSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
351  SLSPGK  (SEQ ID NO: 92)
```

[1253] 前导序列和接头加下划线。为了用上述SEQ ID NO:402和403的ActRIIB-Fc融合多肽指导异二聚体形成，可以将四个氨基酸取代引入ALK4融合多肽的Fc结构域中，如上文由双下划线所指示。SEQ ID NO:92的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸(K)。

[1254] 成熟ALK4-Fc融合蛋白序列如下并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸(K)。

[1255]

```
  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 DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LVSKLTVDKS
301  RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK  (SEQ ID NO: 93)
```

[1256] SEQ ID NO:403和SEQ ID NO:93的ActRIIB-Fc和ALK4-Fc蛋白分别可以从CHO细胞系共表达并纯化，以产生包含ActRIIB-Fc:ALK4-Fc的异聚复合物。

[1257] 各种ActRIIB-Fc:ALK4-Fc复合物的纯化可以通过一系列柱色谱步骤实现，所述步骤包括例如以下中按任何顺序的三种或更多种：蛋白A色谱、Q琼脂糖色谱、苯基琼脂糖色谱、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。所述纯化可以通过病毒过滤和缓冲液交换来完成。

[1258] 在使用不对称Fc融合蛋白促进异多聚体复合物形成的另一种方法中，Fc结构域发生改变以引入互补疏水相互作用、另一个分子间二硫键和两个Fc结构域之间的静电差异，以促进基于净分子电荷的纯化，如分别在SEQ ID NO:118-121和122-125的ActRIIB-Fc和ALK4-Fc多肽序列中所说明。ActRIIB-Fc融合多肽和ALK4-Fc融合多肽各自采用组织纤溶酶原激活物(TPA)前导序列)。

[1259] ActRIIB-Fc多肽序列(SEQ ID NO:406)如下所示：

[1260]

```
  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 NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351 EALHNHYTQD SLSLSPG  (SEQ ID NO: 406)
```

[1261] 前导序列和接头加下划线。为了促进ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异二聚体而不是可能的同二聚复合物中任一种的形成，可以将两个氨基酸取代(用半胱氨酸替代丝氨酸和用色氨酸替代苏氨酸)引入融合蛋白的Fc结构域中，如上文由双下划线所指示。为了促进ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异二聚体的纯化，还可以将两个氨基酸取代(用酸性氨基酸替代赖氨酸)引入融合蛋白的Fc结构域中，如上文由双下划线所指示。SEQ ID NO:118的氨基酸序列

可以任选地提供有在C末端添加的赖氨酸。

[1262] 该ActRIIB-Fc融合蛋白由以下核酸(SEQ ID NO:407)编码：

[1263]
```
   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 TCCCCCCAAA
 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
```

[1264]
```
 801  ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATGCCGGGA 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: 407)
```

[1265] 成熟ActRIIB-Fc融合多肽如下(SEQ ID NO:408)，并且可以任选地提供为在C末端添加赖氨酸。

[1266]
```
   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 HYTQDSLSLS PG
      (SEQ ID NO: 408)
```

[1267] 这种ActRIIB-Fc融合多肽是由以下核酸(SEQ ID NO:409)编码：

[1268]

```
   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  TGGAACTCAC ACATGCCCAC CGTGCCCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAC
 401  CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CCAAAACCCA 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 TGACCGAGAA CCAGGTCAGC CTGTGGTGCC TGGTCAAAGG
 801  CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG
 851  AGAACAACTA CAAGACCACG CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC
 901  TTCCTCTATA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA
 951  CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC CACTACACGC
1001  AGGACAGCCT CTCCCTGTCT CCGGGT    (SEQ ID NO: 409)
```

[1269] ALK4-Fc融合多肽的互补形式(SEQ ID NO:247)如下并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1270]

```
   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 KVSNKALPAP IEKTISKAKG
 251  QPREPQVCTL PPSREEMTKN QVSLSCAVKG FYPSDIAVEW ESRGQPENNY
 301  KTTPPVLDSR GSFFLVSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
 351  SLSPGK    (SEQ ID NO: 247)
```

[1271] 前导序列和接头加下划线。为了用上述SEQ ID NO:406和408的ActRIIB-Fc融合多肽指导异二聚体形成,可以将四个氨基酸取代(用半胱氨酸置换酪氨酸,用丝氨酸置换苏氨酸,用丙氨酸置换亮氨酸,并用缬氨酸置换酪氨酸)引入ALK4融合多肽的Fc结构域中,如上文由双下划线所指示。为了促进ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异二聚体的纯化,还可以将两个氨基酸取代(用精氨酸替代天冬酰胺和用精氨酸替代天冬氨酸)引入ALK4-Fc融合多肽的Fc结构域中,如上文由双下划线所指示。SEQ ID NO:247的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1272] 该ALK4-Fc融合多肽由以下核酸(SEQ ID NO:248)编码:

[1273]

```
   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 TGTCCTGCGC CGTCAAAGGC TTCTATCCCA
 851  GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCCGCG GGCAGCCGGA GAACAACTAC
 901  AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCCGC GGCTCCTTCT TCCTCGTGAG
 951  CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT
1001  GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
1051  TCCCTGTCTC CGGGTAAA    (SEQ ID NO: 248)
```

[1274] 成熟ALK4-Fc融合多肽序列如下(SEQ ID NO:249)并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1275]

```
   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: 249)
```

[1276] 该ALK4-Fc融合多肽由以下核酸(SEQ ID NO:250)编码：

[1277]

```
   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 ACACTGACTA CTGCAACAGG ATCGACTTGA
 251  GGGTGCCCAG TGGTCACCTC AAGGAGCCTG AGCACCCGTC CATGTGGGGC
 301  CCGGTGGAGA CCGGTGGTGG AACTCACACA TGCCCACCGT GCCCAGCACC
 351  TGAACTCCTG GGGGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCCCCCCA 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
```

[1278]
```
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 GGTAAA
```
(SEQ ID NO: 250)

[1279] SEQ ID NO:120和SEQ ID NO:249的ActRIIB-Fc和ALK4-Fc蛋白分别可以在CHO细胞系中共表达并从中纯化,以产生包含ALK4-Fc:ActRIIB-Fc的异聚复合物。

[1280] 在某些实施方案中,所述ALK4-Fc融合多肽是SEQ ID NO:92(以上所示),其含有四个氨基酸取代以指导本文公开的某些Fc融合多肽的异二聚体形成,并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1281] 该ALK4-Fc融合多肽由以下核酸(SEQ ID NO:251)编码:

[1282]
```
  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 TGTCCTGCGC CGTCAAAGGC TTCTATCCCA
851  GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC
901  AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCGTGAG
951  CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT
1001 GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
1051 TCCCTGTCTC CGGGTAAA
```
(SEQ ID NO: 251)

[1283] 成熟ALK4-Fc融合多肽序列是SEQ ID NO:93(上文显示),并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1284] 该ALK4-Fc融合多肽由以下核酸(SEQ ID NO:252)编码:

[1285]

```
   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 ACACTGACTA CTGCAACAGG ATCGACTTGA
 251  GGGTGCCCAG TGGTCACCTC AAGGAGCCTG AGCACCCGTC CATGTGGGGC
 301  CCGGTGGAGA CCGGTGGTGG AACTCACACA TGCCCACCGT GCCCAGCACC
 351  TGAACTCCTG GGGGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCCCCCCA 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
```

[1286]

```
 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 GGTAAA
```

(SEQ ID NO: 252)

[1287] 可以通过一系列柱色谱步骤实现各种ActRIIB-Fc:ALK4-Fc复合物的纯化，包括例如以下中按任何顺序的三种或更多种：蛋白质A色谱、Q琼脂糖色谱、苯基琼脂糖色谱、尺寸排阻色谱、阳离子交换色谱、基于表位的亲和色谱(例如，采用针对ALK4或ActRIIB上的表位的抗体或功能等效配体)和多元色谱(例如，采用含有静电配体和疏水性配体的树脂)。所述纯化可以通过病毒过滤和缓冲液交换来完成。

[1288] 实施例13.与ActRIIB-Fc同二聚体和ALK4-Fc同二聚体相比，ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异二聚体的配体结合概况

[1289] 使用基于Biacore™的结合测定来比较上文所述的ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异二聚复合物的配体结合选择性与ActRIIB-Fc和ALK4-Fc同二聚体复合物的配体结合选择性。使用抗Fc抗体将ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异二聚体、ActRIIB-Fc同二聚体和ALK4-Fc同二聚体独立地捕获至系统上。注射配体并使其流过所捕获的受体蛋白。结果归纳于下表中，其中最指示有效配体阱的配体解离速率(k_d)由灰色阴影指示。

[1290]

与ActRIIB-Fc同二聚体和ALK4-Fc同二聚体相比，ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异二聚体的配体结合概况

配体	ActRIIB-Fc 同二聚体			ALK4-Fc 同二聚体			ActRIIB-Fc:ALK4-Fc 异二聚体		
	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)
激活素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
激活素B	5.1×10^6	1.0×10^{-4}	20	无结合			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	---			短暂*		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

* 由于相互作用的短暂性而不确定
† 极低的信号
--- 未测试

[1291] 这些比较性结合数据证实，相对于ActRIIB-Fc或ALK4-Fc同二聚体，ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异二聚体具有改变的结合概况/选择性。ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异二聚体展示与任一种同二聚体相比增强的与激活素B的结合，保留如用ActRIIB-Fc同二聚体所观察到的与激活素A、GDF8和GDF11的强结合，并且展现显著降低的与BMP9、BMP10和GDF3的结合。特定地，BMP9展示低或无的对ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异二聚体的可观察亲和力，而该配体与ActRIIB-Fc同二聚体强结合。像ActRIIB-Fc同二聚体一样，所述异二聚体保留与BMP6的中等水平结合。参见图19。

[1292] 另外，使用A-204报告基因测定来评价ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异二聚体和ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体对通过激活素A、激活素B、GDF11、GDF8、BMP10和BMP9的信号传导的影响。细胞系：人横纹肌肉瘤(源自肌肉)。报告载体：pGL3(CAGA)12(如Dennler等人，1998，EMBO 17:3091-3100中所述)。CAGA12基序存在于TGFβ反应性基因(PAI-1基因)中，因此这种载体通常用于通过Smad2和3进行的因子信号传导。以下概述了示例性A-204报告基因测定。

[1293] 第1天：将A-204细胞分离至48孔板中。

[1294] 第2天：用10ug pGL3(CAGA)12或pGL3(CAGA)12(10ug)+pRLCMV(1ug)和Fugene转染A-204细胞。

[1295] 第3天：添加因子(稀释至培养基+0.1％ BSA中)。在添加至细胞之前，抑制剂需要与因子一起预孵育约一小时。约六小时后，用PBS冲洗细胞，然后裂解。

[1296] 在上述步骤后，进行萤光素酶测定。

[1297] 在此测定中确定，ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异二聚体和ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体二者都是激活素A、激活素B、GDF11和GDF8的强效抑制剂。特定地，如在图20中所示的比较性同二聚体/异二聚体IC_{50}数据中可见，ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异二聚体与ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体类似地抑制激活素A、激活素B、GDF8和GDF11信号传导途径。然而，对

BMP9和BMP10信号传导途径的ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异二聚体抑制与ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体相比显著降低。此数据与上文讨论的结合数据一致，其中观察到ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异二聚体和ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体二者都展示与激活素A、激活素B、GDF8和GDF11的强结合，但是与ActRIIB-Fc:ActRIIB-Fc同二聚体相比，BMP10和BMP9具有显著降低的对ALK4-Fc:ActRIIB-Fc异二聚体的亲和力。

[1298] 总之，这些数据因此证实，与ActRIIB-Fc同二聚体相比，ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异二聚体是激活素A、激活素B、GDF8和GDF11的更具选择性的拮抗剂。因此，在这样的选择性拮抗作用有利的某些应用中，ActRIIB-Fc:ALK4-Fc异二聚体将比ActRIIB-Fc同二聚体更有用。例子包括需要保留激活素A、激活素B、激活素AC、GDF8和GDF11中的一种或多种的拮抗性而使BMP9、BMP10、GDF3和BMP6中的一种或多种的拮抗性降至最低的治疗应用。

[1299] 实施例14.ActRIIB-Fc:ALK7-Fc异二聚体的生成

[1300] 申请人构建可溶ActRIIB-Fc:ALK7-Fc异聚复合物，其包含人ActRIIB和人ALK7的细胞外结构域，所述细胞外结构域各自以定位于细胞外结构域与Fc结构域之间的接头与Fc结构域融合。单独构建体分别被称为ActRIIB-Fc和ALK7-Fc。

[1301] 与ActRIIB-Fc或ALK7-Fc同二聚复合物相反，用于促进ActRIIB-Fc:ALK7-Fc异聚复合物形成的方法是引入Fc结构域的氨基酸序列中的改变以指导不对称异聚复合物的形成。使用Fc结构域制备不对称相互作用对的许多不同方法描述于本公开文本中。

[1302] 在一种方法中，分别在下文公开的ActRIIB-Fc和ALK7-Fc多肽序列中说明，改变一个Fc结构域以在相互作用面处引入阳离子氨基酸，同时改变另一个Fc结构域以在相互作用面处引入阴离子氨基酸。ActRIIB-Fc融合多肽和ALK7-Fc融合多肽各自采用组织纤溶酶原激活物(TPA)前导序列:MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP(SEQ ID NO:8)。

[1303] ActRIIB-Fc多肽序列(SEQ ID NO:396)如下所示：

[1304]
```
  1  MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGASGRGEA ETRECIYYNA NWELERTNQS
 51  GLERCEGEQD KRLHCYASWR NSSGTIELVK KGCWLDDFNC YDRQECVATE
101  ENPQVYFCCC EGNFCNERFT HLPEAGGPEV TYEPPPTAPT GGGTHTCPPC
```

[1305]
```
151  PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
201  DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
251  APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRKEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
301  EWESNGQPEN NYKTTPPVLK SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
351  EALHNHYTQK SLSLSPGK    (SEQ ID NO: 396)
```

[1306] 前导序列(信号)序列和接头加下划线。为了促进ActRIIB-Fc:ALK7-Fc异二聚体而不是可能的同二聚复合物中任一种的形成，可以将两个氨基酸取代(用赖氨酸替代酸性氨基酸)引入ActRIIB融合蛋白的Fc结构域中，如上文由双下划线所指示。SEQ ID NO:396的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸(K)。

[1307] 该ActRIIB-Fc融合蛋白由以下核酸序列(SEQ ID NO:397)编码：

```
   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 TCCCCCCAAA
 501  ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
[1308] 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: 397)
```

[1309] 成熟ActRIIB-Fc融合多肽(SEQ ID NO:398)如下,并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

```
   1  GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
  51  IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
 101  GGPEVTYEPP PTAPTGGGTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
 151  RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
[1310] 201  VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
 251  RKEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLKSDGSF
 301  FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
      (SEQ ID NO: 398)
```

[1311] ALK7-Fc融合蛋白的互补形式(SEQ ID NO:129)如下:

```
   1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAGLKCVC LLCDSSNFTC QTEGACWASV
  51 MLTNGKEQVI KSCVSLPELN AQVFCHSSNN VTKTECCFTD FCNNITLHLP
 101 TASPNAPKLG PMETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR
[1312] 151 TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
 201 LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR
 251 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYDTTP PVLDSDGSFF
 301 LYSDLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G
```

[1313] (SEQ ID NO: 129)

[1314] 信号序列和接头序列加下划线。为了促进ActRIIB-Fc:ALK7-Fc异二聚体而不是可能的同二聚复合物中任一种的形成,可以将两个氨基酸取代(用天冬氨酸替代赖氨酸)引入融合蛋白的Fc结构域中,如上文由双下划线所指示。SEQ ID NO:129的氨基酸序列可以任选地提供有在C末端添加的赖氨酸。

[1315] 该ALK7-Fc融合蛋白由以下核酸(SEQ ID NO:255)编码:

[1316]

```
   1  ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
  51  AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGGACTGAA GTGTGTATGT CTTTTGTGTG
 101  ATTCTTCAAA CTTTACCTGC CAAACAGAAG GAGCATGTTG GGCATCAGTC
 151  ATGCTAACCA ATGGAAAAGA GCAGGTGATC AAATCCTGTG TCTCCCTTCC
 201  AGAACTGAAT GCTCAAGTCT TCTGTCATAG TTCCAACAAT GTTACCAAAA
 251  CCGAATGCTG CTTCACAGAT TTTTGCAACA ACATAACACT GCACCTTCCA
 301  ACAGCATCAC CAAATGCCCC AAAACTTGGA CCCATGGAGA CCGGTGGTGG
 351  AACTCACACA TGCCCACCGT GCCCAGCACC TGAACTCCTG GGGGGACCGT
 401  CAGTCTTCCT CTTCCCCCCA AAACCCAAGG ACACCCTCAT GATCTCCCGG
 451  ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC GTGAGCCACG AAGACCCTGA
 501  GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT AATGCCAAGA
 551  CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTCAGCGTC
 601  CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA
 651  GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG
 701  CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGG
 751  GAGGAGATGA CCAAGAACCA GGTCAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT
 801  CTATCCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA
 851  ACAACTACGA CACCACGCCT CCCGTGCTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC
 901  CTCTATAGCG ACCTCACCGT GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT
 951  CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA
1001  AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG GGT    (SEQ ID NO: 255)
```

[1317] 预期成熟ALK7-Fc融合蛋白序列(SEQ ID NO:130)如下并且可以任选地提供有在C末端添加的赖氨酸。

[1318]

```
   1  GLKCVCLLCD SSNFTCQTEG ACWASVMLTN GKEQVIKSCV SLPELNAQVF
  51  CHSSNNVTKT ECCFTDFCNN ITLHLPTASP NAPKLGPMET GGGTHTCPPC
 101  PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
 151  DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
 201  APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
 251  EWESNGQPEN NYDTTPPVLD SDGSFFLYSD LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
 301  EALHNHYTQK SLSLSPG    (SEQ ID NO: 130)
```

[1319] SEQ ID NO:396和SEQ ID NO:129的ActRIIB-Fc和ALK7-Fc融合蛋白分别可以从CHO细胞系共表达并纯化,以产生包含ActRIIB-Fc:ALK7-Fc的异聚复合物。

[1320] 在使用不对称Fc融合蛋白促进异多聚体复合物形成的另一种方法中,改变Fc结构域以引入互补疏水相互作用和另外的分子间二硫键,如下文公开的ActRIIB-Fc和ALK7-Fc多肽序列中所说明。

[1321] ActRIIB-Fc多肽序列(SEQ ID NO:402)如下所示:

[1322]

```
   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 NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
 351  EALHNHYTQK SLSLSPGK    (SEQ ID NO: 402)
```

[1323] 前导序列和接头加下划线。为了促进ActRIIB-Fc:ALK7-Fc异二聚体而不是可能的同二聚复合物中任一种的形成,可以将两个氨基酸取代(用半胱氨酸替代丝氨酸和用色氨酸替代苏氨酸)引入融合蛋白的Fc结构域中,如上文由双下划线所指示。SEQ ID NO:402的

氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1324] 成熟ActRIIB-Fc融合多肽(SEQ ID NO:403)如下并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1325]
```
  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: 403)

[1326] ALK7-Fc融合多肽的互补形式(SEQ ID NO:133)如下：

[1327]
```
  1  MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAGLKCVC LLCDSSNFTC QTEGACWASV
 51  MLTNGKEQVI KSCVSLPELN AQVFCHSSNN VTKTECCFTD FCNNITLHLP
101  TASPNAPKLG PMETGGGTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR
151  TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
201  LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVCTLPPSR
251  EEMTKNQVSL SCAVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF
301  LVSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
```
(SEQ ID NO: 133)

[1328] 前导序列和接头序列加下划线。为了指导与上文SEQ ID NO 130和403的ActRIIB-Fc融合多肽的异二聚体形成，可以将四个氨基酸取代引入ALK7融合多肽的Fc结构域中，如上文由双下划线所指示。SEQ ID NO:133的氨基酸序列可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1329] 预期成熟ALK7-Fc融合蛋白序列(SEQ ID NO:134)如下并且可以任选地提供为从C末端去除赖氨酸。

[1330]
```
  1  GLKCVCLLCD SSNFTCQTEG ACWASVMLTN GKEQVIKSCV SLPELNAQVF
 51  CHSSNNVTKT ECCFTDFCNN ITLHLPTASP NAPKLGPMET GGGTHTCPPC
101  PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
151  DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
201  APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSREEMT KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV
251  EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
301  EALHNHYTQK SLSLSPGK
```
(SEQ ID NO: 134)

[1331] SEQ ID NO:402和SEQ ID NO:133的ActRIIB-Fc和ALK7-Fc蛋白分别可以从CHO细胞系共表达并纯化，以产生包含ActRIIB-Fc:ALK7-Fc的异聚复合物。

[1332] 各种ActRIIB-Fc:ALK7-Fc复合物的纯化可以通过一系列柱色谱步骤实现，包括例如以下中按任何顺序的三种或更多种：蛋白A色谱、Q琼脂糖色谱、苯基琼脂糖色谱、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。所述纯化可以通过病毒过滤和缓冲液交换来完成。

[1333] 实施例15.与ActRIIB-Fc同二聚体和ALK7-Fc同二聚体相比，ActRIIB-Fc:ALK7-Fc异二聚体的配体结合概况

[1334] 使用基于Biacore™的结合测定来比较上述ActRIIB-Fc:ALK7-Fc异二聚复合物的配体结合选择性与ActRIIB-Fc和ALK7-Fc同二聚复合物的配体结合选择性。使用抗Fc抗体将ActRIIB-Fc:ALK7-Fc异二聚体、ActRIIB-Fc同二聚体和ALK7-Fc同二聚体独立地捕获至系统上。注射配体并使其流过所捕获的受体蛋白。结果归纳于下表中，其中最指示有效配体

阱的配体解离速率(k_d)由灰色阴影指示。

[1335]

与ActRIIB-Fc同二聚体和ALK7-Fc同二聚体相比，ActRIIB-Fc:ALK7-Fc异二聚体的配体结合概况

配体	ActRIIB-Fc 同二聚体			ALK7-Fc 同二聚体			ActRIIB-Fc:ALK7-Fc异二聚体		
	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)
激活素A	1.3×10^7	1.4×10^{-4}	11	无结合			4.4×10^7	1.9×10^{-3}	43
激活素B	1.5×10^7	1.6×10^{-4}	8	无结合			1.2×10^7	2.0×10^{-4}	17
激活素C	无结合			无结合			3.5×10^5	2.4×10^{-3}	6900
激活素AC	2.0×10^7	3.1×10^{-3}	160	无结合			2.6×10^6	5.7×10^{-4}	220
BMP5	2.6×10^7	7.5×10^{-2}	2900	无结合			1.5×10^5	8.5×10^{-3}	57000
BMP6	2.4×10^7	3.9×10^{-3}	160	无结合			1.2×10^6	6.3×10^{-3}	5300
BMP9	1.2×10^8	1.2×10^{-3}	10	无结合			短暂*		>1400
BMP10	5.9×10^6	1.5×10^{-4}	25	无结合			1.5×10^7	2.8×10^{-3}	190
GDF3	1.4×10^6	2.2×10^{-3}	1500	无结合			2.3×10^6	1.0×10^{-2}	4500
GDF8	3.5×10^6	2.4×10^{-4}	69	无结合			3.7×10^6	1.0×10^{-3}	270
GDF11	9.6×10^7	1.5×10^{-4}	2	无结合			9.5×10^7	7.5×10^{-4}	8

* 由于相互作用的短暂性而不确定
--- 未测试

[1336] 这些比较性结合数据证实，相对于ActRIIB-Fc同二聚体或ALK7-Fc同二聚体，ActRIIB-Fc:ALK7-Fc异二聚体具有改变的结合概况/选择性。有趣的是，具有与ActRIIB-Fc同二聚体的最强结合的五种配体中的四种(激活素A、BMP10、GDF8和GDF11)展现与ActRIIB-Fc:ALK7-Fc异二聚体的降低的结合，例外是激活素B，其保留与所述异二聚体的紧密结合。类似地，具有与ActRIIB-Fc同二聚体的中等结合的四种配体中的三种(GDF3、BMP6和特别是BMP9)展现与ActRIIB-Fc:ALK7-Fc异二聚体的降低的结合，而与激活素AC的结合增加至变为总体上与所述异二聚体的第二强的配体相互作用。最后，激活素C和BMP5意外地以中等强度结合ActRIIB-Fc:ALK7异二聚体，但是与ActRIIB-Fc同二聚体无结合(激活素C)或弱结合(BMP5)。最终结果是，ActRIIB-Fc:ALK7-Fc异二聚体的配体结合概况与不结合任何前述配体的ActRIIB-Fc同二聚体或ALK7-Fc同二聚体的配体结合概况明显不同。参见图21。

[1337] 这些结果因此证实，与ActRIIB-Fc同二聚体相比，ActRIIB-Fc:ALK7-Fc异二聚体是激活素B和激活素AC的更具选择性的拮抗剂。此外，ActRIIB-Fc:ALK7-Fc异二聚体展现与激活素C稳健结合的罕见特性。因此，在这样的选择性拮抗作用有利的某些应用中，ActRIIB-Fc:ALK7-Fc异二聚体将比ActRIIB-Fc同二聚体更有用。例子包括治疗性应用，其中期望保留激活素B或激活素AC的拮抗作用，但是降低激活素A、GDF3、GDF8、GDF11、BMP9或BMP10中的一种或多种的拮抗作用。还包括治疗性、诊断性或分析性应用，其中期望拮抗激活素C，或者基于激活素C与激活素E之间的相似性，拮抗激活素E。

[1338] 实施例16:在射血分数降低的心力衰竭(HFrEF)中,ActRIIB-Fc:ALK4-Fc对心脏保护的作用

[1339] 在HFrEF的鼠模型中检查ActRIIB-Fc:ALK4-Fc对心脏保护的作用:转基因的抗肌萎缩蛋白缺陷性小鼠模型,称为Mdx。老年Mdx小鼠呈现扩张型心肌病的典型表型(例如,HFrEF表型),包括扩张的左心室(LV),和具有相对壁减薄的LV的离心性肥大(图23A),伴随独特的LV收缩功能障碍(参见,Arbustini等人,Journal of the American College of Cardiology 2018,72(20):2485-2506;Kamdar等人,Journal of the American College of Cardiology 2016,67(21):2533-2546;Houser等人,Circulation Research 2012,111(1):131-150;以及Wasala等人,American Society of Gene&Cell Therapy 2019,28(3):845-854)。使用Mdx小鼠进行研究以评估ActRIIB-Fc:ALK4-Fc是否能够恢复重塑下心脏的形态和功能改变。

[1340] 研究10个月龄("中年Mdx")和20个月龄("老年Mdx")的二十一只Mdx雄性小鼠。包括十二只年龄匹配的野生型(WT)小鼠作为对照("中年WT"和"老年WT")。此外,使用三只3.5个月龄的WT雄性小鼠作为衰老对照,"年幼WT"。"中年Mdx"小鼠接受(i)每周两次皮下媒介物(磷酸盐缓冲盐水,PBS)持续6个月,或者(ii)每周两次皮下ActRIIB-Fc:ALK4-Fc(10mg/kg)持续6个月。所施用的媒介物或ActRIIB-Fc:ALK4-Fc的体积是相同的。"老年Mdx"小鼠接受(i)每周两次皮下媒介物(PBS)持续2个月,或者(ii)每周两次皮下ActRIIB-Fc:ALK4-Fc(10mg/kg)持续2个月。所施用的媒介物或ActRIIB-Fc:ALK4-Fc的体积是相同的。除"年幼WT"外的所有WT小鼠都接受与其相应年龄匹配的Mdx组相同的施用剂量的媒介物。

[1341] 在研究结束时,在将动物安乐死之前,当小鼠处于麻醉下时,通过经胸超声心动图显像(VisualSonics Vevo3100,30MHz传感器;Fujifilm)评估体内心脏结构和功能。具体而言,在乳头肌水平上在胸骨旁短轴观中通过M模式测量LV结构和收缩功能。获得LV壁厚度(LVWT)和LV质量(LVM)二者。测量LV舒张末径(LVEDD)和LV收缩末径(LVESD)并将其用于使用以下等式来计算缩短分数(FS):FS=100%×[(EDD-ESD)/EDD]。测量LV舒张末期容积(LVEDV)和LV收缩末期容积(LVESV)并将其用于使用以下等式来计算射血分数:EF=100%×[(EDV-ESV)/EDV]。肥大指数计算为LVM与LVESV的比率。相对壁厚度计算为LVWT与LVESD的比率。就在超声心动图显像之后,将所有小鼠安乐死,并将它们的心脏称重。收集每只小鼠的血液并通过高灵敏度ELISA测量血清心肌肌钙蛋白I表达。

[1342] 数据呈现为平均值±平均值的标准误差。进行统计学检验(单因素ANOVA和事后分析,使用用于多重比较的图基检验或皮尔逊相关),显著性水平设为$p<0.05$。特定地,*$p<0.05$,**$p<0.01$,***$p<0.001$。

[1343] 截至研究结束时,中年Mdx小鼠和老年Mdx小鼠都展示扩张型心肌病的特有特征,如LV室扩张和收缩功能障碍。这些心脏形态(图23)和功能(图24)缺陷通过使用短期(例如,2个月施用,在老年Mdx小鼠中)或长期(例如,6个月施用,在中年Mdx小鼠中)给药方案的ActRIIB-Fc:ALK4-Fc治疗完全恢复。

[1344] 特定地,与年幼WT小鼠相比,中年Mdx-媒介物和老年Mdx-媒介物小鼠在心缩期结束时呈现左心室容积增加(图23B),意味着从LV射出至主动脉或身体其余部分的血液更少。引人注意地,分别与中年Mdx-媒介物和老年Mdx-媒介物组相比,中年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc小鼠和老年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc小鼠二者中的LVESV都显著降低,表明

ActRIIB-Fc:ALK4-Fc改进LV收缩性。

[1345] 观察到中年Mdx-媒介物和老年Mdx-媒介物小鼠二者的LV重塑经历离心性肥大,且与年幼WT小鼠相比,质容比(即,肥大指数,图23C)降低。通过ActRIIB-Fc:ALK4-Fc治疗将肥大指数正常化。

[1346] 伴随LV扩张和离心性肥大,与年幼WT小鼠相比,中年Mdx-媒介物和老年Mdx-媒介物小鼠的LV壁厚度有所降低,示于图23D中,而ActRIIB-Fc:ALK4-Fc治疗在中年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc小鼠和老年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc小鼠二者中增加相对LV壁厚度。

[1347] 扩张性肥大的LV与相对减薄的心壁一起还诱导肥大的心脏,如图23E中所示。与年幼WT小鼠相比,老年Mdx-媒介物小鼠的归一化全心重量显著增加。如在老年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc小鼠中所证实,ActRIIB-Fc:ALK4-Fc治疗减小心脏重量。

[1348] 在心脏重塑下的这些结构性改变确保了心脏功能改变。中年Mdx-媒介物小鼠和老年Mdx-媒介物小鼠二者都展示收缩性受损,如通过与年幼WT小鼠相比,射血分数降低(图24A)和缩短分数(图24B)所证实。引人注意地,在中年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc小鼠和老年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc小鼠二者中,ActRIIB-Fc:ALK4-Fc治疗完全恢复收缩功能。另外,与年幼WT小鼠相比,在中年Mdx-媒介物小鼠中以更高水平发现升高的血清心肌肌钙蛋白I(即,cTnI,一种心脏损伤的血清生物标记物)水平。ActRIIB-Fc:ALK4-Fc治疗显著降低血清cTnI表达(参见中年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc小鼠和老年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc,图24C)。此外,发现射血分数与cTnI之间呈反相关,如在图24D中所见,表明通过ActRIIB-Fc:ALK4-Fc改进的LV收缩性可能由于拯救心肌损伤所致。

[1349] 总之,这些数据表明,在HFrEF的鼠模型(Mdx模型)中,ActRIIB-Fc:ALK4-Fc有效改善左心重塑期间的各种形态和功能缺陷。特定地,与未治疗组相比,LV收缩末径在ActRIIB-Fc:ALK4-Fc治疗的小鼠中显著减小,表明ActRIIB-Fc:ALK4-Fc改进LV收缩性。数据进一步表明,除了ActRIIB:ALK4异多聚体外,其他ActRII-ALK4拮抗剂可以用于治疗心力衰竭。

[1350] 通过引用并入

[1351] 本文提及的所有出版物和专利都是通过引用以其整体特此并入,如同将每个单独的出版物或专利明确地且单独地指示为通过引用并入一般。

[1352] 虽然已经讨论了主题的特定实施方案,但是上述说明书是说明性的而不是限制性的。在回顾本说明书和以下权利要求书后,许多变化对于本领域技术人员将变得显而易见。本发明的全部范围应通过参考权利要求书和其等效物的全部范围以及说明书和此类变化来确定。

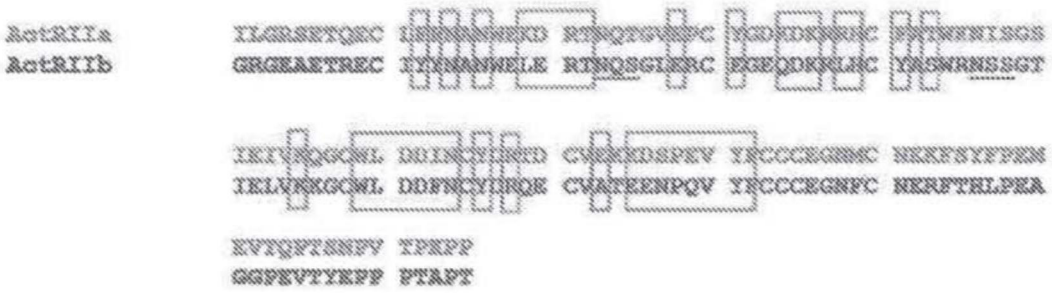


图1

```
  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
```

图2

```
GRGEAETREC IYYNANWELE RTNQSGLERC EGEQDKRLHC YASWRNSSGT
IELVKKGCWL DDFNCYDRQE CVATEENPQV YFCCCEGNFC NERFTHLPEA
GGPEVTYEPP PTAPT
```

图3

ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGCGCCGGCTCTGGG

CGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCAACTGGGAGCTGGAGCGC

ACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTAC

GCCTCCTGGCGCAACAGCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGAT

GACTTCAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTAC

TTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAACGCTTCACTCATTTGCCAGAGGCTGGG

GGCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGACAGCCCCCACCCTGCTCACGGTGCTGGCC

TACTCACTGCTGCCCATCGGGGGCCTTTCCCTCATCGTCCTGCTGGCCTTTTGGATGTAC

CGGCATCGCAAGCCCCCCTACGGTCATGTGGACATCCATGAGGACCCTGGGCCTCCACCA

CCATCCCCTCTGGTGGGCCTGAAGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAAGGCTCGGGGGCGC

TTTGGCTGTGTCTGGAAGGCCCAGCTCATGAATGACTTTGTAGCTGTCAAGATCTTCCCA

CTCCAGGACAAGCAGTCGTGGCAGAGTGAACGGGAGATCTTCAGCACACCTGGCATGAAG

CACGAGAACCTGCTACAGTTCATTGCTGCCGAGAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAG

CTGTGGCTCATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCCTCACGGATTACCTCAAGGGGAAC

ATCATCACATGGAACGAACTGTGTCATGTAGCAGAGACGATGTCACGAGGCCTCTCATAC

CTGCATGAGGATGTGCCCTGGTGCCGTGGCGAGGGCCACAAGCCGTCTATTGCCCACAGG

GACTTTAAAAGTAAGAATGTATTGCTGAAGAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCTGACTTT

GGCTTGGCTGTTCGATTTGAGCCAGGGAAACCTCCAGGGGACACCCACGGACAGGTAGGC

ACGAGACGGTACATGGCTCCTGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTTCCAGAGAGATGCC

TTCCTGCGCATTGACATGTATGCCATGGGGTTGGTGCTGTGGGAGCTTGTGTCTCGCTGC

AAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATGAGTACATGCTGCCCTTTGAGGAAGAGATTGGCCAG

CACCCTTCGTTGGAGGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTGCACAAGAAGATGAGGCCCACCATT

AAAGATCACTGGTTGAAACACCCGGGCCTGGCCCAGCTTTGTGTGACCATCGAGGAGTGC

TGGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTGTCCGCGGGCTGTGTGGAGGAGCGGGTGTCCCTG

ATTCGGAGGTCGGTCAACGGCACTACCTCGGACTGTCTCGTTTCCCTGGTGACCTCTGTC

ACCAATGTGGACCTGCCCCCTAAAGAGTCAAGCATCTAA

图4

GGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCAACTGGGAGCTGGAGCGCACCAACC

AGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGGCGAGCAGGACAAGCGGCTGCACTGCTACGCCTCCTGGCGCAACAG

CTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGAAGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACTGCTACGATAGGCAGGAG

TGTGTGGCCACTGAGGAGAACCCCCAGGTGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAGCGCT

TCACTCATTTGCCAGAGGCTGGGGGCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGACAGCCCCCACC

图5

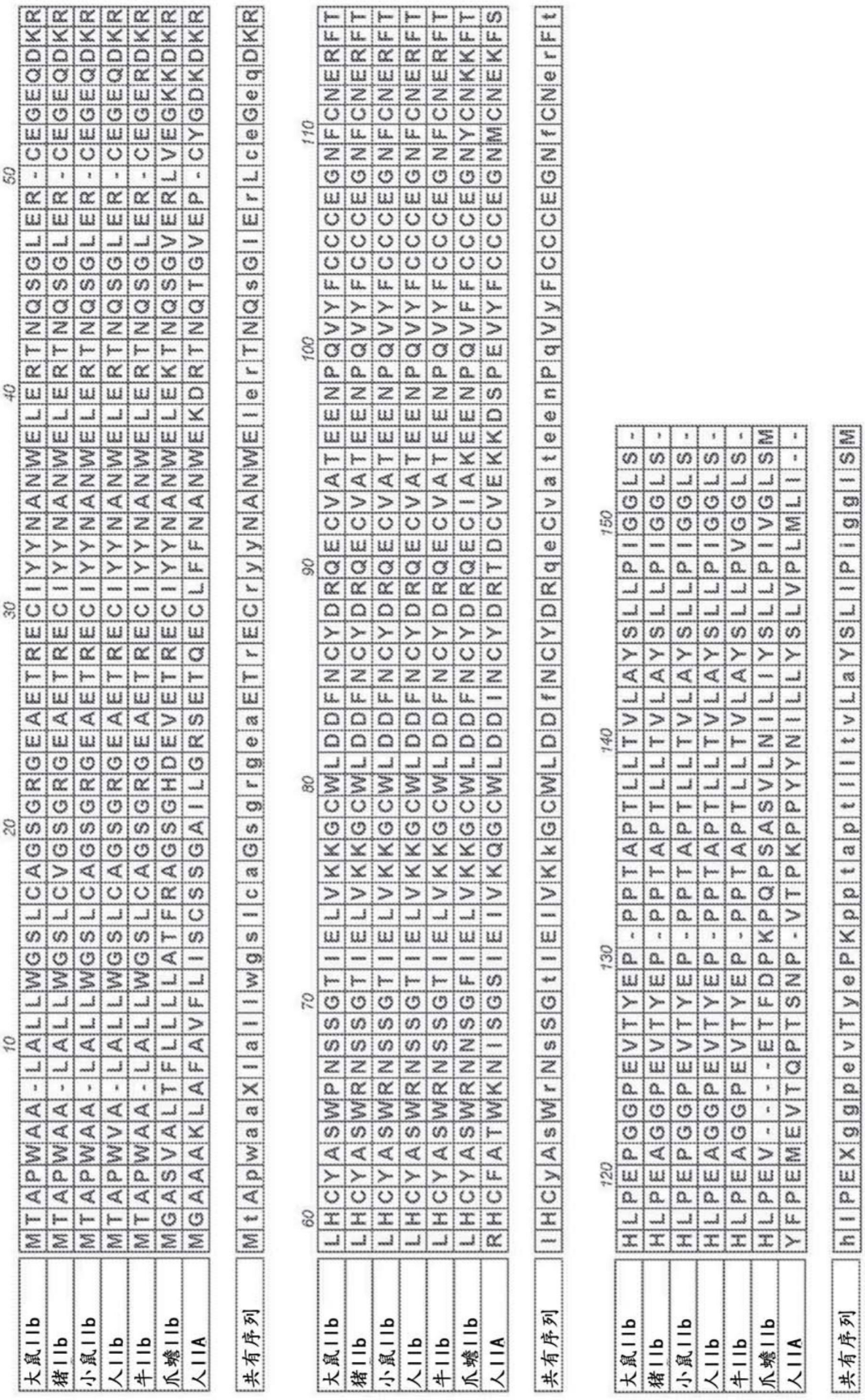


图6

IgG1 -------THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF 53
IgG4 ---ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF 57
IgG2 --------VECPPCPAPPVAG-PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF 51
IgG3 EPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF 60
IgG1 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 113
IgG4 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT 117
IgG2 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT 111
IgG3 KWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT 120
IgG1 ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP 173
IgG4 ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP 177
IgG2 ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP 171
IgG3 ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTP 180
IgG1 PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 225
IgG4 PVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK 229
IgG2 PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 223
IgG3 PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK 232

图7

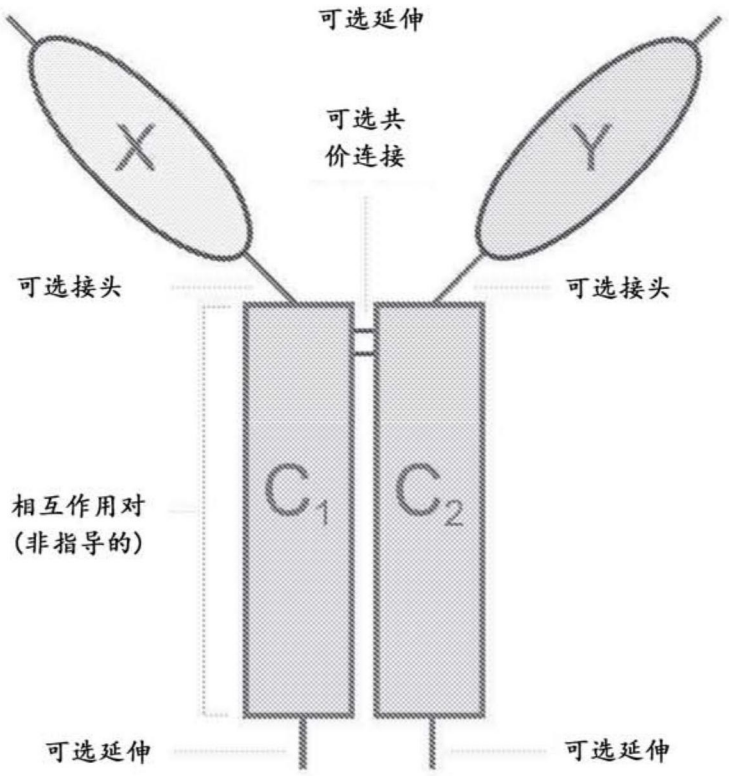

可选延伸
可选共
价连接
X
Y
可选接头
可选接头
相互作用对
(非指导的)
C1
C2
可选延伸
可选延伸

图8A

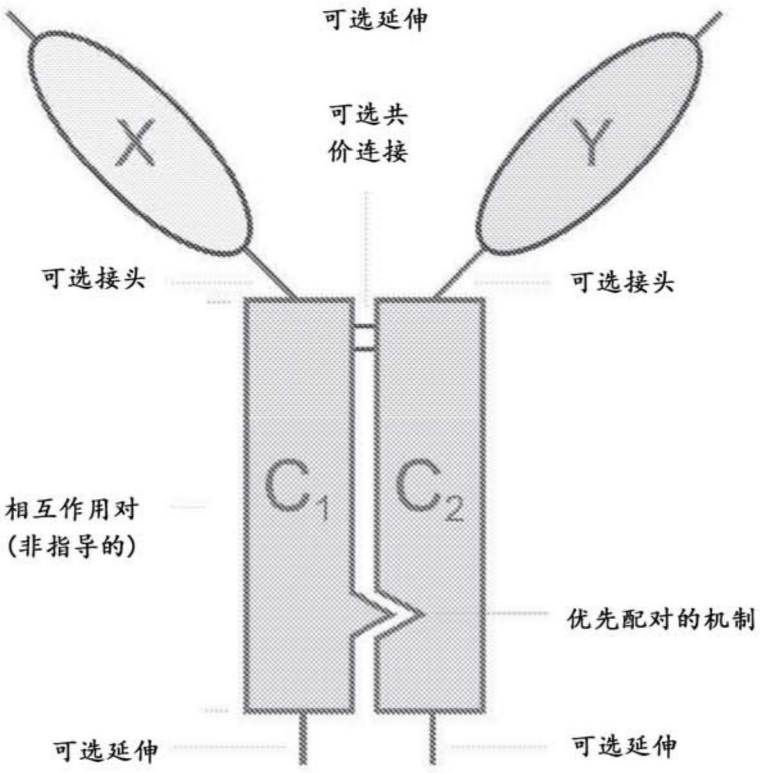

可选延伸
可选共
价连接
X
Y
可选接头
可选接头
相互作用对
(非指导的)
C1
C2
优先配对的机制
可选延伸
可选延伸

图8B

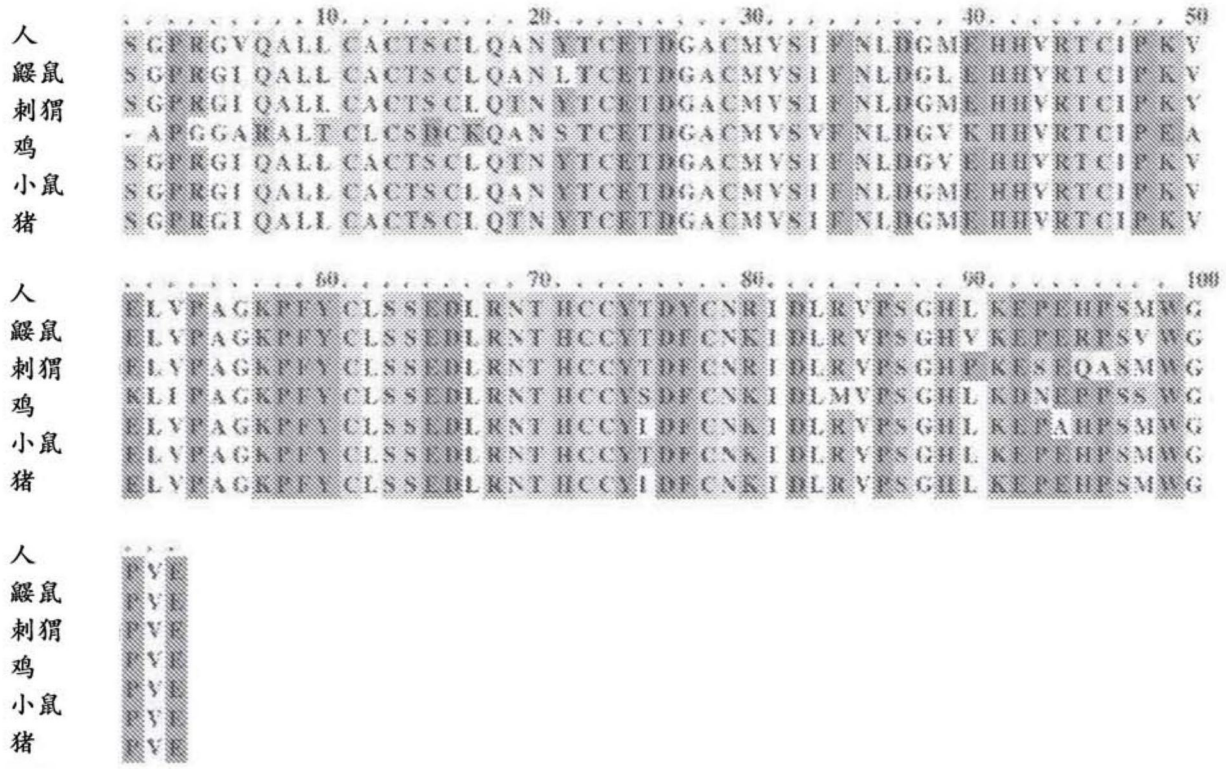


图9

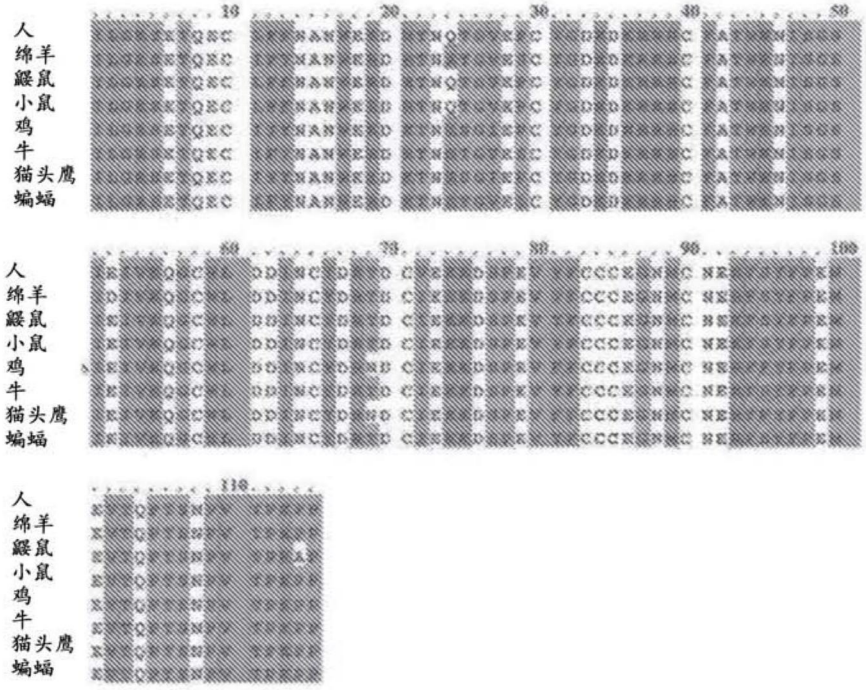


图10

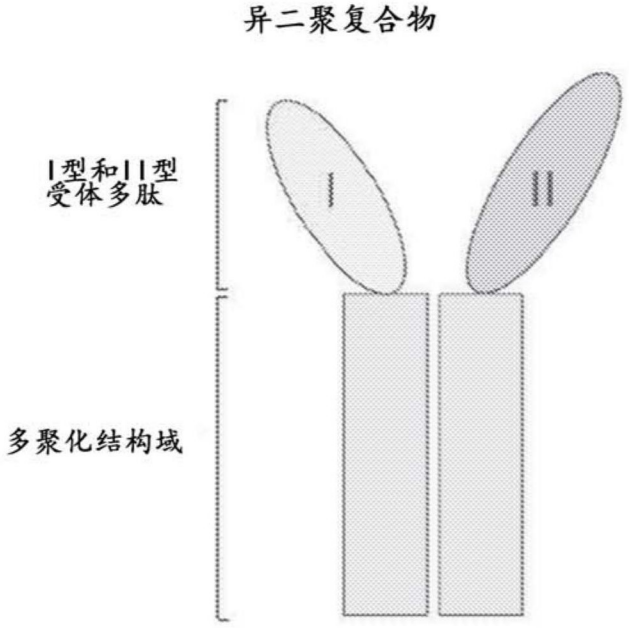


图11A

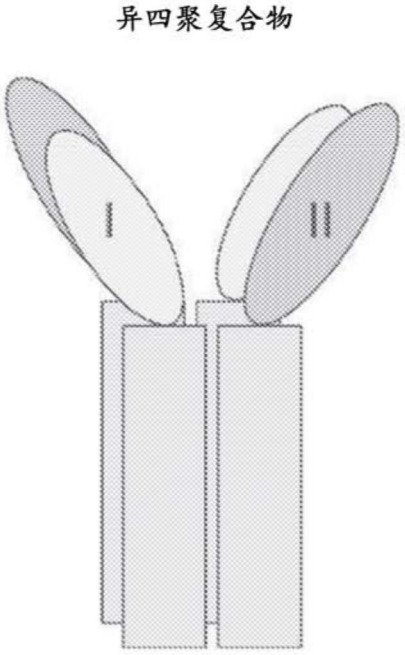


图11B

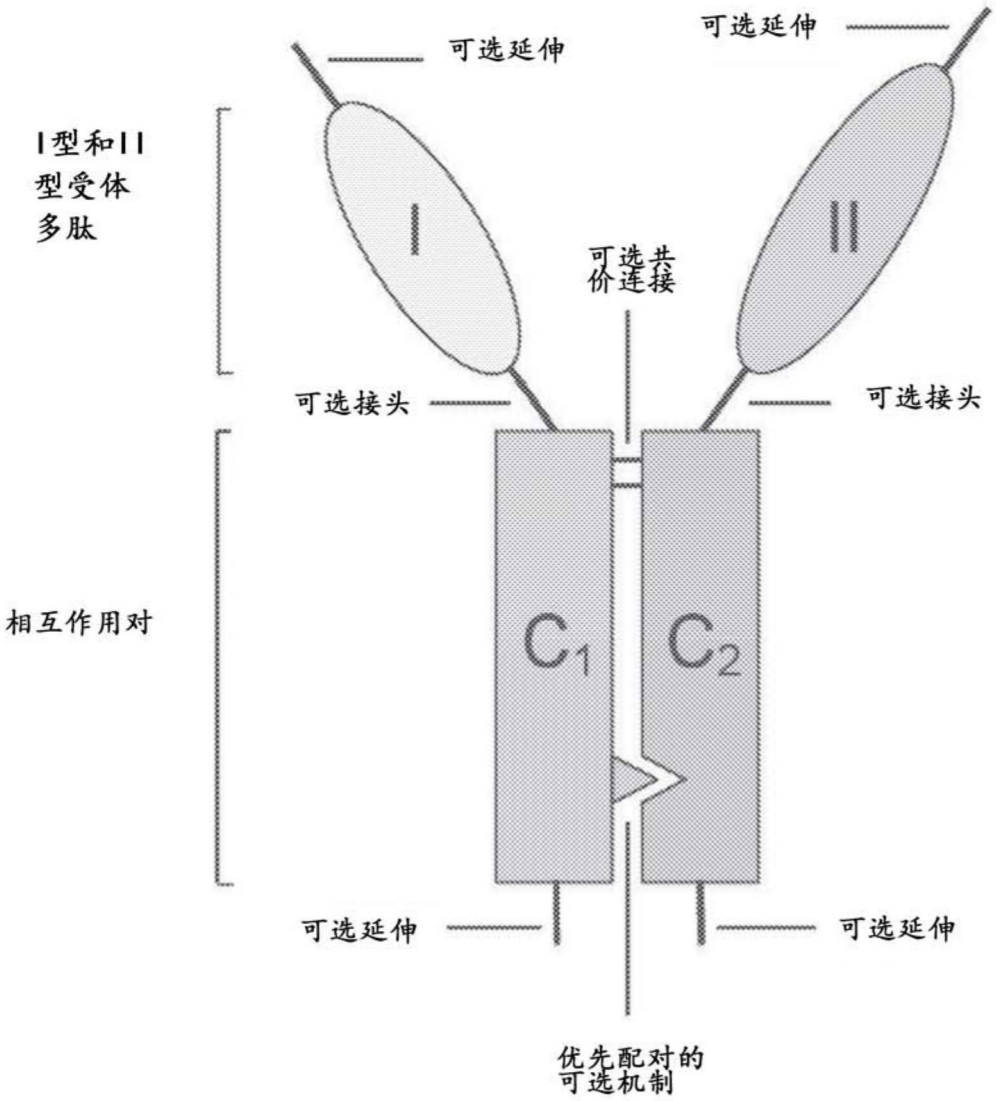

示意性异聚蛋白质复合物
可选延伸
可选延伸
I型和II型受体多肽
I
II
可选共价连接
可选接头
可选接头
相互作用对
C1
C2
可选延伸
可选延伸
优先配对的可选机制

图12

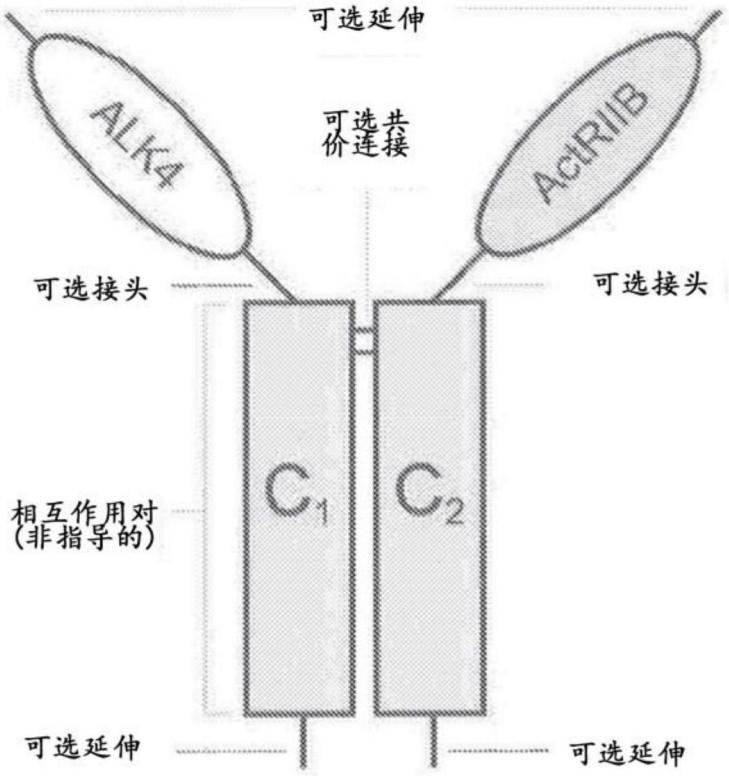

可选延伸
ALK4
可选共价连接
ActRIB
可选接头
可选接头
C1
C2
相互作用对(非指导的)
可选延伸
可选延伸

图13A

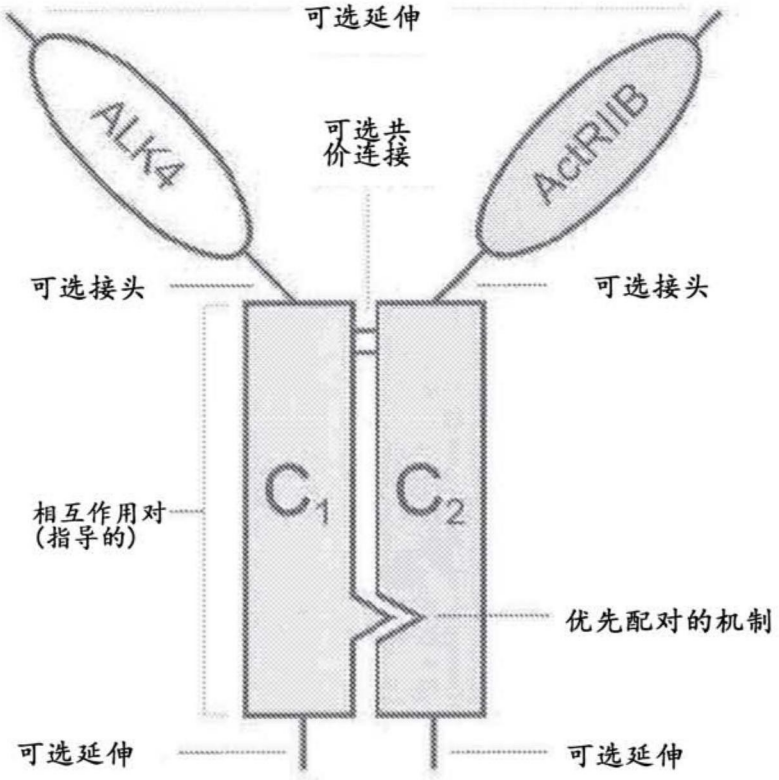

可选延伸
ALK4
可选共价连接
ActRIB
可选接头
可选接头
C1
C2
相互作用对(指导的)
优先配对的机制
可选延伸
可选延伸

图13B

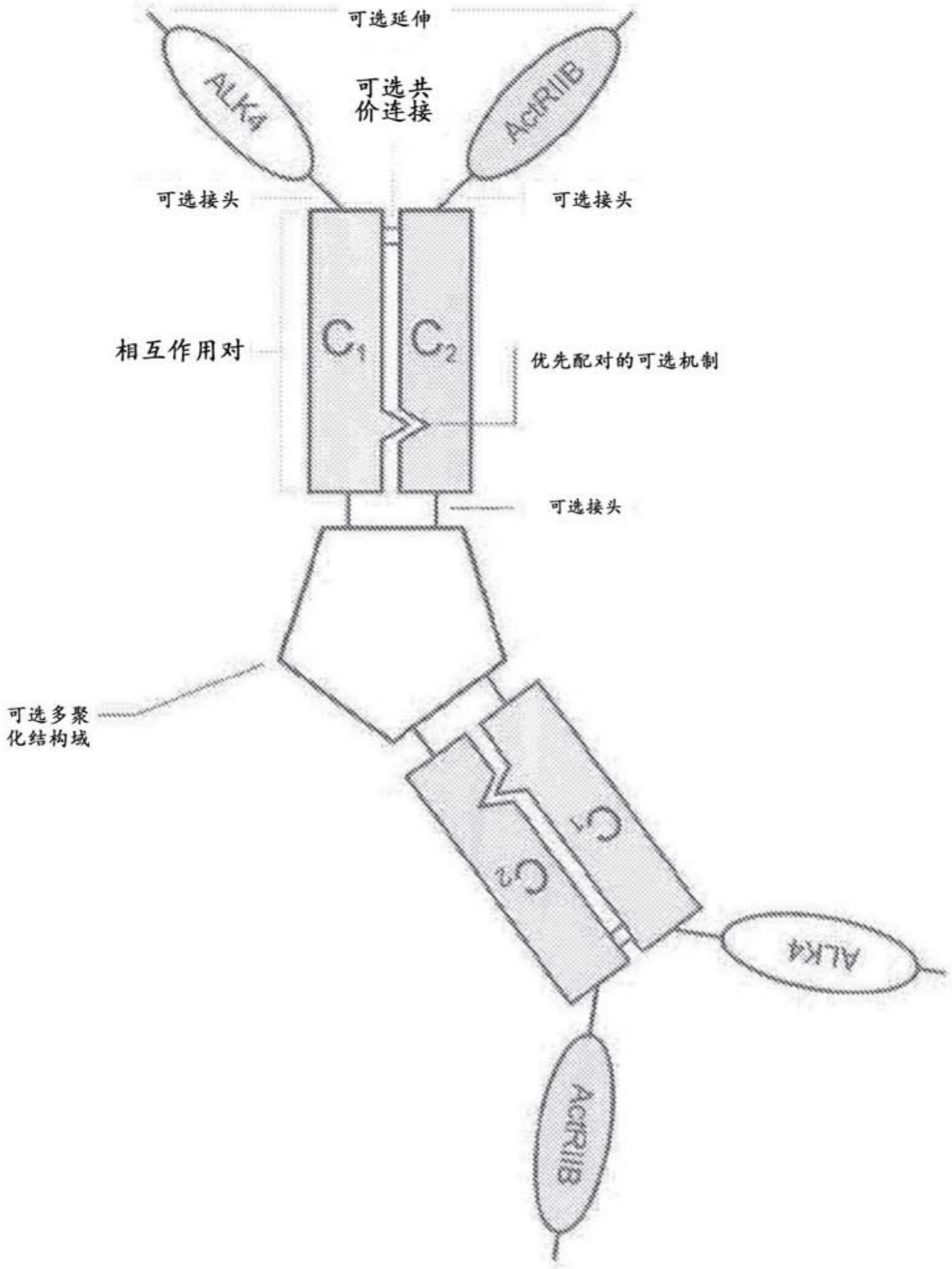

可选延伸
ALK4
可选共
价连接
ActRIIB
可选接头
可选接头
相互作用对
C1
C2
优先配对的可选机制
可选接头
可选多聚
化结构域
C1
C2
ALK4
ActRIIB

图13C

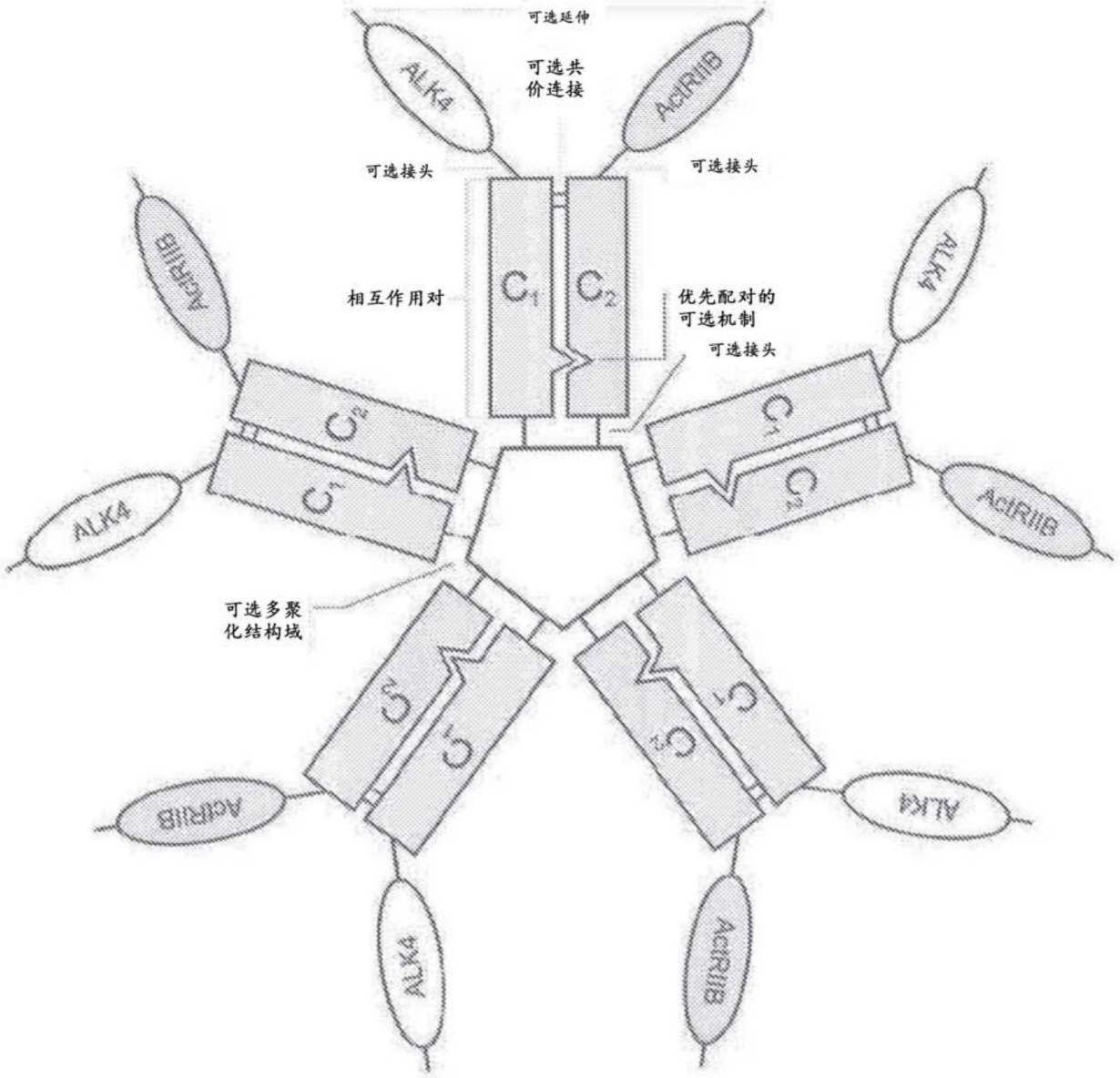

可选延伸
可选共
价连接
ALK4
ActRIIB
可选接头
可选接头
ActRIIB
ALK4
相互作用对
C1
C2
优先配对的
可选机制
可选接头
C2'
C1'
C1
C2
ALK4
ActRIIB
可选多聚
化结构域
C2'
C1'
C1
C2
ActRIIB
ALK4
ALK4
ActRIIB

图13D

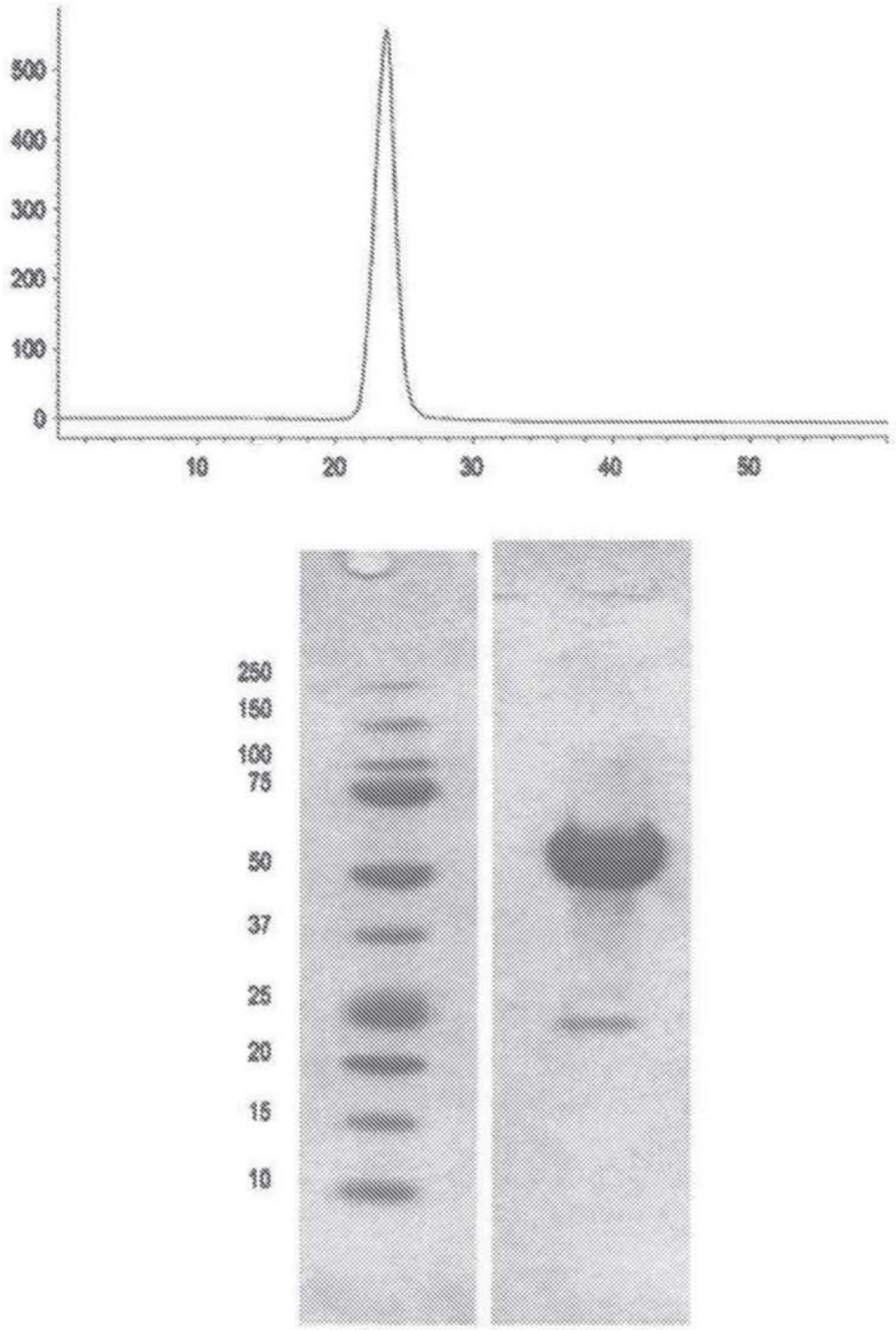


图14

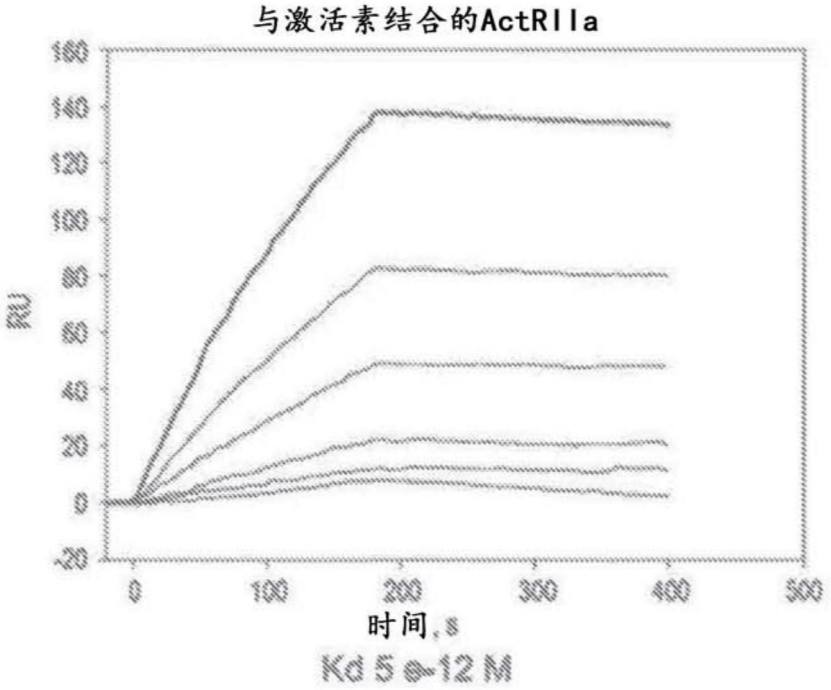

与激活素结合的ActRIIa
RU
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
0
100
200
300
400
500
时间,s
Kd 5 e-12 M

图15A

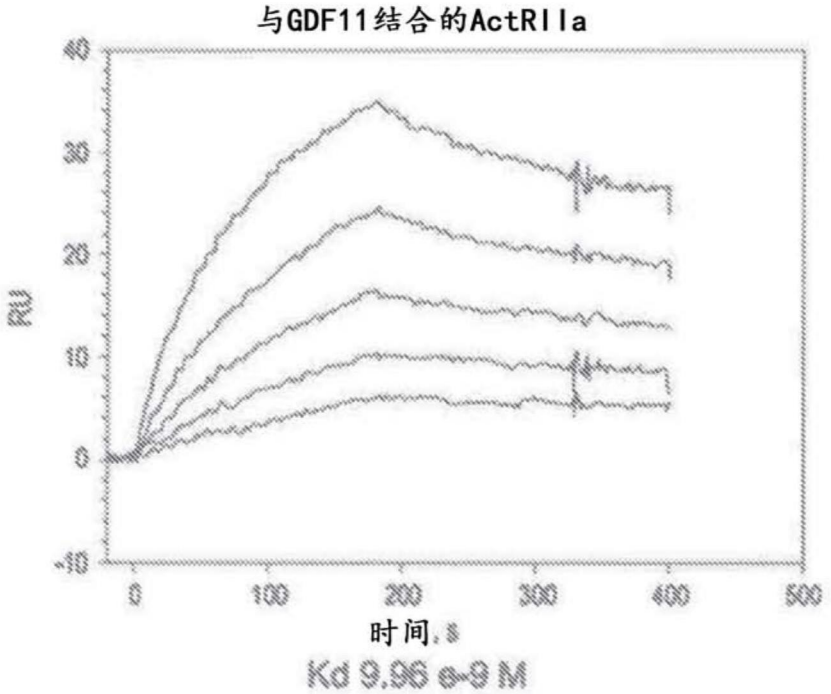
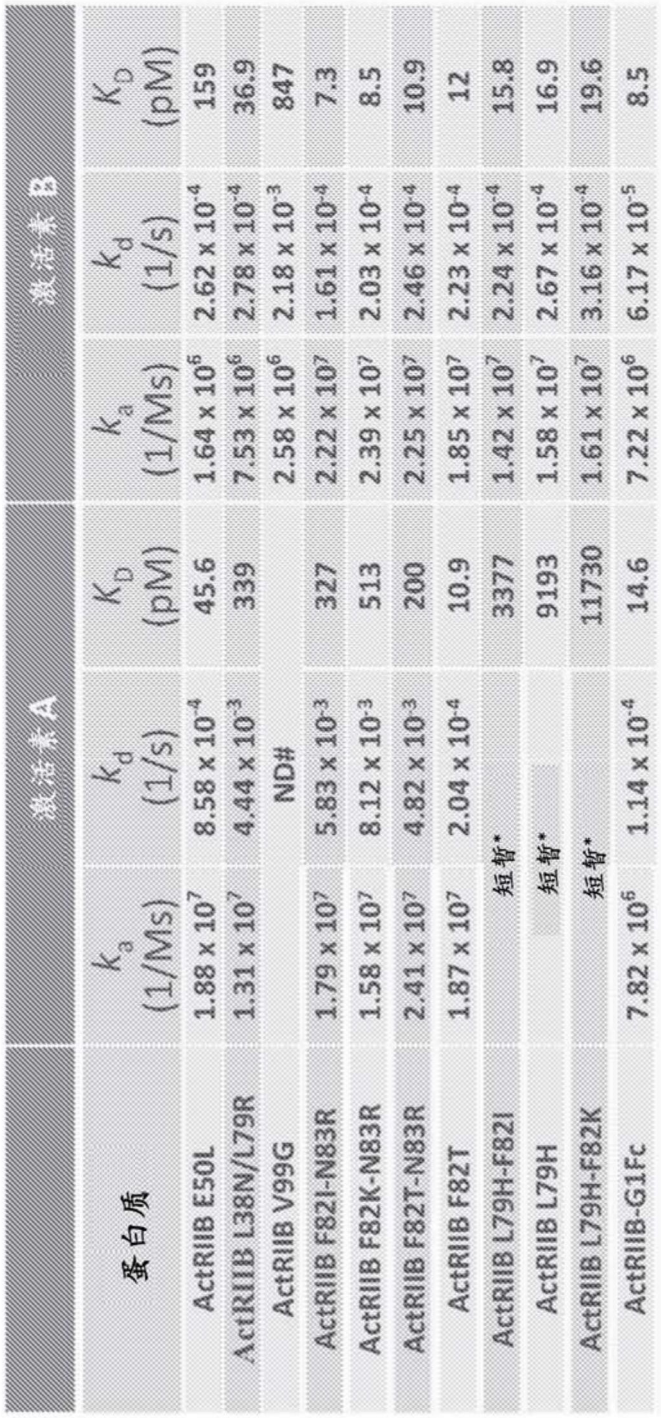
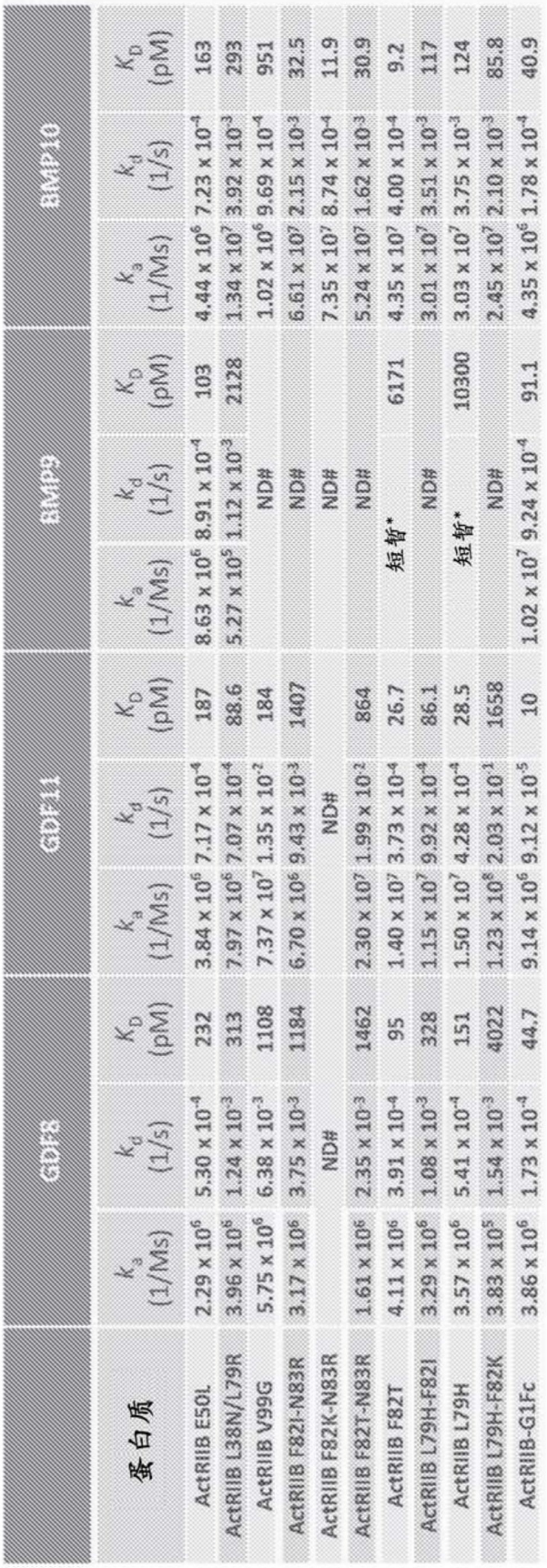

与GDF11结合的ActRIIa
RU
40
30
20
10
0
-10
0
100
200
300
400
500
时间,s
Kd 9.96 e-9 M

图15B



	激活素A			激活素B		
蛋白质	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)
ActRIIB E50L	1.88×10^7	8.58×10^{-4}	45.6	1.64×10^6	2.62×10^{-4}	159
ActRIIB L38N/L79R	1.31×10^7	4.44×10^{-3}	339	7.53×10^6	2.78×10^{-4}	36.9
ActRIIB V99G	ND#			2.58×10^6	2.18×10^{-3}	847
ActRIIB F82I-N83R	1.79×10^7	5.83×10^{-3}	327	2.22×10^7	1.61×10^{-4}	7.3
ActRIIB F82K-N83R	1.58×10^7	8.12×10^{-3}	513	2.39×10^7	2.03×10^{-4}	8.5
ActRIIB F82T-N83R	2.41×10^7	4.82×10^{-3}	200	2.25×10^7	2.46×10^{-4}	10.9
ActRIIB F82T	1.87×10^7	2.04×10^{-4}	10.9	1.85×10^7	2.23×10^{-4}	12
ActRIIB L79H-F82I	短暂*		3377	1.42×10^7	2.24×10^{-4}	15.8
ActRIIB L79H	短暂*		9193	1.58×10^7	2.67×10^{-4}	16.9
ActRIIB L79H-F82K	短暂*		11730	1.61×10^7	3.16×10^{-4}	19.6
ActRIIB-G1Fc	7.82×10^6	1.14×10^{-4}	14.6	7.22×10^6	6.17×10^{-5}	8.5

图16A



	GDF8			GDF11			BMP9			BMP10		
蛋白质	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)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)
ActRIIB E50L	2.29×10^6	5.30×10^{-4}	232	3.84×10^6	7.17×10^{-4}	187	8.63×10^6	8.91×10^{-4}	103	4.44×10^6	7.23×10^{-4}	163
ActRIIB L38N/L79R	3.96×10^6	1.24×10^{-3}	313	7.97×10^6	7.07×10^{-4}	88.6	5.27×10^5	1.12×10^{-3}	2128	1.34×10^7	3.92×10^{-3}	293
ActRIIB V99G	5.75×10^6	6.38×10^{-3}	1108	7.37×10^7	1.35×10^{-2}	184	ND#			1.02×10^6	9.69×10^{-4}	951
ActRIIB F82I-N83R	3.17×10^6	3.75×10^{-3}	1184	6.70×10^6	9.43×10^{-3}	1407	ND#			6.61×10^7	2.15×10^{-3}	32.5
ActRIIB F82K-N83R	ND#			ND#			ND#			7.35×10^7	8.74×10^{-4}	11.9
ActRIIB F82T-N83R	1.61×10^6	2.35×10^{-3}	1462	2.30×10^7	1.99×10^{-2}	864	ND#			5.24×10^7	1.62×10^{-3}	30.9
ActRIIB F82T	4.11×10^6	3.91×10^{-4}	95	1.40×10^7	3.73×10^{-4}	26.7	短暂*		6171	4.35×10^7	4.00×10^{-4}	9.2
ActRIIB L79H-F82I	3.29×10^6	1.08×10^{-3}	328	1.15×10^7	9.92×10^{-4}	86.1	ND#			3.01×10^7	3.51×10^{-3}	117
ActRIIB L79H	3.57×10^6	5.41×10^{-4}	151	1.50×10^7	4.28×10^{-4}	28.5	短暂*		10300	3.03×10^7	3.75×10^{-3}	124
ActRIIB L79H-F82K	3.83×10^5	1.54×10^{-3}	4022	1.23×10^8	2.03×10^{-1}	1658	ND#			2.45×10^7	2.10×10^{-3}	85.8
ActRIIB-G1Fc	3.86×10^6	1.73×10^{-4}	44.7	9.14×10^6	9.12×10^{-5}	10	1.02×10^7	9.24×10^{-4}	91.1	4.35×10^6	1.78×10^{-4}	40.9

图16B

在37℃下同二聚ActRIIB-Fc蛋白的配体结合												
	激活素A			GDF11			BMP9			BMP10		
ActRIIB蛋白	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)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)
ActRIIB-G1Fc	2.3×10^6	1.1×10^{-4}	47	1.0×10^7	1.2×10^{-4}	12	3.0×10^7	1.1×10^{-3}	37	3.6×10^7	1.6×10^{-4}	4
K55A	3.0×10^6	1.4×10^{-4}	46	1.6×10^7	4.0×10^{-4}	26	4.9×10^7	7.0×10^{-3}	142	3.2×10^7	7.4×10^{-4}	23
K55A / F82I	5.7×10^6	2.7×10^{-4}	47	2.2×10^7	2.0×10^{-3}	90	1.6×10^7	2.1×10^{-3}	134	1.3×10^8	8.6×10^{-4}	7
K55E	2.5×10^6	1.6×10^{-4}	64	1.2×10^7	6.3×10^{-4}	52	1.1×10^8	3.0×10^{-2}	270	3.4×10^7	4.7×10^{-4}	14
K74A	3.2×10^7	1.1×10^{-3}	34	1.9×10^6	8.1×10^{-4}	430	1.7×10^8	6.2×10^{-2}	360	7.5×10^7	2.5×10^{-3}	33
L79H	1.9×10^6	5.6×10^{-4}	300	2.0×10^7	7.5×10^{-4}	37	2.4×10^6	1.8×10^{-3}	760	1.9×10^7	2.1×10^{-3}	120
L79H / F82I	1.2×10^6	6.7×10^{-4}	580	2.6×10^7	1.7×10^{-3}	64	1.3×10^7	2.8×10^{-3}	220	2.7×10^7	3.0×10^{-3}	110
L79K	4.0×10^6	5.1×10^{-4}	130	1.2×10^7	1.7×10^{-3}	140	1.6×10^7	1.7×10^{-2}	1100	4.7×10^6	6.2×10^{-3}	1400
L79K / F82K	1.4×10^6	8.6×10^{-4}	640	4.5×10^7	6.7×10^{-2}	1600	ND#			2.2×10^7	1.5×10^{-4}	68
F82I	1.9×10^6	1.5×10^{-4}	78	8.2×10^6	8.4×10^{-5}	10	9.2×10^7	2.5×10^{-2}	275	2.4×10^7	1.5×10^{-4}	8
F82K	1.8×10^6	1.7×10^{-4}	93	1.6×10^7	9.1×10^{-4}	57	短暂*			3.1×10^7	2.6×10^{-4}	8
*由于相互作用的短暂性而不确定												
ND#表明，所述值在所测试的浓度范围内无法检测。												

图17

在25℃下同二聚ActRIIB-Fc蛋白的配体结合												
	激活素A			GDF11			BMP9			BMP10		
ActRIIB 蛋白	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)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)
ActRIIB-G1Fc	2.3×10^6	5.2×10^{-4}	250	9.1×10^6	9.8×10^{-5}	11	7.4×10^6	4.4×10^{-4}	59	3.3×10^6	5.0×10^{-4}	169
N35E	1.3×10^6	1.0×10^{-3}	800	6.7×10^6	1.9×10^{-4}	28	ND#			4.3×10^6	1.2×10^{-3}	280
N35F	1.6×10^6	4.7×10^{-4}	290	8.2×10^6	1.4×10^{-4}	17	ND#			2.6×10^6	5.8×10^{-4}	220
N35Q	2.0×10^6	6.5×10^{-4}	320	7.7×10^6	1.6×10^{-4}	20	ND#			2.7×10^6	7.1×10^{-4}	270
L38D	1.7×10^6	4.0×10^{-4}	230	5.8×10^6	1.8×10^{-4}	30	6.6×10^6	4.2×10^{-4}	63	3.3×10^6	4.9×10^{-4}	150
L38Q	1.8×10^6	3.5×10^{-4}	200	7.0×10^6	1.5×10^{-4}	21	7.4×10^6	2.5×10^{-4}	33	3.9×10^6	3.5×10^{-4}	89
L38R	1.9×10^6	4.5×10^{-4}	230	6.4×10^6	4.6×10^{-5}	7	1.4×10^7	5.5×10^{-4}	50	1.6×10^6	1.7×10^{-4}	110
K74M	ND#			ND#			ND#			ND#		
K74T	ND#			ND#			ND#			ND#		
L79W	1.3×10^6	3.2×10^{-4}	260	1.2×10^7	5.2×10^{-4}	44	9.2×10^6	1.1×10^{-3}	110	2.9×10^6	4.7×10^{-4}	160
F82Y	2.3×10^6	3.9×10^{-4}	170	7.1×10^6	1.3×10^{-4}	18	8.4×10^6	6.9×10^{-4}	82	3.7×10^6	5.2×10^{-4}	140
Q98A	3.4×10^6	5.3×10^{-4}	155	4.7×10^6	1.8×10^{-4}	37	1.2×10^7	5.3×10^{-4}	43	2.6×10^6	5.4×10^{-4}	210
Q98I	4.1×10^6	6.4×10^{-4}	157	3.9×10^6	1.9×10^{-4}	49	1.6×10^7	9.4×10^{-4}	59	2.6×10^6	5.6×10^{-4}	210
Q98K	3.3×10^6	4.8×10^{-4}	145	4.6×10^6	1.7×10^{-4}	37	1.1×10^7	7.4×10^{-4}	69	7.4×10^6	5.0×10^{-4}	68
Q98L	3.8×10^6	8.2×10^{-4}	220	4.0×10^6	1.7×10^{-4}	43	1.6×10^7	1.2×10^{-3}	71	1.1×10^7	7.2×10^{-4}	65
Q98R	3.4×10^6	1.0×10^{-3}	300	5.5×10^6	1.1×10^{-4}	20	9.7×10^7	7.2×10^{-3}	74	2.5×10^6	8.1×10^{-4}	320
Q98V	3.6×10^6	6.0×10^{-4}	160	5.0×10^6	1.6×10^{-4}	33	1.1×10^7	5.0×10^{-4}	47	1.0×10^7	5.0×10^{-4}	48
ND#表明，所述值在所测试的浓度范围内无法检测。												

图18

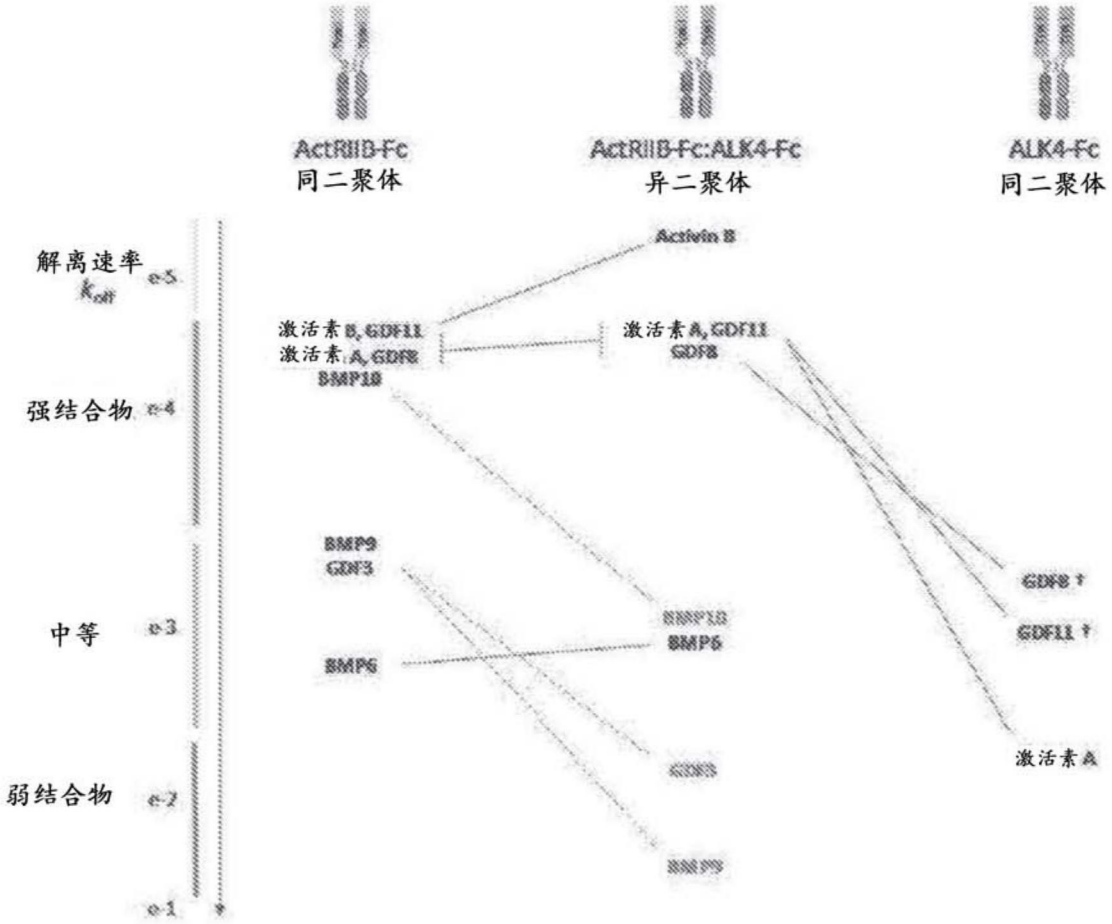

ActRIIB-Fc
同二聚体
ActRIIB-Fc:ALK4-Fc
异二聚体
ALK4-Fc
同二聚体
解离速率
k_{off}
e-5
强结合物
e-4
中等
e-3
弱结合物
e-2
e-1
Activin B
激活素B,GDF11
激活素A,GDF8
BMP10
激活素A,GDF11
GDF8
BMP9
GDF3
BMP10
BMP6
BMP6
GDF8 ?
GDF11 ?
激活素A
GDF3
BMP9

图19

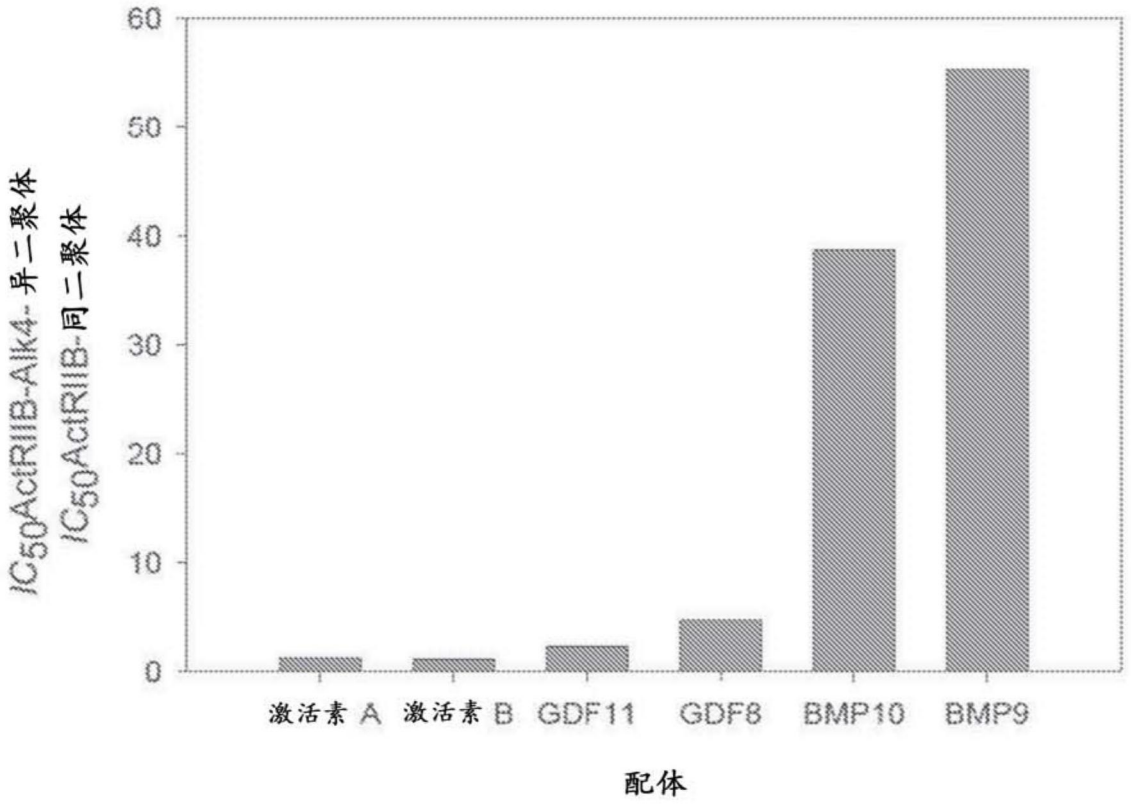

60
50
40
30
20
10
0
IC_{50}ActRIIB-Alk4-异二聚体
IC_{50}ActRIIB-同二聚体
激活素 A
激活素 B
GDF11
GDF8
BMP10
BMP9
配体

图20

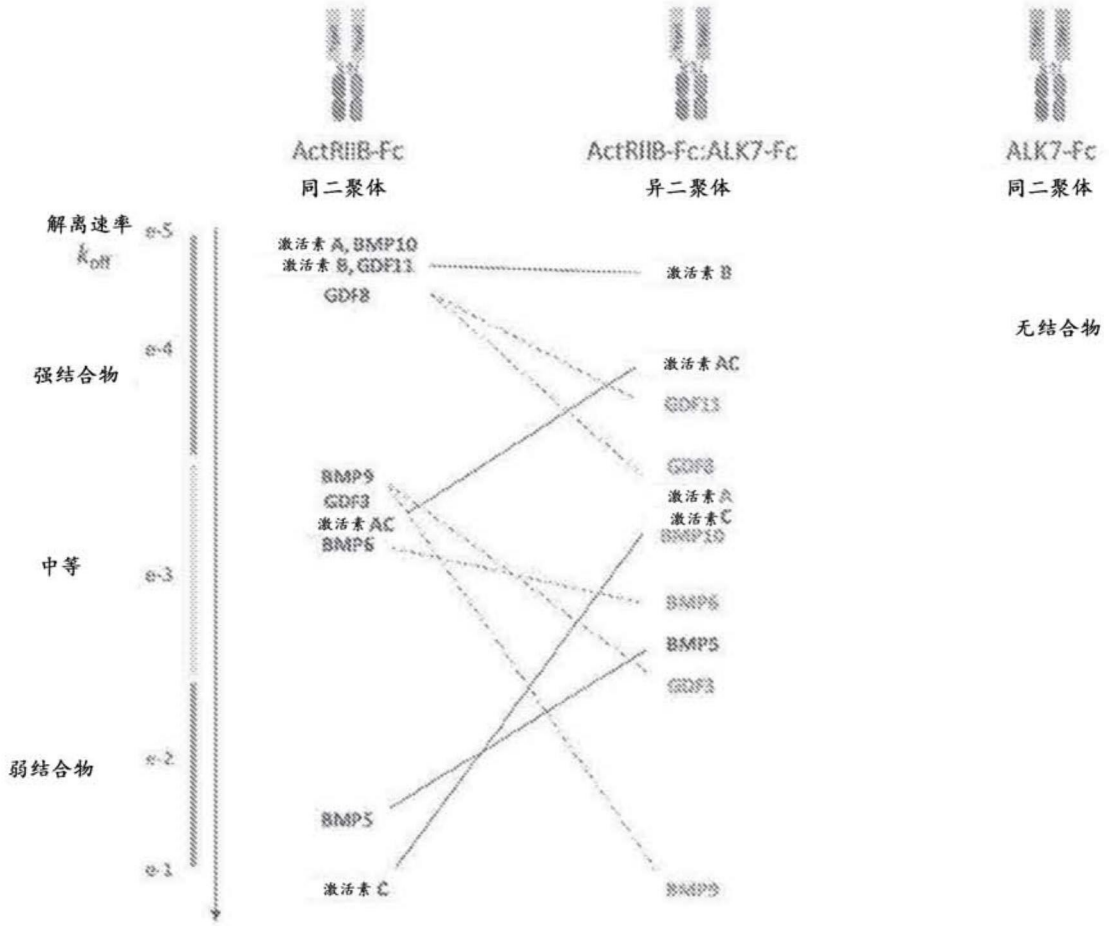

ActRIIB-Fc
同二聚体
ActRIIB-Fc:ALK7-Fc
异二聚体
ALK7-Fc
同二聚体
解离速率
k_{off}
e-5
e-4
e-3
e-2
e-1
强结合物
中等
弱结合物
无结合物
激活素A,BMP10
激活素B,GDF11
GDF8
BMP9
GDF3
激活素AC
BMP6
BMP5
激活素C
激活素B
激活素AC
GDF11
GDF8
激活素A
激活素C
BMP10
BMP6
BMP5
GDF3
BMP9

图21

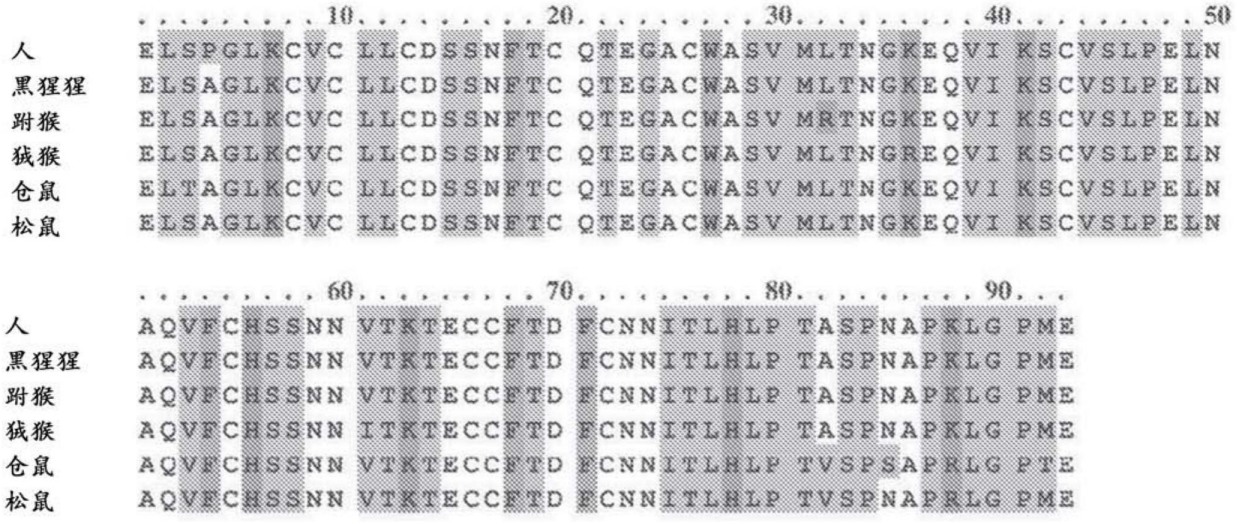

10 20 30 40 50
人 ELSPGLKCVC LLCDSSNFTC QTEGACWASV MLTNGKEQVI KSCVSLPELN
黑猩猩 ELSAGLKCVC LLCDSSNFTC QTEGACWASV MLTNGKEQVI KSCVSLPELN
跗猴 ELSAGLKCVC LLCDSSNFTC QTEGACWASV MRTNGKEQVI KSCVSLPELN
狨猴 ELSAGLKCVC LLCDSSNFTC QTEGACWASV MLTNGREQVI KSCVSLPELN
仓鼠 ELTAGLKCVC LLCDSSNFTC QTEGACWASV MLTNGKEQVI KSCVSLPELN
松鼠 ELSAGLKCVC LLCDSSNFTC QTEGACWASV MLTNGKEQVI KSCVSLPELN
60 70 80 90
人 AQVFCHSSNN VTKTECCFTD FCNNITLHLP TASPNAPKLG PME
黑猩猩 AQVFCHSSNN VTKTECCFTD FCNNITLHLP TASPNAPKLG PME
跗猴 AQVFCHSSNN VTKTECCFTD FCNNITLHLP TASPNAPKLG PME
狨猴 AQVFCHSSNN ITKTECCFTD FCNNITLHLP TASPNAPKLG PME
仓鼠 AQVFCHSSNN VTKTECCFTD FCNNITLHLP TVSPSAPKLG PTE
松鼠 AQVFCHSSNN VTKTECCFTD FCNNITLHLP TVSPNAPRLG PME

图22

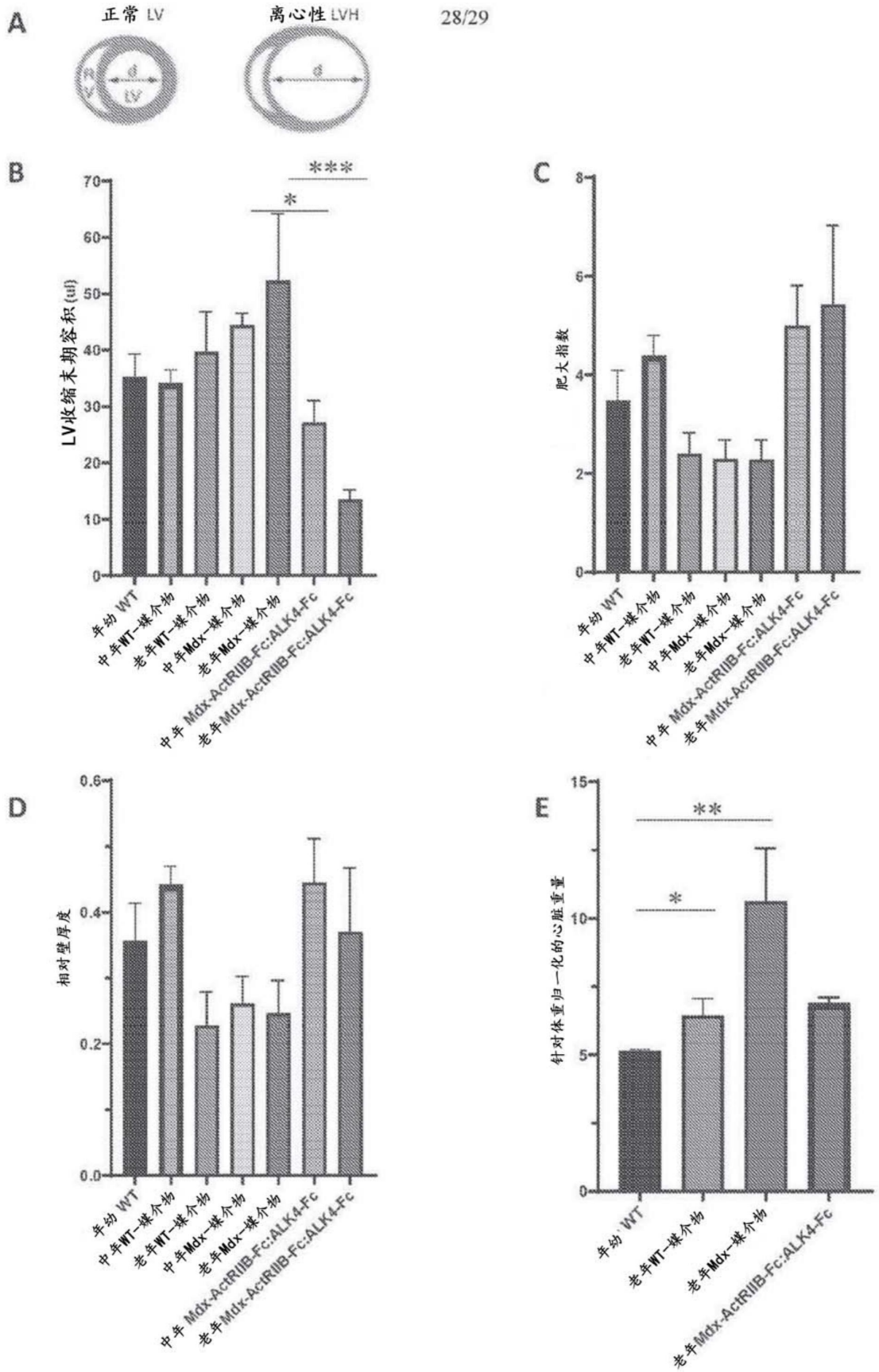

A
正常 LV
离心性 LVH
28/29
B
LV收缩末期容积(ul)
C
肥大指数
D
相对壁厚度
E
针对体重归一化的心脏重量
年幼 WT
中年WT-媒介物
老年WT-媒介物
中年Mdx-媒介物
老年Mdx-媒介物
中年 Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc
老年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc

图23

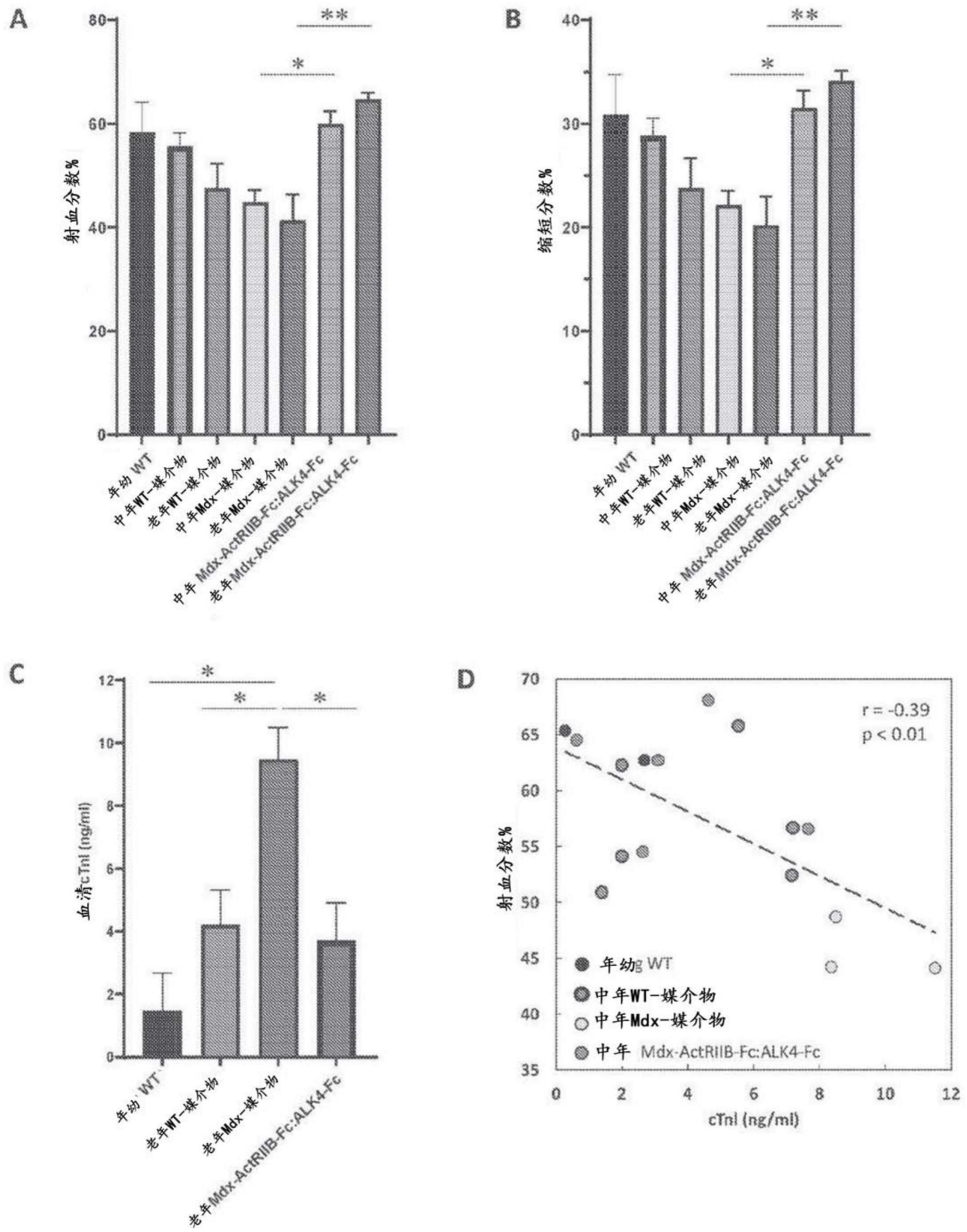

A
射血分数%
80
60
40
20
0
**
*
年幼 WT
中年WT-媒介物
老年WT-媒介物
中年Mdx-媒介物
老年Mdx-媒介物
中年 Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc
老年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc
B
缩短分数%
40
30
20
10
0
**
*
年幼 WT
中年WT-媒介物
老年WT-媒介物
中年Mdx-媒介物
老年Mdx-媒介物
中年 Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc
老年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc
C
血清cTnI (ng/ml)
12
10
8
6
4
2
0
*
*
*
年幼 WT
老年WT-媒介物
老年Mdx-媒介物
老年Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc
D
射血分数%
70
65
60
55
50
45
40
35
r = -0.39
p < 0.01
年幼g WT
中年WT-媒介物
中年Mdx-媒介物
中年 Mdx-ActRIIB-Fc:ALK4-Fc
0
2
4
6
8
10
12
cTnI (ng/ml)

图24